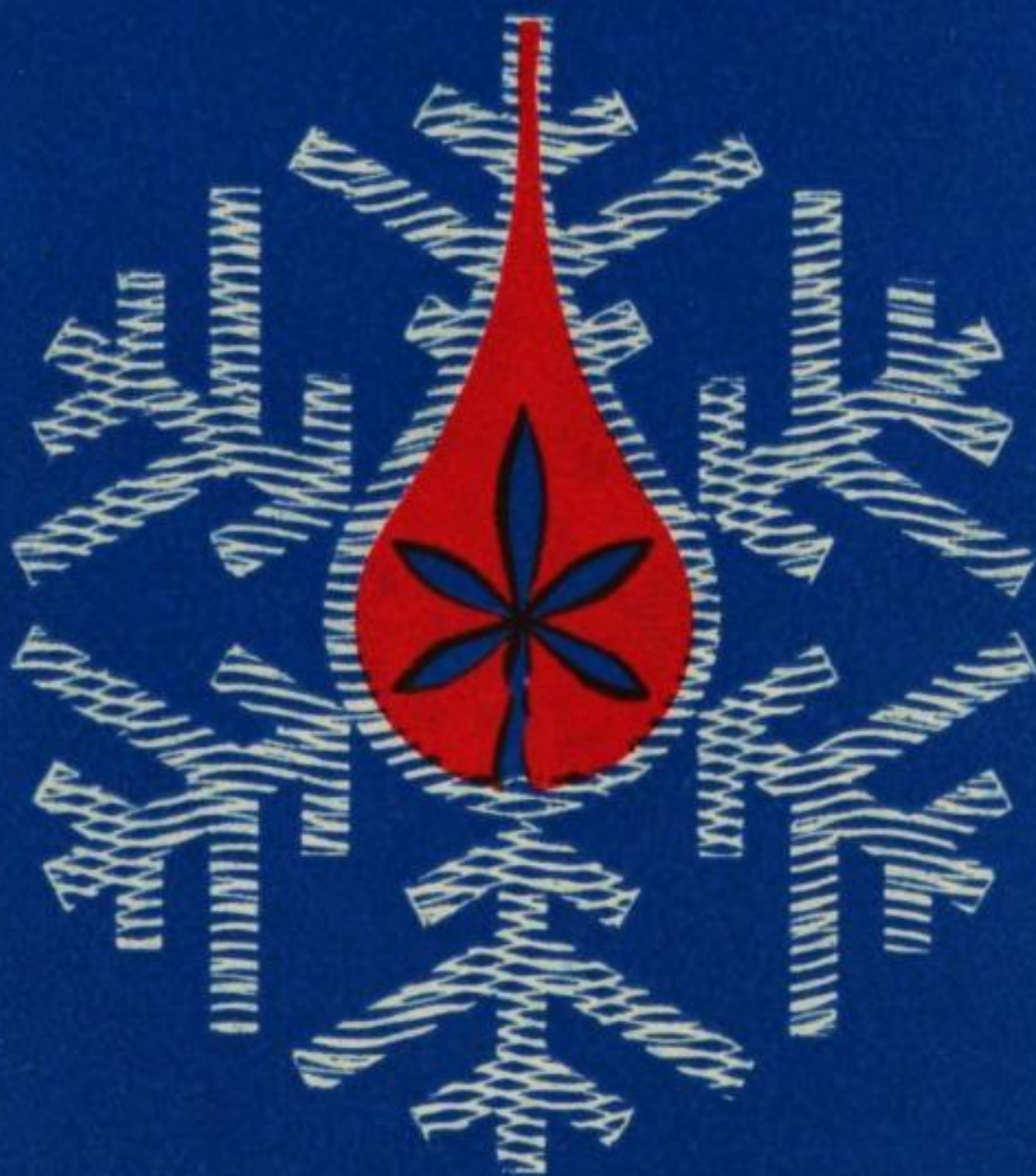


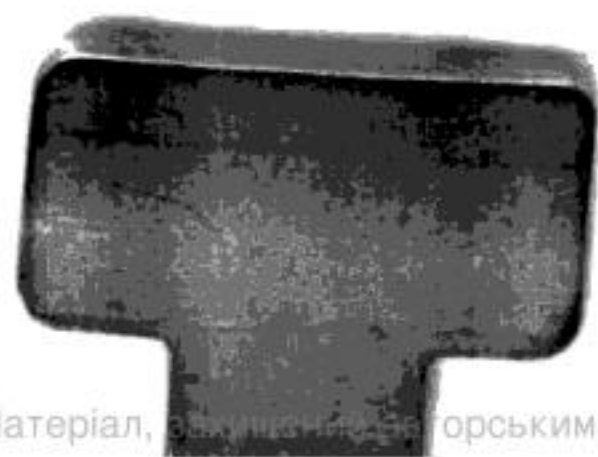
КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ISSN 0130-2963



8

1981



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

В Ы П У С К

8

КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1981

В сборнике изложены результаты исследований влияния физических и химических факторов на криоконсервирование клеток крови, освещены некоторые стороны механизма действия криопротекторов и их токсикофармакологическая характеристика, описаны теплофизические параметры процесса замораживания и отогрева. Представлены экспериментальные и клинические данные по влиянию холода на патологически измененные ткани, а также результаты трансфузий консервированной крови.

Для широкого круга биологов и медиков, работающих в области криобиологии и криомедицины.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Редакция межведомственных сборников

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043:547.96:535.243

В. А. Моисеев, Т. Ф. Морозова, Е. В. Масленникова

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ МИОЗИНА, ПОДВЕРГНУТОГО ЗАМОРАЖИВАНИЮ ДО ТЕМПЕРАТУР КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

Влияние замораживания-отогрева на структуру мышечных белков представляет интерес в связи с проблемой низкотемпературного консервирования мышечной ткани. Один из подходов к решению этой задачи — изучение плавления миозина. Известно, что наиболее выраженные изменения структуры белков происходят при медленном замораживании-отогреве, и особенно в зоне кристаллизации раствора. В связи с этим в данной статье изложены результаты спектрофотометрического изучения плавления миозина после медленного замораживания-оттаивания.

Миозин был выделен по методу Перри с несущественными модификациями по А. Д. Тартаковскому [4]. Конечное растворение миозина проводили в 0,5 М КСl на 0,02 М *трис*-НСl или боратном буфере при рН 6—10, т. е. в области максимальной АТФ-азной активности белка [1]. Концентрация белка во всех образцах составляла 1—0,5 мг/мл. Медленное замораживание осуществляли в парах азота до -10°C со скоростью 1—2 $^{\circ}\text{C}$ /мин. Отогрев образцов проводили на воздухе. Скорость отогрева составляла 1—2 $^{\circ}\text{C}$ /мин.

Плавление миозина проводили на спектрофотометре «Пай Уникам SP-8000» с помощью температурной приставки «SP-875». За плавлением белка наблюдали как по изменению оптической плотности растворов на различных длинах волн (255, 275, 325 нм), так и по изменению максимальной длины волны поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$).

При нагревании контрольных образцов миозина появляется довольно большое число температурных областей, в пределах которых происходят изменения оптической плотности образцов, их светорассеяния, положения $\lambda_{\text{макс}}$ поглощения. В частности, нами установлено, что при рН 10,2 изменения оптической плотности образцов и их светорассеяния наблюдаются при температурах +29 $^{\circ}\text{C}$, 35, 41—43, 46, 50, 55, 59 $^{\circ}\text{C}$. Изменениям оптической плотности и светорассеяния образцов при температурах 41—43 $^{\circ}\text{C}$ и 59 $^{\circ}\text{C}$ соответствуют коротковолновые сдвиги спектров.

Ранее с помощью флуоресцентной спектроскопии было показано, что в интервале температур от 20 до 40 $^{\circ}\text{C}$ миозин претерпевает конформационные изменения [2]. Наши данные также свидетельствуют о наличии изменений оптических свойств растворов белка при температурах от 20 до 35 $^{\circ}\text{C}$. Они связаны, вероятно, с изменениями в глобулярной «головке» миозина, так как при этих температурах происходят изменения АТФ-азной активности белка [1]. С помощью метода калориметрии показано, что плавление «хвоста» миозина происходит при более высоких температурах [3, 5]. Поэтому можно предположить, что наблюдаемые изменения при температурах выше 40—50 $^{\circ}\text{C}$ связаны с плавлением «хвоста» молекулы. Возможно, вклад в изменение оптических свойств белкового раствора в этом интервале температур вносят и процессы, связанные с изменением состояния миозиновой «головки».

Интервал температур, в котором можно проводить спектрофотометрию растворов, зависит от величины рН. Наши эксперименты показали, что при изменении рН от 6 до 10 температура помутнения миозина в результате нагревания увеличивается. Это позволяет проследить за плавлением белка в более широком интервале температур. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при изменении температуры от 20 до 40—60°C спектрофотометрическое изучение растворов миозина дает возможность наблюдать сложную картину плавления этого белка.

Изучение плавления миозина, подвергнутого медленному замораживанию-отогреву, позволило установить, что наибольшие изменения температур плавления наблюдаются в интервале до +45°C. По-видимому, замораживание-отогрев образцов белка в 0,5 М КСl оказывает большее влияние на глобулярную часть белка и, возможно, на область так называемых шарниров миозинового «хвоста».

Резкое помутнение опытных образцов наблюдалось при температурах на 1—3°C выше, чем у контрольных. Увеличение стабильности опытных образцов зависело от значения рН растворов. Это свидетельствует о том, что замораживание-оттаивание белка влияет также на стабильность «хвоста» молекулы. Таким образом, мы установили, что медленное замораживание миозина до температуры кристаллизации белкового раствора и последующий разогрев приводят к конформационным изменениям этого белка.

1. Данилова В. М. Методы получения и характеристики гладкомышечного миозина. — В кн.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л.: Наука, 1978, с. 76—89.
2. Зима В. Л., Данилова В. М., Минченко П. Г., Богач П. Г. Флуоресцентные вивчення взаємодії міозину з АТФ. Вплив температури і рН. — Доп. АН УРСР. Сер. Б, 1978, № 5, с. 448—452.
3. Потехин С. А., Транков В. А., Привалов П. Л. Стадийность тепловой денатурации спиральных фрагментов миозина. — Биофизика, 24, вып. 1, с. 46—51.
4. Тартаковский А. Д. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечнополосатых мышц. — В кн.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л.: Наука, 1978, с. 55—74.
5. Goodno Ch. Thermal transitions of myosin and its helical fragment. — Biochemistry, 1975, 14, N 5, p. 867—872.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12.09.79

УДК 57.С43:577.15

В. А. Моисеев, Е. Д. Розанова, Е. И. Тарасенко

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТОХРОМА С И ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Работы по изучению влияния низких температур на структурно-функциональное состояние белков и особенно ферментов в последнее время связаны не только с интересами криобиологии, но и энзимологии. Замедление ферментативных реакций, вызываемое низкими температурами, позволит глубже разобраться в механизмах ферментативного катализа. Однако для этого необходимо, чтобы низкие температуры не приводили к нарушению структуры фермента, а температурная зависимость его активности (при соответствующем подборе состава растворителя) подчинялась закону Аррениуса (для корректного экстраполирования измеренных констант к значениям их при физиологической температуре). Действительно, для некоторых ферментов [2] удалось достиг-

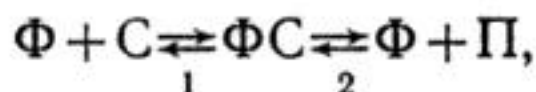
нуть выполнения соотношения Аррениуса вплоть до -70°C при соответствующем подборе состава растворителя. Ценную информацию об обратимости структурно-функциональных изменений, вызванных низкими температурами, может дать замораживание-отогрев растворов белков и ферментов по различным программам. К тому же некоторые работы [3—5] указывают на зависимость степени низкотемпературной повреждаемости их от скорости охлаждения. В работах [5, 7] высказано предположение, что при медленном замораживании повреждение белков вызывается гиперконцентрацией электролитов, а при быстром — дегидратацией.

Из ряда работ известно о криолабильности цитохромоксидазы как в составе клетки [1], так и в изолированном состоянии [8]. В связи с этим мы провели исследования по влиянию скоростей охлаждения на функциональные характеристики фермента цитохромоксидазы и белка цитохрома С, который является одним из субстратов реакции, катализируемой цитохромоксидазой.

Цитохромоксидазу выделяли по методу Кинга [6], в результате чего получали белок-липидный комплекс с соотношением поглощений $A_{280}/A_{418}-3,2$, что свидетельствует о его достаточной чистоте. В качестве детергента применяли 0,5%-ный раствор холата натрия. Использовали цитохром С фирмы «Биомед» (Польша), восстановленный аскорбатом. От излишка аскорбата избавлялись очисткой на колонке с сефадексом G-25. В качестве исследуемых функциональных параметров измерялись кинетические константы — константа Михаэлиса K_m и максимальная скорость реакции V_m . Кинетические кривые снимали на спектрофотометре «Пай Уникам SP-8000» при длине волны 550 нм. K_m и V_m определяли по методу Лайнуивера—Бэрка.

Замораживание препаратов проводили по 0,5 мл в полиэтиленовых ампулах до -100°C со скоростями $1^{\circ}/\text{мин}$ и $15^{\circ}/\text{мин}$ в установке «Замораживатель программный» ЗП и со скоростью $100^{\circ}/\text{мин}$ погружением в жидкий азот. Отогрев производили быстрый (в водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$) до 0°C . Цитохромоксидазу замораживали в Na-фосфатном буфере pH 7,4 с 0,5% холата натрия, цитохром С — в Na-фосфатном буфере pH 6,0. Концентрация белка $\sim 2 \text{ мкг}/\text{мл}$. В работе приведены данные трех экспериментов (табл. 1—3).

В табл. 1 приведены данные по замораживанию цитохромоксидазы. Медленное замораживание — быстрый отогрев не влияют на функциональное состояние фермента. Скорости замораживания соответственно $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ приводят к уменьшению максимальной скорости катализа, но, по-видимому, различными путями, что видно из данных по изменению константы Михаэлиса. Если представить ферментативную реакцию по обычной упрощенной схеме



где Φ — фермент, С — субстрат, П — продукт, то здесь константа K_m характеризует I этап реакции, т. е. чем она меньше, тем быстрее скорость образования фермент-субстратного комплекса, а V_m отражает скорость оборота фермента.

Цитохром С (табл. 2) претерпевает изменения при всех исследованных скоростях замораживания. Так же как и в случае с цитохромоксидазой, наблюдаются различные значения кинетических параметров в зависимости от скорости замораживания. Данные о замороженных пре-

Т а б л и ц а 1
Влияние замораживания-оттаивания цитохромоксидазы на кинетические параметры реакции окисления восстановленного цитохрома С

Скорость замораживания	K_m , %	V_m , %
Контроль	100	100
$1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	100	100
$15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	40	80
$100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	250	43

Таблица 2
Влияние замораживания-оттаивания
цитохрома С на кинетические
параметры реакции окисления
восстановленного цитохрома С

Скорость замораживания	K_m , %	V_m , %
Контроль	100	100
1°C/мин	15	20
15°C/мин	80	80
100°C/мин	730	30

Таблица 3
Влияние замораживания-оттаивания
цитохромоксидазы и цитохрома С
на кинетические параметры реакции
окисления восстановленного
цитохрома С

Скорость реакции	K_m , %	V_m , %
Контроль	100	100
1°C/мин	15	20
15°C/мин	50	63
100°C/мин	725	30

паратах цитохромоксидазы и цитохрома С приведены в табл. 3. Здесь изменение констант наблюдается при всех скоростях охлаждения.

Таким образом, как нами было показано, что не только цитохромоксидаза, представляющая собой белок-липидный комплекс, но и довольно простой низкомолекулярный белок, молекулярная масса (M_m) которого равна 12 000, — цитохром С, претерпевают какие-то конформационные изменения под действием замораживания-оттаивания, приводящие к замедлению реакции окисления цитохрома С, катализируемой цитохромоксидазой. При этом скорость замораживания, по-видимому, определяет характер вызванных изменений, т. е. можно предположить, что механизм повреждений, вызванных разными скоростями охлаждения, различен. Для более точной интерпретации необходимы структурные исследования этих белков, которые помогут раскрыть механизмы изменений, вызванных действием низких температур.

1. Обозная Э. И. Анализ состояния ряда окислительно-восстановительных ферментов в клетках донорского и посмертного костного мозга после глубокого охлаждения. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 83—85.
2. Douzou P. The use of subzero temperatures in biochemistry: slow reactions. — Meth. Biochem. Anal., 1974, 22, p. 401—512.
3. Fishbein W. N., Winkert J. W. Low temperature zone of cryophyllactant damage in phosphate-buffered saline (PBS). — Cryobiology, 1977, 14, N 6, p. 706.
4. Fishbein W. N., Winkert J. W. Parameters of biological freezing damage in simple solutions: Catalase. — Cryobiology, 1977, 14, N 4, p. 389—398.
5. Fishbein W. H., Winkert J. W. Parameters of biological freezing damage in simple solutions: Catalase. II. — Cryobiology, 1978, 15, N 2, p. 168—177.
6. Kuboyama M., Fook Choy Jong, Tsou E. King. Studies on cytochrome oxidase. — J. Biol. Chem., 1972, 247, N 20, p. 6375—6383.
7. Tsutsayeva A. A., Pushkar N. S., Markova V. M. et al. The mechanism of action of low temperature and cryoprotective agents on immunoproteins. — Cryobiology, 1978, 15, N 4, p. 403—407.
8. Wainio W. W., Nikodem V. Sulfhydryl groups of cytochrome oxidase. — J. Bioenerg., 1973, 4, N 6, p. 579—590.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12.09.79

В. И. Луговой, Л. И. Золочевская

АКТИВНОСТЬ НАД-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

В процессах митохондриального окисления и аккумуляции энергии в клетке важную роль играют ферменты цикла трикарбоновых кислот, в частности малатдегидрогеназа. Однако литературные данные по влиянию низких температур на активность этого фермента малочисленны и противоречивы [5, 7].

С целью выяснения возможных механизмов криповреждения и характера нарушения НАД-зависимой малатдегидрогеназы (НАД-МДГ) исследовали активность указанного фермента после различных режимов замораживания-оттаивания митохондрий печени крыс.

Материалы и методы. В опытах использовали белых беспородных крыс весом 180—220 г. Животных забивали декапитацией, быстро извлекали печень и помещали ее в холодную среду выделения, состоящую из 0,25 М сахарозы и 0,01 М *трис*-HCl (pH 7,4).

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования, ресуспендировали в ручном стеклянном гомогенизаторе в среде выделения. Полученная суспензия подвергалась разным режимам замораживания-оттаивания. Быстрое замораживание (БЗ) до -196°C со скоростью 300—400°/мин осуществляли, непосредственно погружая полиэтиленовые ампулы в жидкий азот. Медленное замораживание (МЗ) со скоростью 1°/мин до -30 , -70 — 80 , -120 и -196°C осуществляли, помещая ампулы в пары жидкого азота. Оттаивание проб проводили двумя способами: в водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 80—70°/мин — быстрое оттаивание (БО), и при комнатной температуре со скоростью 1,5—2°/мин — медленное оттаивание (МО). Скорость замораживания-оттаивания контролировали с помощью медь-константановой термопары и регистрировали на ленте самописца.

Общая активность НАД-МДГ определялась спектрофотометрически по убыли из реакционной среды НАДН. Среда инкубации была следующей: 2,7 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4; 0,1 мл 0,004 М НАДН; 0,1 мл 0,01 М оксалоацетата pH 7,4 и 0,1 мл ферментного препарата, разведенного фосфатным буфером в 20 раз. Скорость реакции регистрировалась на СФ-16 при 340 нм и 25°C . В качестве контроля служила незамороженная суспензия митохондрий. Концентрация белка определялась по методу Лоури [6]. Результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. Как видно из таблицы, БЗ, независимо от скорости оттаивания проб, вызывало примерно одинаковое повышение активности НАД-МДГ. При МЗ митохондрий печени до -30°C и их БО также наблюдалось повышение активности фермента, хотя при дальнейшем МО митохондрий до -70 — 80°C , -120 и -196°C не обнаружено дополнительных изменений активности НАД-МДГ. МЗ-БО митохондрий оказывало более выраженное влияние на изменение активности фермента, так как при сравнении результатов, полученных после МЗ до -30°C , с таковым после БЗ-БО и БЗ-МО обнаружены значимые различия ($p < 0,05$ и $0,05 < p < 0,1$).

Известно, что митохондриальная НАД-зависимая МДГ, катализирующая обратимую реакцию окисления яблочной кислоты, локализована в матриксе митохондрий [3]. Согласно современным представлениям, многочисленные повреждающие факторы, возникающие при действии низких температур (кристаллизационные явления, вымораживание

свободной воды, увеличение концентрации растворенных веществ, изменение pH среды и т. д.) вызывают нарушение структуры и функций митохондрий [1, 2].

Как видно из приведенных данных, МЗ митохондрий вызывало более резкое повышение активности НАД-МДГ по сравнению с БЗ. Вероятно, концентрационные эффекты в среде, возникающие при медленных скоростях замораживания, оказывают более выраженное повреждающее влияние на митохондрии и конформационное состояние фермента по сравнению с процессами кристаллообразования, характерными для быстрого замораживания.

Возможно, что наиболее вероятной причиной активации малатдегидрогеназы в применявшихся экспериментальных условиях является нарушение проницаемости внутренней мембраны митохондрий, в результате чего создаются более благоприятные условия для доступа субстрата к ферменту. Подобный механизм изменений ферментативной активности после замораживания-оттаивания предложен для транспортных АТФ-аз плазматических мембран эритроцитов [4, 8]. Поэтому можно думать, что активность митохондриальных ферментов — это показатель структурных нарушений митохондрий при действии низких температур.

Т а б л и ц а
Активность НАД-малатдегидрогеназы после различных режимов замораживания-оттаивания митохондрий ($M \pm m$)

Режимы замораживания-оттаивания	Ферментативная активность, μM НАДН- mg^{-1} белка- мин^{-1}
Контроль	$0,89 \pm 0,11$ (8)
Быстрое замораживание — быстрое оттаивание	$1,44 \pm 0,12$ (6) $p < 0,01$
Быстрое замораживание — медленное оттаивание	$1,64 \pm 0,11$ (5) $p < 0,001$
Медленное замораживание — быстрое оттаивание:	
-30°C	$2,03 \pm 0,22$ (6) $p < 0,001$
$-70-80^\circ\text{C}$	$2,07 \pm 0,18$ (8) $p < 0,001$
-120°C	$2,09 \pm 0,22$ (8) $p < 0,001$
-196°C	$1,95 \pm 0,12$ (6) $p < 0,001$

Примечание. В скобках указано количество опытов; величина p рассчитана по сравнению с контролем.

1. Белоус А. М., Луговой В. И., Лемешко В. В. Проблемы криобиологии. — Вестн. АН УССР, 1976, № 2, с. 38—48.
2. Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Белоус А. М. Нарушение структуры мембран митохондрий при воздействии замораживания-оттаивания. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 41—43.
3. Ленинджер А. Л. Биохимия. — М.: Мир, 1974. — 960 с.
4. Луговой В. И., Кравченко Л. П., Гусева Н. Р. Механизмы криоповреждения мембраносвязанных ферментов. — В кн.: Материалы III Укр. биохим. съезда. Донецк, 1977, с. 123—124.
5. Dorn A., Glokner R., Schmidt W. Enzymhistochemische Untersuchungen an isolierten Organen und Geweben. — Acta histochem., 1975, Suppl. 15, p. 147—148.
6. Lowry D. H., Rosenbrought N. J., Farr A. L., Rendall R. G. Protein measurement with the folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—275.
7. Meyer A. E., Benson D., Scholte H. R. The influence of freezing and freeze drying of tissue specimens on enzyme activity. — Histochemistry, 1977, 51, N 4, p. 297—303.
8. Takehara J., Rowe A. W. Increase in ATPase activity in red cell membranes as a function of freezing regimen. — Cryobiology, 1971, N 8, p. 559—561.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.09.79

Л. М. Белова, Г. С. Лобынцева, Н. Н. Чуб

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕРВНЫХ ГАНГЛИЯХ МОЛЛЮСКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОХЛАЖДЕНИЯ ДО -9°C

В связи с расширенным изучением отдаленных полярных районов земного шара, полетами в космос, развитием мореплавания в северных широтах все чаще возникают ситуации, при которых возможно длительное переохлаждение человеческого организма, вызывающее патологические отклонения. Для сохранения нормальной структуры и функций отдельных органов и организма в целом необходимо включение механизмов регуляции на разных уровнях. Обязательными элементами их являются специфические (холодовые и тепловые) и неспецифические нервные рецепторы, деятельность которых зависит от температуры тела.

Многочисленные нервные и гуморальные системы находятся во взаимодействии, поэтому у пострадавших от холодовой травмы часто наблюдаются патологические изменения не только в местах, непосредственно контактирующих с источником холода, но и в зонах, удаленных от участков охлаждения, что проявляется в расстройстве психики и неврологических нарушениях. По мнению Майстраха [8], причиной этих нарушений при замерзании могут быть морфологические изменения в соответствующих отделах нервной системы.

По данным В. П. Девятова [3], при охлаждении отмечается отек мягкой мозговой оболочки, набухание и сморщивание клеток, исчезновение гликогена и РНК из нейронов. Б. А. Аптер [1] наблюдал кровоизлияния в разных отделах головного мозга и его оболочки, стазы и повреждения эритроцитов в мелких сосудах и капиллярах мозга, дистрофические и некробиотические изменения ганглиозных клеток вплоть до их расплавления. Автор считает, что такие морфологические нарушения и объясняют нервно-психические расстройства и смерть после охлаждения, поскольку необратимые патологические изменения нейронов наблюдались только у погибших животных.

Работ по исследованию действия низких температур на нервные клетки мало, вместе с тем эта проблема имеет огромное значение в криобиологии, так как трансплантируемые органы должны сохранять после криоконсервирования структуру и функцию нервных элементов. В связи с этим проведены исследования по выявлению повреждений нервных клеток при различной степени охлаждения животных с адаптацией и без адаптации к низкой температуре.

Материал и методы. В экспериментах были использованы нервные ганглии окологлоточного комплекса моллюсков *Eobania verticulata*.

Контрольный и опытный материал, фиксированный алкоголем, заливали в парафин. Срезы толщиной 8—10 мкм окрашивали тионином по Нисслию, что дает четкую морфологическую картину состояния нислевского вещества и представление о физиологическом состоянии нервных клеток [4].

Изучение реактивных процессов в центральной нервной системе (ЦНС) моллюсков после охлаждения проводилось нами в нескольких вариантах: одна серия животных проходила четырехсуточную адаптацию при температуре $+2,5^{\circ}\text{C}$, после чего животных забивали без отогрева, у другой части животных эту операцию проделывали после 1,5-минутного отогрева в воде при температуре $+42^{\circ}\text{C}$ до появления активных признаков жизни. Часть адаптированных и неадаптированных моллюсков выдерживали соответственно в течение 2; 6 и 24 ч при температуре -9°C с последующим выделением и фиксацией ганглиев ЦНС.

Результаты исследований. Изучение гистологических препаратов окологлоточного нервного кольца контрольных моллюсков *E. verticillata* свидетельствует о том, что их ЦНС, как и у других легочных моллюсков, представлена ганглиями, соединенными по ортоневральному типу в окологлоточное нервное кольцо, состоящее из двух церебральных ганглиев, лежащих над глоткой, подглоточной нервной массы, состоящей из семи тесно связанных ганглиев и соединяющих окологлоточных коннектив. От церебральных ганглиев и подглоточной ганглиозной массы отходят многочисленные нервы, иннервирующие разные участки тела моллюсков.

В цитоархитектонике ганглиев изучаемых моллюсков выдержан общий принцип: на периферии ганглиев лежат тела нейронов (кортикальная зона), отростки которых направлены в нейропил, где осуществляются межклеточные контакты. Объем кортикальной зоны доминирует над объемом нейропиля и состоит из нейронов различной формы и размеров, преимущественно из униполярных крупных и гигантских нейронов (260—400 мкм в диаметре) [5].

Форма ядер нейронов разнообразная, лежат они обычно в центре клеток. Ядра богаты расположенным диффузно хроматином, содержат многочисленные ядрышки неодинаковой величины. В цитоплазме интактных нейронов всех размеров нислевское вещество представлено характерной базофильной структурой, локализованной диффузно.

Нервные клетки, обладая специфической структурой, отличаются высокой морфологической лабильностью, отражают функциональное и физиологическое состояние нейронов и организма в целом. Поэтому отмечены различия в морфологической структуре нейронов моллюсков, охлажденных до температуры -9°C без адаптации и после предварительной выдержки при температуре $+2,5^{\circ}\text{C}$. Установлено, что охлаждение животных без адаптации в течение часа до умеренных температур вызывает существенные изменения в структуре нейронов. В гигантских и крупных нейронах заметны нарушение ядерного аппарата, разрывы в мембране ядра и гомогенизация кардио- и цитоплазмы. Есть клетки-тени. У нейронов меньших размеров деструкция выражена слабее, сохраняется ядерный аппарат, но заметна вакуолизация цитоплазмы, которая занимает краевую область клетки, оттесняя цитоплазму.

После шестичасового пребывания при температуре -9°C на гистологических препаратах наблюдается нарушение цитоархитектоники ганглия. Клетки отслаиваются в область нейропиля и отделяются одна от другой. Много пустот — участков, лишенных клеток, нарушены оболочки ганглия. Ярko выражена гиперхронная реакция всех клеток. Ганглии уменьшены в размерах. Аналогичная картина отмечена и после 24-часового пребывания животных при температуре -9°C . Клетки обладают всеми признаками деструкции, у подавляющего большинства она носит необратимый характер: разрушен ядерный аппарат, на его месте возникают пустоты, ядрышко в ряде случаев сохраняется и лежит свободно в нейроплазме. Наряду с этим у ряда средних и мелких нейронов не выявлено видимых изменений: сохраняется нормальная структура ядра и ядрышка, в цитоплазме отмечены слабые признаки лизиса и вакуолизации.

Моллюски, подвергшиеся предварительной адаптации при температуре $2,5^{\circ}\text{C}$, после полутораминутного отогрева в «водяной бане» проявили признаки активной жизни. Однако на гистологических препаратах обнаружены признаки ретроградной дегенерации, наиболее выраженные в крупных и гигантских нейронах. Большинство мелких и средних нейронов были без видимых изменений.

У животных, подвергавшихся двухчасовому охлаждению до -9°C , после предварительной адаптации нами установлены незначительные изменения в нейронах: легкое сморщивание или набухание ядра, гипер-

хромия ядрышка, расплавление нисслевской субстанции в области аксонального холмика. Глыбки нисслевского вещества становятся более мелкими, но по-прежнему тионинофильны, наблюдается умеренный хроматолиз. Неврилема ганглия остается без изменений.

После шести- и 24-часового пребывания адаптированных животных при температуре -9°C изменения в цитоархитектонике ганглия не столь значительны. Нет оптически пустых участков, оболочка ганглия в норме. Выражена гиперхромная реакция. Имеются клетки с признаками деструкции, но встречаются клетки с полностью сохранившейся структурой ядерного аппарата. Нет клеток с сильно измененной формой, мембраны клеток и ядер в нормальном состоянии. Можно предположить, что деструкция носит обратимый характер.

Обсуждение. Сравнивая результаты гистологических исследований нейронов двух групп животных, подвергнутых охлаждению до температуры -9°C с адаптацией и без нее, можно сделать вывод о положительной роли предварительного охлаждения до умеренных температур перед замораживанием. Конечно, за период времени, который животные находились при температуре $2,5^{\circ}\text{C}$, не могли в полной мере произойти адаптационные перестройки, которые у моллюсков в предзимний период заключаются в изменении всего обмена веществ, понижении метаболических процессов, повышении содержания сахаров, глицерина. Идет также предзимнее накопление жиров, меняется состояние воды в тканях [7]. В течение суток подобные перестройки произойти не могли, однако охлаждение вызвало своеобразные изменения, в дальнейшем определившие большую устойчивость нервных клеток при охлаждении до температуры -9°C .

Можно предположить, что в данном случае их реакция зависела также от скорости понижения температуры на различных этапах охлаждения. Образование вакуолей, разрывы клеточной и ядерной мембраны, гомогенизация кардио- и цитоплазмы — это нарушения, которые можно назвать типичными для криодеструкции при быстром охлаждении [2]. Они вызывают физико-химические изменения структуры нервных волокон. Как показано в работе Е. В. Бурлаковой [2], в нервах крыс, кроликов, дождевого червя, краба, лягушки при охлаждении возрастает число свободно заряженных частиц, что снижает ориентационную поляризацию молекул и изменяет параметры теплового обмена, а также приводит к нарушению проводимости нервных импульсов.

Конечно, результаты, полученные на таких сравнительно легко приспособляющихся к изменению внешних условий объектах, как моллюски, нельзя полностью перенести на гомойотермных животных, нервы которых обладают более сложной и лабильной физико-химической структурой [5], что может обусловить меньшую устойчивость к замораживанию, чем у пойкилотермных. Однако факт возникновения различий в реакции на быстрое охлаждение и охлаждение после предварительной выдержки при положительной температуре ($2,5^{\circ}\text{C}$) свидетельствует о включении адаптационных механизмов даже в такой сравнительно короткий срок и является предпосылкой для дальнейших исследований реакций нервной ткани на действие охлаждения.

1. Алтер Б. А. К вопросу о повреждениях, обусловленных глубоким охлаждением человека. — В кн.: Холод и организм. Л.: 1964, с. 31—41. (Тр./Воен.-мед. акад. им. С. М. Кирова; т. 161).
2. Бурлакова В. Е., Кольс О. Р., Федоров Г. Е. Изучение электрических параметров нервов при глубоком охлаждении. — Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1966, № 2, с. 90—92.
3. Девятов В. П. Смерть от общего переохлаждения организма: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Л., 1969. — 40 с.
4. Жаботинский Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. — Л.: Медицина, 1965. — 200 с.

5. Заварзин А. А. Очерки по эволюционной гистологии нервной системы. — Избр. тр., М., 1950, т. 3, с. 18—54.
6. Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. — М.: Наука, 1967. — 73 с.
7. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. — Л.: Наука, 1972. — 288 с.
8. Майстрах Е. В. Патологическая физиология охлаждения человека. — Л.: Медицина, 1975. — 216 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Харьковский государственный университет

Поступила в редколлегию
05.09.79

УДК 57.043.62—506.72

С. И. Ткаченко, Н. Д. Кошевой, В. А. Черепнев

К ВОПРОСУ АВТОМАТИЗАЦИИ ВЫБОРА ПЛАНОВ ДРОБНОГО ФАКТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

При исследовании широкого класса объектов, в том числе при проведении криобиологических экспериментов, появляется необходимость синтеза их математических моделей, которые в дальнейшем используются для решения задач оптимизации и управления. При этом возникает проблема повышения эффективности исследований с целью получения максимума информации из эксперимента при минимальных стоимостных и временных затратах. Эта проблема решается путем обеспечения возможности работы экспериментатора в режиме диалога с вычислительной машиной и создания проблемно ориентированного математического обеспечения для решения задач автоматизации экспериментов [3].

При изучении объектов исследователю часто приходится выбирать из всего множества планов дробного факторного эксперимента (ДФЭ) заданной размерности план, обеспечивающий получение отдельных оценок коэффициентов регрессии интересующих его факторов и их взаимодействий. Решение этой задачи весьма трудоемко, так как оно сводится к многократному перебору вариантов смешивания [2]. Поэтому необходимо создание алгоритмов, обеспечивающих выбор плана ДФЭ, не прибегая к полному перебору. В настоящей работе авторами предложен алгоритм, позволяющий решить поставленную задачу выбора.

При составлении алгоритма разработаны и учитывались следующие утверждения.

Утверждение 1. Если определяющий контраст $I = X_i X_j \dots X_e X_k$ содержит в себе все индексы какого-то существенного взаимодействия $X_i X_j \dots X_e X_k$ и еще один любой индекс k , то при выборе плана ДФЭ из всего множества S план с таким генерирующим соотношением опускается.

Пример. Исследуется влияние четырех факторов X_1, X_2, X_3, X_4 на выходной параметр объекта y . Для осуществления эксперимента был выбран план ДФЭ 2^{4-1} с генерирующим соотношением $X_4 = X_2 X_3$, при этом априори известно, что взаимодействие $X_3 X_4$ существенно. Следовательно, экспериментатор допустил ошибку, так как в этом случае получается следующая система смешивания [1]:

$$\begin{aligned} b_1 &= \beta_1 + \beta_{1234}; \\ b_2 &= \beta_2 + \beta_{34}; \\ b_3 &= \beta_3 + \beta_{24}; \\ b_4 &= \beta_4 + \beta_{23}; \end{aligned} \quad (1)$$

и оценка коэффициента b_2 будет получена совместно с оценкой коэффициента при существенном взаимодействии $X_3 X_4$. Данный план ДФЭ

брать нельзя, так как определяющий контраст $I = X_2X_3X_4$ содержит все индексы существенного взаимодействия X_3X_4 и еще один индекс $k=2$.

Утверждение 2. Процесс поиска плана необходимо начинать из генерирующего соотношения, полученного приравниванием k -го фактора X_k несущественному взаимодействию $X_iX_j...X_e$ с максимальным числом индексов, и для него проверять выполнение условия утверждения 1.

Это обусловлено тем, что для большинства объектов взаимодействия высокого порядка, как правило, являются несущественными, а при таком приравнивании в систему смешивания будут входить оценки коэффициентов при взаимодействиях высокого порядка.

Утверждение 3. Если произведение всех определяющих контрастов $I_m = \prod_{z=1}^m I_z = X_iX_j...X_eX_k$ включает в себя все индексы какого-то существенного взаимодействия $X_iX_j...X_e$ и еще один любой индекс k , то выбор новой реплики путем перестановок в генерирующих соотношениях невозможен.

Пример. Дробная реплика 2^{6-3} задана генерирующими соотношениями $X_4 = X_2X_3$, $X_5 = X_1X_3$, $X_6 = X_1X_2X_3$, а взаимодействие $X_3X_4X_5$ является существенным.

При этом произведение всех определяющих контрастов $I_m = \prod_{z=1}^m I_z = X_3X_4X_5X_6$ и, следовательно, выбор новой реплики путем перестановок в генерирующих соотношениях невозможен. Действительно, если осуществить, например, следующие перестановки: $X_4 = X_1X_2X_3$, $X_5 = X_2X_3$, $X_6 = X_1X_3$, то снова получим $I_m = X_3X_4X_5X_6$.

Разработанный алгоритм I реализует процесс автоматического выбора необходимых генерирующих соотношений на основе данных о существенных и несущественных факторах и их взаимодействиях.

Алгоритм 1. В х о д. Массивы, несущие информацию о существенных и несущественных факторах и их взаимодействиях, причем взаимодействия факторов хранятся в массиве в виде числовых данных, например для первого и второго фактора — в виде 12.

В ы х о д. Массивы, в которых хранится информация о требуемых генерирующих соотношениях.

Метод. Процесс поиска осуществляется с учетом утверждения 2 путем: а) последовательного приравнивания каждому из p факторов незначимых взаимодействий; б) проверки выполнения условия утверждения 1. При этом если это условие справедливо, то берется следующее незначимое взаимодействие, если нет — происходит формирование массива определяющих контрастов. После подбора всех генерирующих соотношений определяются обобщающие определяющие контрасты и для них проверяется выполнение условия утверждения 1. Если оно не подтверждается, то формируются выходные массивы, в противном случае осуществляется проверка выполнения утверждения 3, при положительном исходе снова повторяется описанная выше процедура с использованием специальной системы поиска, а при отрицательном — реализуется по определенной системе перестановки в генерирующих соотношениях и затем выполняется процедура, начиная с этапа (б).

Укрупненная блок-схема разработанного алгоритма представлена на рисунке. Выходная информация предназначена для работы алгоритма 2, реализующего процесс автоматической генерации плана ДФЭ.

Алгоритм 2. В х о д. Массивы, в которых хранятся данные о требуемых генерирующих соотношениях.

В ы х о д. Массивы, несущие информацию о синтезированном плане ДФЭ.

Метод 1. Генерация плана полного факторного эксперимента и получение массива, в котором хранится матрица взаимодействий факторов.

1. Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. — М.: Наука, 1971. — 288 с.
2. Налимов В. В. Планирование эксперимента — взгляд в будущее. — В кн.: Планирование и автоматизация эксперимента в научных исследованиях. М.: Сов. радио, 1974, с. 18—32.
3. Тупало В. Г., Кошевой Н. Д., Грецов В. Л. Синтез математических моделей на основе итерационного планирования эксперимента. — Мат. методы анализа динам. систем, 1978, вып. 2, с. 122—127.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
26.09.79

УДК 57.043

Г. С. Лобынцева, Ю. П. Тимошенко

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ОТОГРЕВА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ

Определенные успехи, достигнутые при разработке методов низкотемпературного консервирования клеточных суспензий (эритроцитов, лейкоцитов, костного мозга, спермы и др.) путем экспериментального варьирования скоростей, согласно Мазуру [15—17], отвлекли внимание многих исследователей от фундаментальных разработок. В настоящее время, когда накоплены значительные фактические данные о механизмах криоповреждения и криозащиты биологических объектов, такой подход к выбору оптимального режима нельзя считать целесообразным. Мы полагаем, что исход криоконсервирования зависит от ряда взаимосвязанных факторов, которые имеют большое значение для успешной реализации методов низкотемпературного консервирования [1, 4].

Анализ литературы по данному вопросу показывает, что основное внимание исследователей при криоконсервировании биообъектов было направлено на подбор оптимальных скоростей замораживания, в то время как процесс отогрева считали второстепенным. Это обусловлено, с одной стороны, отсутствием технических возможностей для получения равномерного и быстрого нагрева механизмом теплопроводности, на котором основано размораживание в «водяной бане», с другой — в силу слабой изученности применения других видов энергии, способной обеспечить заданный, регулируемый процесс нагрева биообъекта.

По Мазуру [16], своеобразное сочетание скоростей охлаждения и нагрева может устранить такой, казалось бы, летальный механизм криоповреждения, как внутриклеточная кристаллизация. Это доказано также в работах Лейбо и соавт. на клетках эмбрионов мышей [11]. Сакаи и Отсука [21] на клетках паренхимы шелконицы показали, что при наличии внутриклеточной кристаллизации можно получить 100%-ное выживание при высоких скоростях отогрева. Андерсон и соавт., Маккензи, Мазур, Моор получили такую же зависимость на дрожжах [14, 19, 20]. Однако авторы в своих работах приводят, как правило, усредненное значение скоростей для всего этапа повышения температуры биообъекта [7, 9]. Менее освещен вопрос влияния скорости нагрева на сохранность клеток в различных участках температурного диапазона от -196 до $+4^{\circ}\text{C}$.

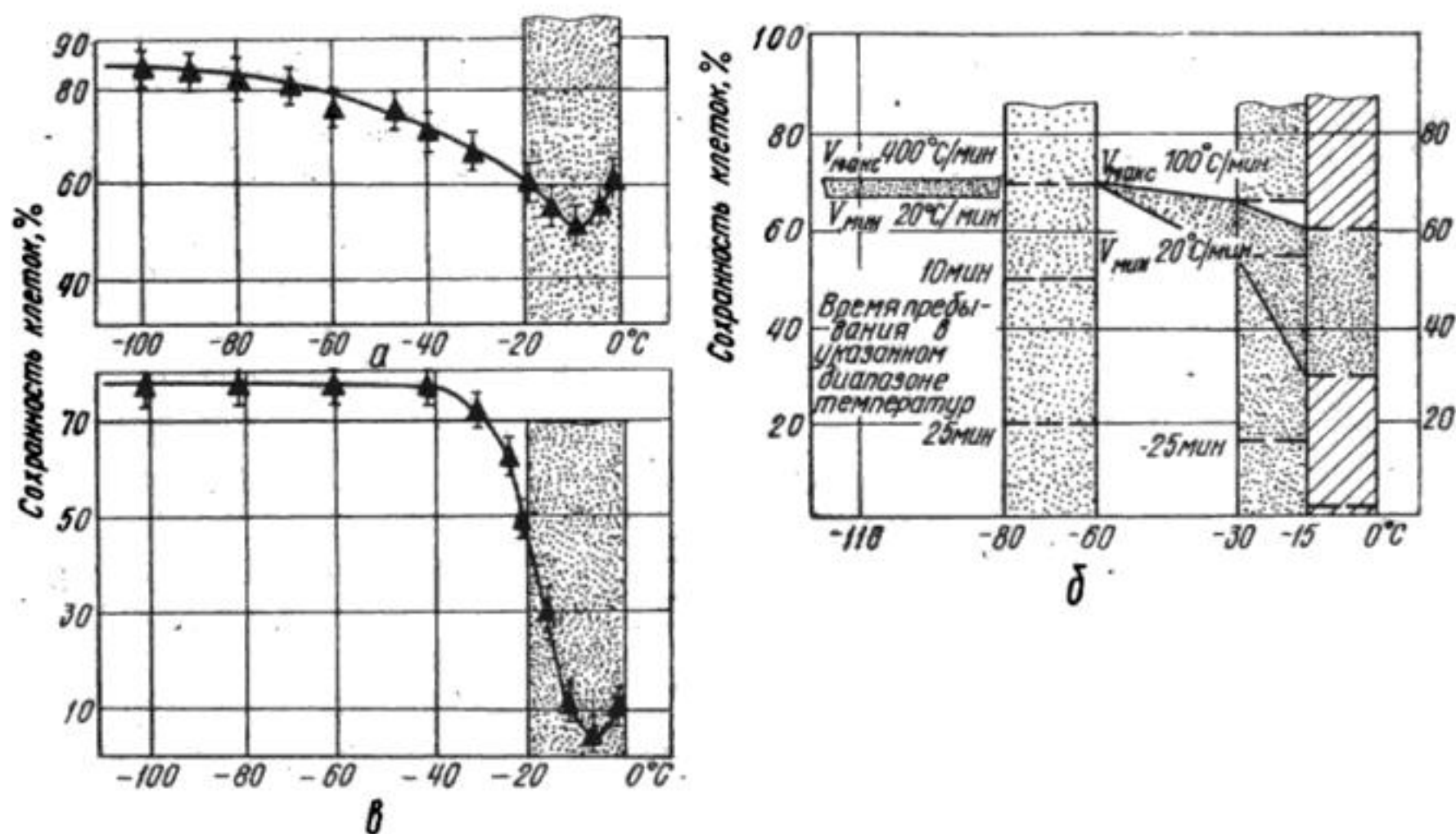
В связи с этим нами изучено влияние разных скоростей нагрева на сохранность клеток крови с целью определения интервала температур, в котором наблюдается наибольшая зависимость повреждения клеток от скорости нагрева.

Ядродержащие клетки крови человека замораживали под защитой 10%-ной концентрации ПЭО-400 по двухэтапной программе [3], эритроциты с 10 и 20%-ной концентрацией ПЭО-1500 — путем погружения в жидкий азот. При размораживании скорости нагрева в зоне твердого

состояния вещества были соответственно 10, 50, 100, 200 и 300°C/мин, в зоне фазовых превращений и в жидком состоянии — 10, 50 и 100°C/мин. Отогрев материала осуществляли с указанными скоростями от —196°C до температур —120, —100, —80, —60, —40, —20, —10, 0°C, после чего отогревали с постоянной скоростью 100°/мин до температуры +4°C. Объем размораживаемого материала составлял около 2 мл. Температура контролировалась в центре цилиндрического образца с помощью медь-константановой термопары. Изменения температуры во времени регистрировались прибором КСП-4.

В интервале температур от —196 до —40°C на лейкоцитах, замороженных с малой скоростью, исключая возможность появления внутриклеточной кристаллизации, практически не обнаружено влияния скорости нагрева на выживаемость клеток. Длительное хранение (в течение 2 ч) при температурах —70, —60°C не оказало повреждающего действия на клетки. Они сохраняли целостность цитоплазматических мембран, оставался неизменным клеточный состав популяции. Можно считать, что клетки, охлажденные медленно, успевают путем экзоосмоса выделить всю воду, способную кристаллизоваться и таким образом избежать появления внутриклеточной кристаллизации. Морфологический анализ образцов показал лишь в незначительной части клеток явные признаки деструкции — вакуолизацию цитоплазмы, сморщивание клеток, скопление нитей хроматина на одном из полюсов ядра, разрыв клеточной мембраны. При электронно-микроскопическом исследовании отмечалась незначительная гипертрофия эндоплазматического ретикула сегментоядерных нейтрофилов. Однако не ясно, какая доля повреждения клеток обусловлена изменениями в процессе отогрева, какая — в процессе замораживания.

В зоне температур выше —70° при нагреве со скоростью менее 50°C/мин количество клеток уменьшалось тем больше, чем дольше образец выдерживался при указанных температурах. Так, при температуре —30°C достаточно было 10 мин, чтобы потеря клеток возросла вдвое.



Влияние скорости отогрева на сохранность клеток крови:

а — лейкоциты, замороженные с 10%-ным ПЭО-400; б — эритроциты с 10%-ным ПЭО-1500; в — эритроциты с 20%-ным ПЭО-1500.

Если скорость в данном температурном интервале повысить до 100° и более в 1 мин, то основная часть клеток остается без значительных морфологических и субмикроскопических изменений (рисунок, а).

Максимальные повреждения клеток наблюдались при прохождении

интервала температур от -30 до 0°C , в котором можно ожидать развитие тех повреждений, которые Мазур [19] относит к «эффекту растворов». Повреждающий эффект возрастал от понижения скорости нагрева и от продолжительности воздействия и был обусловлен плавлением эвтектических смесей с высокой концентрацией солей и криопротекторов, в которых расположены клетки, вытесненные сюда кристаллами льда в процессе медленного охлаждения. Морфологически лейкоциты были сильно изменены: встречалось большое количество гранулоцитов с вакуолизированными ядрами и цитоплазмой, с разрывами клеточной мембраны, фрагментацией ядер, а также голые ядра.

Изучение лейкограмм показало значительное уменьшение зрелых гранулоцитов при небольшом увеличении лимфоцитов. При электронномикроскопическом анализе обнаружено большое количество клеток с полностью разрушенной ультраструктурой и частично поврежденных клеток с разрывами плазматической мембраны, увеличением перинуклеарного пространства. Описанные повреждения появлялись за небольшой промежуток времени. Так, выдержка образцов в течение 5—10 мин при температуре от -15 до -10°C приводит почти к полной гибели клеток.

Для клеток, охлажденных с большой скоростью, когда на этапе замораживания повреждающее действие растворов сведено к минимуму, появляется вероятность возникновения внутриклеточной кристаллизации. Мазур [18] предполагал, что повреждения в данном случае могут развиваться при оттаивании из-за механических разрывов. Однако для подтверждения этой гипотезы имеется мало данных [7, 8, 10, 11]. Действительно, при криоконсервировании эритроцитов, замороженных с ПЭО-1500 10%-ной концентрации, нами обнаружено существенное снижение количества клеток при отогреве с малой скоростью в интервале температур от -80 до -60°C , его не наблюдается при криоконсервировании лейкоцитов (рисунок, а). Повреждающий эффект возрастает с увеличением экспозиции клеток при данной температуре. Повышение концентрации криопротектора до 20% почти полностью устраняет повреждения, возникающие в этом отрезке температур (рисунок, б).

Наибольшие повреждения эритроцитов в наших экспериментах отмечены, как и для лейкоцитов, при отогреве с малой скоростью от -30 до 0°C . Поскольку ПЭО-1500 — достаточно крупный гетерополимер, практически не проникающий внутрь клетки, его ограждающее действие, по-видимому, заключается в стабилизации плазматических мембран. Лавлок [12, 13] в опытах на эритроцитах показал, что изменения на мембранах вызывает не повышение концентрации внеклеточной соли, что считали основным фактором повреждения, а явления, связанные с повышением осмолярности суспензирующего раствора, дальнейшим обезвоживанием клеток и уменьшением объема. Чем длительнее пребывание в среде с повышенной осмолярностью, тем меньше вероятность выживания клетки.

Таким образом, нами выявлены наиболее опасные интервалы температур для клеток, замороженных с различными скоростями, и установлено, что повышение концентрации криопротектора может устранить один из механизмов повреждения в температурной зоне от -80 до -60°C , а именно рекристаллизацию для клеток, у которых возможна внутриклеточная кристаллизация при быстром замораживании.

Второй повреждающий фактор — «эффект растворов», наблюдаемый нами в диапазоне от -30 до 0°C , можно исключить путем повышения скорости отогрева. При оптимальном соотношении $V_3/V_0 \geq 1$ можно значительно снизить концентрацию криопротектора [2, 5, 6].

Проведенные исследования по изучению влияния скорости нагрева на сохранность клеток крови показали, что в процессе размораживания клетка подвергается различным по степени воздействия повреждающим факторам, при этом величина оптимальной скорости нагрева, при

которой повреждения клеток минимальны, изменяется и лежит в пределах от 50 до 100°/мин.

Показанная зависимость выживаемости от скорости замораживания-отогрева еще раз подчеркивает, что при выборе оптимального режима криоконсервирования необходимо проведение экспериментов по одновременной отработке всех этапов процесса.

1. Каухчешвили Э. И., Страневский А. А., Королюк К. И. Некоторые вопросы низкотемпературной консервации эритроцитов. — В кн.: Тез. докл. 12 Междунар. конгр. по переливанию крови. М., 1969, с. 375.
2. Недельский Г. Т., Рождественская М. А., Михнович Е. П. и др. Разработка оптимальных режимов криоконсервирования эритроцитов. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 164—167.
3. Пушкарь Н. С., Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А. Низкотемпературное консервирование лимфоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1974, № 7, с. 23—26.
4. Пушкарь Н. С., Лобынцева Г. С., Полякова А. И. и др. Разработка оптимальных режимов программного замораживания лейкоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, № 8, с. 8—13.
5. Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Пахомова И. С. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. V. Комбинированный способ размораживания биологических объектов. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 73—76.
6. Тимошенко Ю. П., Пахомова И. С. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. I. Диэлектрические характеристики крови и ее фракций в диапазоне СВЧ. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 44—47.
7. Bank H., Mazur P. Relations between ultrastructure and viability in frozen-thawed chinese hamster tissue culture cells. — Exp. Cell. Res., 1972, 71, N 2, p. 441—456.
8. Farrant J., Walter C. A. Freezing injury cells. — Proc. Roy. Soc. Med., 1976, 69, N 8, p. 559—560.
9. Farrant J., Walter C. A., Knight S. C. Cryopreservation and selection of cells. — Colloq. Inst. nat. sante et rech. med. Cryoimmunologie, INSERM, 17—19 June 1976 / Eds D. Simatos, D. M. Strong and J. M. Turc, 1977, 62, p. 61—78.
10. Leibo S. P., Farrant J., Mazur P., Hanua M. G., Smith L. H. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: Interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose or glycerol. — Cryobiology, 1970, 6, N 2, p. 315—332.
11. Leibo S. P. Nucleation temperatures of intracellular ice formation in mouse ova. — Cryobiology, 1976, 13, N 6, p. 310—318.
12. Lovelock J. E., Bishop M. W. H. Physical instability and thermal shock in red cells. — Nature, 1954, 173, N 5, p. 659—661.
13. Lovelock J. E. The physical instability of human red blood cells. — Biochem. J., 1955, 60, N 4, p. 642—696.
14. Mackenzie A. P. Death of frozen yeast in the course of slow warming. — In: The frozen cell / Eds G. E. V. Wolstenholme and MacVe O'Conner. London: Churchill, 1970, p. 89—96.
15. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. — J. Gen. Physiol., 1963, 47, N 2, p. 347—369.
16. Mazur P., Farrant J., Leibo S. P., Chu E. H. Y. Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing interactions between protective solutes and cooling and warming rates. — Cryobiology, 1969, 6, N 1, p. 1—9.
17. Mazur P., Miller R. H. Effect of macromolecules on the ability of water to supercool. — Abstr. 14th Ann. Meet. Biophys. Soc. N. Y., 1970, p. 230a.
18. Mazur P., Leibo S. P., Miller R. H. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures. — J. Membran. Biol., 1974, 15, p. 107—136.
19. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. — Cryobiology, 1977, 14, N 3, p. 251—272.
20. Moor H. Die Gefrier Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronmikroskopie. — Z. Zellforsch. Microsk. Anat., 1964, 62, p. 546—580.
21. Sakai A., Otsuka K. Survival of plant tissue at superlow temperatures. V. An electron microscopic study of ice in cortical cells cooled rapidly. — Plant. Physiol., 1967, 42, p. 1680—1694.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
21.03.79

Н. С. Пушкарь, В. И. Вишневский, О. И. Гордиенко

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ КОЛЕБАНИЙ НА ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Во время низкотемпературного консервирования клетки подвергаются воздействию таких физико-химических процессов, как обезвоживание, экспозиция в гипертонических средах, деформация мембранных структур, механическое взаимодействие с кристаллами льда, рекристаллизация и другие [14]. Влияние на особенности протекания физико-химических процессов на этапах криоконсервирования с помощью определенных физических воздействий открывает новые возможности при подборе оптимальных условий замораживания. В частности, обработка образца ультразвуковыми колебаниями в период замораживания оказывает влияние на процесс кристаллизации [6], усиливая или ослабляя связанные с ним повреждения. Вместе с тем, непосредственно взаимодействуя с клетками, ультразвук способен обратимо изменять их параметры, а также особенности тепломассообмена клеток с окружающей средой.

Действие ультразвуковых колебаний на биологические объекты зависит от параметров ультразвука (интенсивности, частоты, экспозиции), индивидуальных свойств клеток (размеров, проницаемости и структуры мембран) и характера озвучиваемой среды (вязкости, температуры). При больших интенсивностях ультразвука оно может проявляться в разрушении биологических структур [1]. После определенного порогового значения мощности ультразвука летальное действие прекращается [7, 12]. Обнаружено также стимулирующее действие ультразвука на физиологические процессы, протекающие в клетках, например стимуляция роста и отделения почек дрожжей [8], интенсификация роста и развития семян [13], активизация движения и увеличение переживаемости сперматозоидов [3].

Применение ультразвука в биологии и медицине интересно и полезно прежде всего в области положительного влияния. Особого внимания заслуживают работы по влиянию ультразвука на проницаемость плазматических мембран клеток [4]. Цель нашей работы — использование ультразвука при низкотемпературном консервировании эритроцитов человека и выявление его влияния на некоторые криобиологические процессы.

Исследования проводили на эритроцитах, выделенных из донорской крови человека, взятой на консервирующем растворе ЦОЛИПК-76. Озвучивание суспензии эритроцитов осуществляли в термостатируемой кювете. Температура образцов поддерживалась в пределах 20—25°C. Озвучиваемый объем составлял 10 мл, время озвучивания — 10 мин. Исследовали влияние ультразвука на частоте 880 кГц (установка УТП-1) и 2640 кГц (установка УТП-3М) с переменной интенсивностью от 0,1 до 3 Вт/см².

В качестве криопротектора использовали полиэтиленоксид с молекулярной массой (M_v) 1500 и глицерин в 10%-ной концентрации. Образцы замораживали в жидком азоте со скоростью 350°/мин. Охлаждение контролировали по термограммам. Замороженные образцы отогревали в водяной бане при температуре 40°C.

Степень повреждения размороженных эритроцитов оценивали по количеству свободного гемоглобина в надосадочной жидкости и по отношению концентраций ионов калия внутри и вне клеток. Концентрацию ионов калия измеряли потенциометрическим методом с помощью высокоспецифичного калиевого электрода [9]. Концентрацию свободного гемоглобина определяли по методу М. А. Рождественской [10].

Изучение влияния интенсивности ультразвуковой обработки эритроцитов в период экспозиции в криозащитной среде является частью исследования, проводимого по ортогональному плану главных эффектов типа $2^n 3^m$ в 27 опытах [11]. Искали регрессионные зависимости показателей функционального состояния эритроцитов от варьируемых факторов в виде

$$y_1 = b_0 + \sum_{i=1}^8 (b_i x_i + b_{ii} z_i) + b_{10} z_{10},$$

$$y_2 = b'_0 + \sum_{i=1}^8 (b'_i x_i + b'_{ii} z_i) + b'_{10} z_{10},$$

где y_1 — отношение концентраций ионов калия внутри и вне клеток, y_2 — концентрация свободного гемоглобина.

Оценку воспроизводимости опытов проводили по критерию Корхена G , в проведенном опыте $G_{\text{расч}} = 0,29$ для y_1 , $G_{\text{расч}} = 0,362$ для y_2 и меньше табличного для уровня достоверности $p = 0,95$ ($G_{\text{табл}} = 0,471$). Адекватность модели оценивали по критерию χ^2 , вычисляемому по формуле Брандта и Снедекора. Согласие между расчетными и экспериментальными данными хорошее:

$$\chi^2_{\text{расч}} = 7,6 < \chi^2_{\text{табл}} = 12,2 \text{ для } P = 0,99.$$

Полученные регрессионные зависимости уровня свободного гемоглобина и отношения концентраций внутри- и внеклеточного калия от интенсивности ультразвукового воздействия представлены на рис. 1 и 2. Из ана-

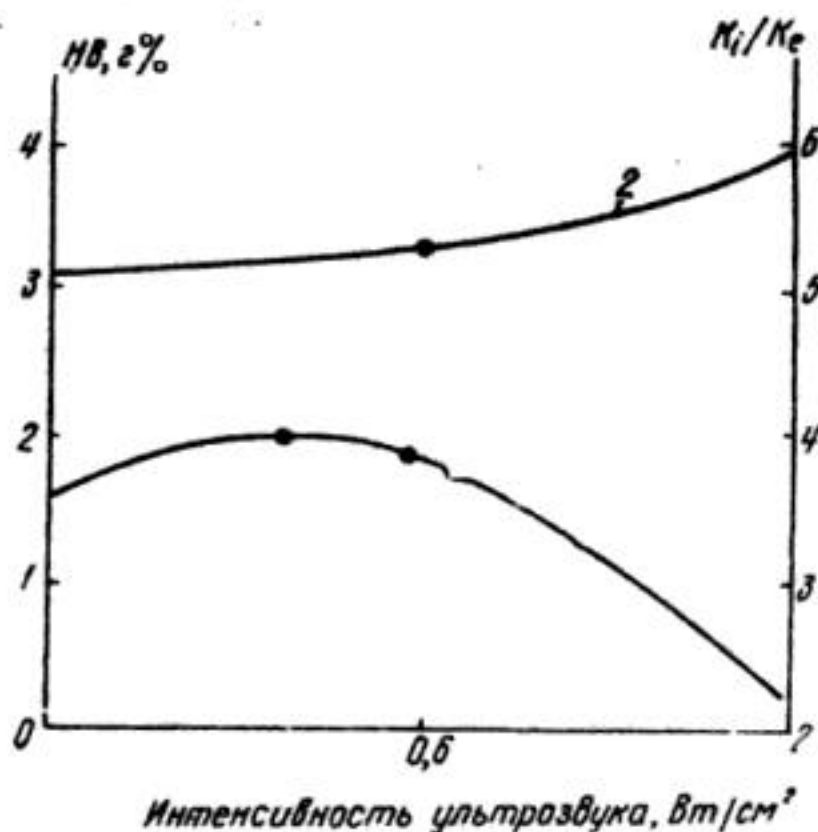


Рис. 1. Зависимость концентрации свободного гемоглобина (Hb) (1) и отношения концентраций внутри- и внеклеточного калия (K_i/K_e) (2) в деконсервированной суспензии эритроцитов от интенсивности ультразвуковой предобработки на частоте 880 кГц.

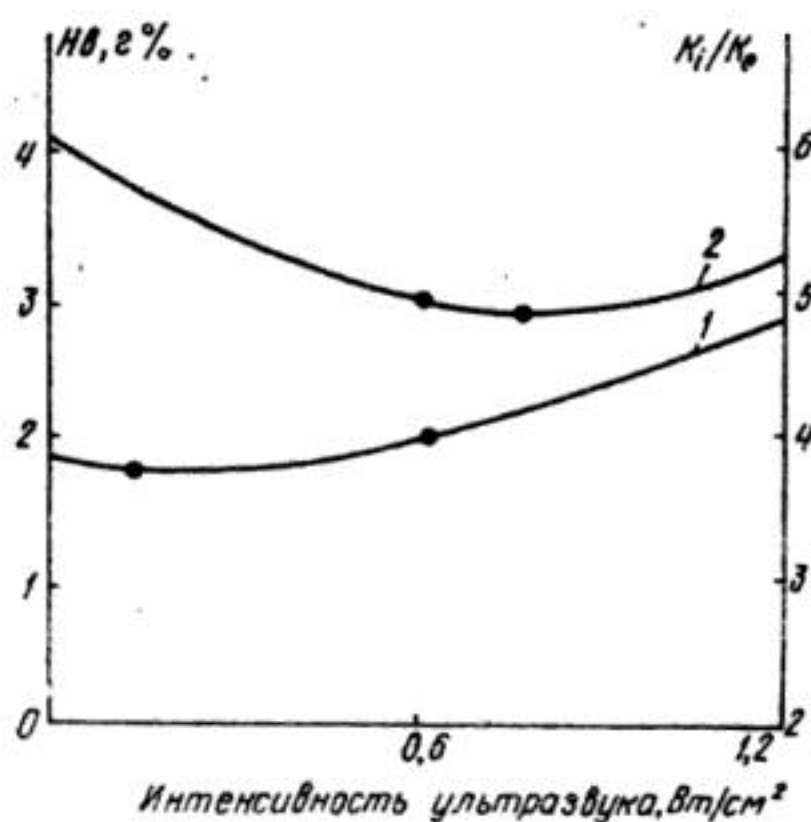


Рис. 2. Зависимость концентрации свободного гемоглобина (Hb) (1) и отношения концентраций внутри- и внеклеточного калия (K_i/K_e) (2) в деконсервированной суспензии от интенсивности ультразвуковой предобработки на частоте 2640 кГц.

лиза результатов эксперимента следует, что ультразвуковая обработка эритроцитов, находящихся в контакте с криопротектором (полиэтиленоксид или глицерин), на частоте 880 кГц повышает устойчивость эритроцитов к последующему низкотемпературному консервированию. При малых интенсивностях ультразвука (до $0,4 \text{ Вт/см}^2$) не наблюдается улучшения характеристик деконсервированной крови. Дальнейшее уве-

лишение интенсивности влечет за собой достоверное уменьшение гемолиза на 75% и увеличение соотношения концентраций ионов внутри- и внеклеточного калия на 15% при интенсивности 1,2 Вт/см². Обе характеристики ведут себя согласованно во всем исследуемом диапазоне интенсивностей (см. рис. 1).

Озвучивание эритроцитов в период экспозиции в криозащитной среде на частоте 2640 кГц было менее благоприятно. За незначительным минимумом гемолиза при интенсивности 0,13 Вт/см² следовал заметный рост концентрации свободного гемоглобина в деконсервированной суспензии. По мере увеличения интенсивности ультразвука калиевое отношение падает вплоть до интенсивности 0,8 Вт/см², после чего несколько стабилизируется (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что ультразвуковая предобработка на частоте 880 кГц повышает устойчивость эритроцитов человека к последующему низкотемпературному консервированию. Частота 2640 кГц не оказывает подобного положительного действия при тех же условиях.

1. Берштейн С. А. Зміна гемолітичної стійкості еритроцитів під впливом ультразвукового опромінення. — Фізіол. журн., 1962, 8, № 2, с. 238—242.
2. Вишневский В. И., Марющенко А. В. Стимуляция переживаемости спермы быков ультразвуковыми колебаниями. — В кн.: Физико-химические основы действия физических факторов на живой организм и его антиокислительные системы. М., 1974, с. 54—57.
3. Вишневский В. И., Марющенко А. В. А. с. 494163 (СССР). Способ консервирования биологической жидкости. — Оpubл. в Б. И., 1975, № 45.
4. Гусаров С. Г. О введении лекарственных веществ с помощью ультразвука: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Одесса, 1963. — 13 с.
5. Иллюхин В. В., Цюпа В. И., Титов В. И., Ермаков Ю. П. А. с. 395060 (СССР). Способ замораживания пищевых продуктов и биопрепаратов. — Оpubл. в Б. И., 1973, № 35.
6. Капустин А. П. Влияние ультразвука на кинетику кристаллизации. — М., 1962.
7. Комолова Г. С. Современное состояние вопроса о механизме действия ультразвука на одноклеточные. — В кн.: О химическом и биологическом действии ультразвука. Красноярск, 1962, с. 84—93.
8. Комолова Г. С., Грачева Н. П. Стимулирующее действие ультразвука высоких частот на размножение дрожжевых клеток. — Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. наук, 1964, 1, № 4, с. 56—58.
9. Никольский В. Л., Матерова Е. А., Грекович А. А., Юринская В. Е. Пленочный калиевый электрод на основе валиномицина. — Журн. аналит. химии, 1974, 29, вып. 2, с. 205—209.
10. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови. — В кн.: Актуальные вопросы переливания крови. М.: Медгиз, 1955, с. 55—56.
11. Рохвагер А. Е., Шевяков А. Ю. Математическое планирование научно-технических исследований. — М.: Наука, 1975. — 440 с.
12. Эльпинер И. Е. Биофизика ультразвука. — М.: Наука, 1973. — 384 с.
13. Gordon A. G. Beneficial effects of ultrasound on plants. — Ultrasonics, 1971, 9, N 2, p. 88—94.
14. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. — Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol., 1965, 24, p. 175—180.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
28.09.79

А. А. Мартыненко, В. И. Луговой

ВЛИЯНИЕ ПЭО-1500 И НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ИЗООСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Применение ПЭО-1500 в качестве криопротектора при низкотемпературной консервации эритроцитов человека показало, что деконсервированные клетки остаются структурно устойчивыми в присутствии полиэтиленоксида [2]. Однако полиэтиленоксиды (полиэтиленгликоли) дестабилизируют мембраны птичьих эритроцитов, на чем основано получение гетерокарионов [4]. В связи с этим целесообразно дальнейшее изучение влияния полимерных ПЭО и низких температур на свойства клеток, в частности их структурное состояние после переноса из растворов криопротектора в изотонические растворы, в которых нативные эритроциты не подвергаются гемолизу в течение некоторого времени. Простой и информативный тест на гемолиз был использован нами для оценки структурной стабильности криоконсервированных в ПЭО-1500 эритроцитов.

Экспериментальным материалом служила донорская кровь человека в среде ЦОЛИПК-76, которая отстаивалась в течение 24 ч при температуре $+7^{\circ}\text{C}$, после чего плазму удаляли декантацией. Эритромассу (100 мл) смешивали с равным объемом 40%-ного ПЭО-1500 в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,4) и выдерживали 60 мин при температуре 20°C . Образцы замораживали в металлических контейнерах объемом 300 мл при быстром погружении в жидкий азот. Деконсервацию материалов проводили в водяной бане при температуре 42°C в течение 90 с, затем эритромассу центрифугировали (100 г, 10 мин, 2°C). Надосадочный слой, содержащий 20% ПЭО-1500, удаляли. В последующих опытах использовали осадки деконсервированных эритроцитов, гемолиз которых в криопротекторной среде не проявлялся в значительной мере.

Осадки эритроцитов суспендировали в изотонических (310 мосм) растворах хлористого натрия, хлористого магния, сернокислого натрия, сернокислого магния, уксуснокислого натрия, уксуснокислого магния, глюкозы, сахарозы и маннитола при рН 7,4—7,6, доведенном углекислым натрием. Соотношение объемов осадка и раствора составляло 1 : 3. Клеточные суспензии выдерживали в течение 30 мин при температуре 25°C , периодически перемешивая, и центрифугировали (100 г, 20 мин, 2°C). Надосадочные слои (гемолизаты 1) отбирали шприцем и использовали в анализах на содержание гемоглобина. Осадки клеток ресуспендировали в указанных изотонических растворах при соотношении их объемов соответственно 1 : 10 и, соблюдая отмеченный порядок операций, получали гемолизаты 2. В гемолизатах 1, 2 определяли содержание гемоглобина спектрофотометрически [5]. В контрольных опытах определяли степень гемолиза донорских эритроцитов, заготовленных на среде ЦОЛИПК-76, после помещения их в исследуемые изотонические растворы. Во всех случаях выход гемоглобина из клеток не наблюдался. Результаты опытов выражали в процентах гемоглобина к общему его количеству в исследуемом образце эритроцитов и обрабатывали статистически.

Из таблицы видно, что гемолизаты 1 содержат 33—51% гемоглобина деконсервированных эритроцитов. В данном случае клетки подвергались действию относительно низких концентраций ($<2\%$) ПЭО-1500 и компонентов изотонических растворов. При повторных экспозициях клеток в свежих порциях изотонических растворов, где концентрация ПЭО-1500 существенно снижалась ($<0,2\%$), в гемолизаты 2 пе-

реходит 12—23% клеточного гемоглобина. Наиболее значительный гемолизирующий эффект проявляется в растворах хлористых и сернокислых солей, менее — в растворах сахарозы, глюкозы и маннитола. Изотонический гемолиз исследованных клеток не предотвращается магнием и зависит скорее всего от электрохимических свойств анионов.

Гемолиз деконсервированных эритроцитов в девяти простых физиологических средах (чего не наблюдается в отношении контрольных эритроцитов) несомненно свидетельствует об их структурной неполноценности, степень выраженности которой может, конечно, варьировать в зависимости от возрастного и физиологического статуса клеток.

Известно, что в процессе постгипертонического гемолиза нарушаются ионное равновесие, поверхностный потенциал, коллоидные свойства и проницаемость мембран эритроцитов [6, 10]. Однако ПЭО-1500 в 20%-ной концентрации несущественно превышает изотонический уровень [3], и его влияние на эритроциты при их криоконсервации следует, видимо, оценивать с позиций взаимодействия криопротектора с клеточными структурами.

Химические механизмы дезинтеграции мембран полиэтиленгликолями в некоторой степени изучены при слиянии эритроцитов с другими клетками [4—9]. Под воздействием ПЭГ-1500 в минимальной концентрации (10 мМ) существенно снижается поверхностный потенциал эритроцитов [7]. На примере He p-2 клеток, инкубированных в 20%-ном ПЭГ-1000, отмытых и перенесенных в среду Игла, показано, что полиэтиленгликоль вызывает образование на поверхности плазматических мембран конденсированных белково-углеводных структур [10].

Таким образом, физико-химическая модификация плазматических мембран под влиянием ПЭО сводится к тому, что силы взаимодействия между молекулами лабилизируются, белково-углеводные структуры перемещаются и агрегируют, заряды фосфолипидов нейтрализуются, а проницаемость мембран увеличивается [1].

В условиях замораживания под влиянием сложных физико-химических процессов, прежде всего дегидратации, а также вследствие включения ПЭО в межмолекулярные взаимодействия может существенно усиливаться дестабилизация клеточных мембран. В результате этого структурная устойчивость эритроцитов в той или иной степени может снижаться, особенно в простых по составу изотонических растворах.

Такого рода среды, однако, не являются физиологически оптимальными и с их помощью, видимо, не выявляется в полной мере криопротекторная активность ПЭО-1500 в условиях низких температур. В связи с этим представляют интерес дальнейшее углубление исследований криозащитных свойств полиэтиленоксидов, а также оптимизация условий тестирования структурной и функциональной сохранности деконсервированного материала.

Влияние ПЭО-1500 и низких температур на структурную устойчивость эритроцитов в солевых и несолевых изотонических растворах

Вещества в растворах, 310 мосм	Гемоглобин, процент к общему количеству		
	Гемолизат 1 п-4	Гемолизат 2 п-4	Клеточный остаток п-4
NaCl	45 ± 3,2	23 ± 1,1	32 ± 1,2
MgCl ₂	51 ± 2,8	21 ± 3,1	28 ± 1,0
Na ₂ SO ₄	47 ± 1,9	20 ± 0,9	33 ± 2,2
MgSO ₄	49 ± 3,8	19 ± 1,1	32 ± 1,4
NaOOCCH ₃	43 ± 3,2	20 ± 1,4	37 ± 1,9
Mg(OOCCCH ₃) ₂	43 ± 1,5	18 ± 1,2	39 ± 0,8
Глюкоза	41 ± 2,8	16 ± 2,1	43 ± 1,7
Сахароза	33 ± 2,7	12 ± 1,3	55 ± 1,4
Маннитол	39 ± 2,1	15 ± 0,8	46 ± 2,5

1. Осипенко А. П., Белоус А. М., Лишко А. К. Изменение проницаемости мембран эритроцитов после замораживания в присутствии полиэтиленоксида и глицерина. — Укр. биохим. журн., 1978, 50, № 3, с. 364—367.
2. Шраго М. И., Бредихина Л. П., Тимченко В. Г. и др. Полиэтиленоксиды в низкотемпературном консервировании эритроцитов (некоторые итоги и перспективы). — Кробиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 38—45.
3. Шраго М. И., Карева Л. В., Бредихина Л. П. О гемолизирующем и противогемолитическом действии криопротекторов. — В кн.: Механизмы криповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 95—99.
4. Ahkong Q. F., Howell J. J., Lucy J. A. et al. Fusion of hen erythrocytes with yeast protoplast induced by polyethylene glycol. — Nature (London), 1975, 255, N 1, p. 66—67.
5. Dodge J. T., Mitchel W. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. — Arch. Biochem. and Biophys., 1963, 100, N 1, p. 119—130.
6. Farrant J., Woolgar A. E. Human red cells under cell hypertonic conditions. — Cryobiology, 1972, 9, N 1, p. 9—15.
7. Hartmann J. X., Galla J. D., Kao K. N. et al. Rapid fusion of blood cells from avian and mammalian species as high frequencies and viability with polyethylene glycol. — Fla Sci., 1974, 37, Abstr., p. 31.
8. Maggio B., Ahkong Q. F., Lucy J. Polyethylene glycol, surface potential and cell fusion. — Biochem. J., 1976, 158, N 1, p. 647—650.
9. McCammon J., Fan V. S. The effect of polyethylene glycol on cell membranes of Hep-2 cells. — In Vitro, 1977, 13, N 3, p. 394—395.
10. Woolgar A. E. Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose. — Cryobiology, 1974, 11, N 1, p. 44—51.

Институт проблем кробиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегия
10.09.79

УДК 57.043.621.3.029

Б. А. Скорняков, В. И. Вишневский, Л. К. Стусь,
Э. И. Обозная, О. И. Гордиенко

ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ

Влияние магнитного поля изучается на различных уровнях организации: от организменного до молекулярного [5, 6, 8], при широких вариациях параметров поля и условий омагничивания. В частности, ряд авторов показали, что постоянное магнитное поле (ПМП) — биологически активно [4, 20, 25]. Так, ПМП может изменять реакцию оседания эритроцитов [3, 11, 21], увеличивать вязкость крови [1], влиять на многие стороны жизнедеятельности бактерий [14]. При этом эффект поля зависит от физиологического состояния клеточной популяции и длительности омагничивания. Показано стимулирующее действие ПМП на разные обменные процессы, происходящие в клетках, а также на состояние клеточных мембран и активность ферментов [4, 7, 19].

Опубликованы работы, свидетельствующие о влиянии ПМП на консервированную кровь [14]. Поле напряженностью 5000 Э может повышать суммарную стойкость эритроцитов с достоверным различием на 7-е, 35-е, 49-е и 63-и сут консервации [15].

М. Г. Ковалевым показано [9], что выдерживание спермы быков в магнитном поле увеличивает абсолютный показатель переживаемости с $97,8 \pm 5,2$ до $130,1 \pm 5,6$ условных единиц. Оплодотворяющая способность спермы при этом возрастает. Магнитная обработка может влиять на кристаллизацию воды, изменяя структуру льда, форму и размер кристаллов [2]. Изложенное выше позволяет предположить возможность использования ПМП при низкотемпературном консервировании клеток крови для улучшения их сохранности.

Цель наших исследований — изучить действие ПМП на сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании. Исследования проводили в несколько этапов. На первом этапе изучалось влияние ПМП напряженностью 2000 Э, действующее в течение 30 мин на реакцию оседания эритроцитов, консервированных в растворе ЦОЛИПК-7⁶. На втором этапе был поставлен трехфакторный эксперимент для выяснения оптимальных условий омагничивания перед замораживанием.

Изучали эритроциты донорской крови, взятой на среду ЦОЛИПК-7⁶. От момента получения до проведения эксперимента кровь хранили в течение суток, причем первую половину времени — при комнатной температуре, а вторую — при +4°C. Перед экспериментом повышали концентрацию эритроцитов путем центрифугирования.

Контрольное и опытное замораживание суспензий эритроцитов осуществляли погружением ампул с кровью в жидкий азот. Для защиты клеток от криоповреждений в суспензию добавляли в соотношении 1 : 1 полиэтиленоксид с молекулярной массой (M_m) М-1500 так, чтобы конечная концентрация его в суспензии была 10%.

Методический подход в исследованиях был основан на проведении экспериментов при дефиците криопротектора в суспензии. Снижение концентрации криопротектора усугубляет действие процесса замораживания, в результате чего контрольный уровень сохранности клеток уменьшается. Это позволяет быстрее и лучше выявить стимулирующий эффект омагничивания и изучить все его особенности.

Суспензии замораживали малыми объемами по 1,5—2 мл в полиэтиленовых ампулах и большими объемами по 50 мл в алюминиевых контейнерах. Отогрев проводили в водяной бане при +40°C. Омагничивание осуществляли в постоянном магнитном поле напряженностью 2000 Э в процессе эквilibрации и замораживания.

На первом этапе работы оценку исходного состояния эритроцитов проводили по реакции оседания (РОЭ). Особенность методики заключалась в том, что суспензию эритроцитов до омагничивания центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, затем смешивали в соотношении 1 : 2 омагниченный центрифугат и неомагниченную плазму и в этой системе определяли РОЭ.

Оценку целостности и жизнеспособности эритроцитов после замораживания-отогрева проводили по определению количества свободного гемоглобина в суспензии методом М. А. Рождественской [17] и по количеству внеклеточного калия, который определяли полярографическим методом. Технология изготовления электрода аналогична предложенной в работе [10].

Осмотическую хрупкость клеток в 0,6%-ном растворе NaCl оценивали по методике ЦНИИГПК.

Эти методики позволяют в достаточной мере судить и о морфофункциональном состоянии эритроцитов. Функциональная активность эритроцитов определялась также по содержанию реакционно-способных SH-групп [23]. Количественная оценка содержания последних проводилась по Астальди и Верга [22]. Тиоловые группы играют большую физиологическую роль, поскольку с их наличием связано осуществление процессов дыхания, окислительного фосфорилирования. Энергия в живых клетках помимо АТФ и АДФ запасается в виде соединений, содержащих SH-группы, через образование макроэргической тиоэфирной связи. Увеличение уровня тиольных групп характеризует повышение уровня энергетических процессов.

В этих исследованиях замораживание осуществлялось как без применения защитных сред, так и на фоне криопротектора — полиэтиленоксида M_m 1500 в 10%-ной конечной концентрации. Результаты исследований обработаны с помощью методов математической статистики.

В результате исследований образцов крови после действия магнитного поля получены следующие значения скорости оседания эритроцитов: в контроле — $14 \text{ мм/ч} \pm 2,69 \text{ мм/ч}$; в опыте, после 30-минутной обработки эритроцитомассы в ПМП — $15 \text{ мм/ч} \pm 2,76 \text{ мм/ч}$.

Как следует из полученных результатов, достоверных изменений в реакции оседания эритроцитов под действием ПМП не наблюдалось. Следовательно, электрические свойства клеток и параметры окружающей их среды не претерпевают существенных изменений, что позволяет использовать такие условия воздействия для достижения биологического эффекта при низкотемпературном консервировании.

Для определения оптимальных условий омагничивания поставлен трехфакторный эксперимент [18], позволивший выяснить влияние времени и температуры эквilibрации эритроцитов в ПМП, а также концентрации криопротектора на сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании. Пределы варьирования факторов следующие: время эквilibрации — 15 мин — 90 мин, конечная концентрация криопротектора — $5\% \div 10\%$, температура эквilibрации — от $+20$ до 0°C . Замораживание осуществляли в алюминиевых контейнерах емкостью 50 мл.

На основании результатов полного трехфакторного эксперимента искали математическое описание рассматриваемого процесса в виде уравнения регрессии:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + \dots$$

На основе расчета коэффициентов регрессии получены следующие уравнения:

$$y_1 = 3334 - 2851 x_2,$$

где x_2 — концентрация криопротектора; y_1 — функция отклика по гемоглобину; $y_2 = 0,273 - 0,095 x_2$; y_2 — функция отклика по осмотической устойчивости.

Полученные уравнения неадекватны. Следовательно, изученные вариации условий омагничивания не влияют на степень гемолиза и осмотическую резистентность эритроцитов после замораживания - оттаивания, т. е. не обладают стимулирующим или угнетающим действием.

В дальнейшем изучали влияние омагничивания, осуществляемого в процессе эквilibрации и замораживания в ПМП напряженностью 2000 Э и временем действия 30 мин, на сохранность эритроцитов при замораживании в контейнерах объемом 50 мл. Определяли количество свободного гемоглобина и осмотическую хрупкость клеток

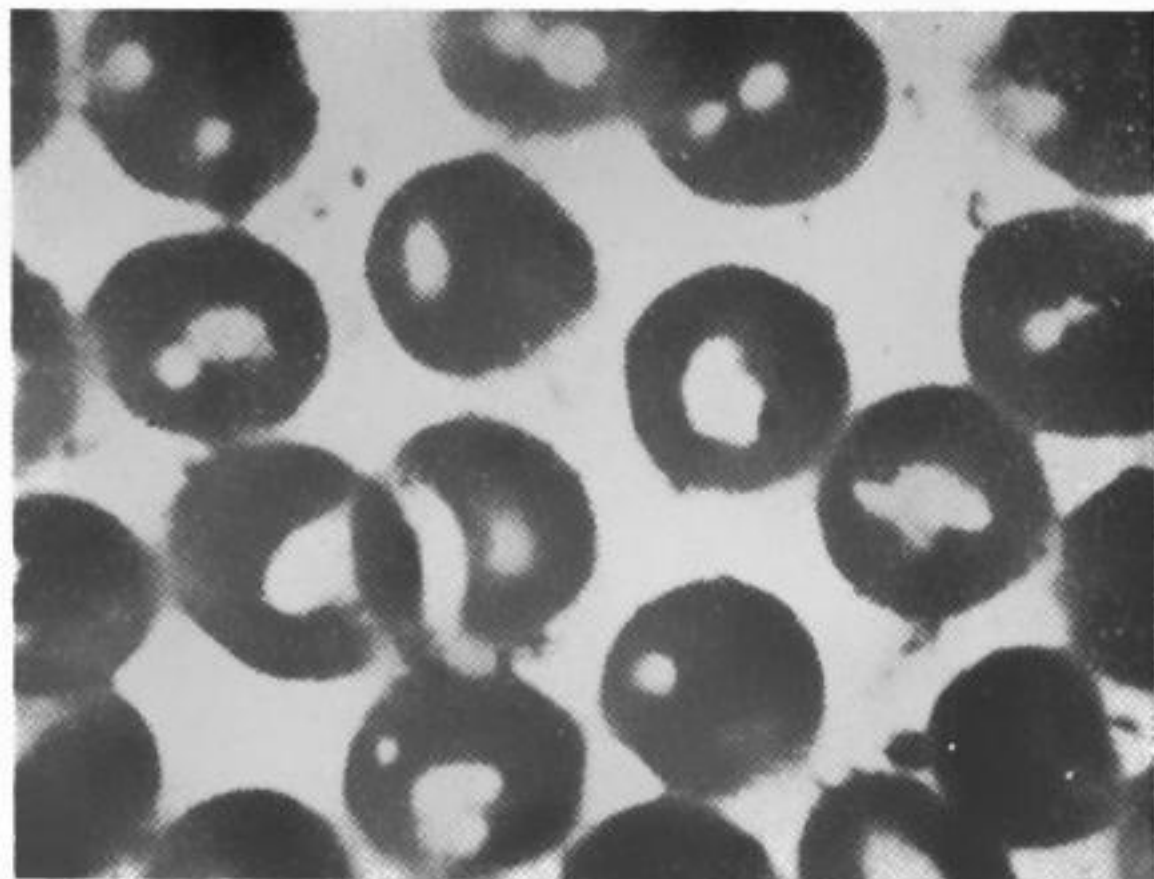


Рис. 1. Высокое содержание SH-групп в эритроцитах.

после оттаивания. По результатам исследований образцов крови установлено, что уровень свободного гемоглобина в контроле составил $416 \pm 126 \text{ мг}\%$, в опыте — $422 \pm 132 \text{ мг}\%$; осмотическая хрупкость в контроле (в относительных единицах) — $0,133 \pm 0,05$, в опыте — $0,133 \pm 0,046$.

Результаты исследований свидетельствуют, что достоверных отличий в сохранности целостности и осмотической резистентности омагниченных и контрольных эритроцитов при низкотемпературном консервировании не выявлено. Это может быть связано с тем, что результат омагничивания зависит от индивидуальных особенностей биологического объекта и большого разброса получаемых нами результатов.

Для выяснения этого вопроса проведены эксперименты, в которых на эритроцитах каждого донора пятикратно повторен опыт по одной и той же методике: эритроцитарная масса с криопротектором, приготовленным на физиологическом растворе, перед замораживанием эквилибровалась в МП напряженностью 2000 Э в течение 30 мин, а затем замораживалась в том же поле в полиэтиленовых ампулах объемом 1,5—2 мл. Группа крови во всех исследованиях — А (II). В таблице представлены результаты исследований крови двух доноров.

Как следует из статистического анализа данных, после действия МП на эритроциты крови первого донора получено достоверное улучшение сохранности клеток, в то же время эритроциты крови второго донора достоверно хуже сохранились при низкотемпературном консервировании. Таким образом, индивидуальные особенности биологического объекта, т. е. его состояние, необходимо учитывать как один из факторов, влияющих на результат воздействия магнитного поля.

В связи с тем что на макроскопическом уровне не выявлены достоверные изменения параметров эритроцитов, предпринята попытка оценить реакцию клеток на уровне внутриклеточного обмена. Для этого проведены цитохимические исследования сохранности реакционноспособных SH-групп в эритроцитах при глубоком охлаждении. Показано, что в исходном состоянии содержание SH-групп в эритроцитах высокое (в 100% клеток, рис. 1). После замораживания с предварительной 15- и 30-минутной эквилибрацией в МП содержание SH-групп снизилось соответственно на 52,7 и 46,6% (рис. 2, 3). Для контрольных образцов

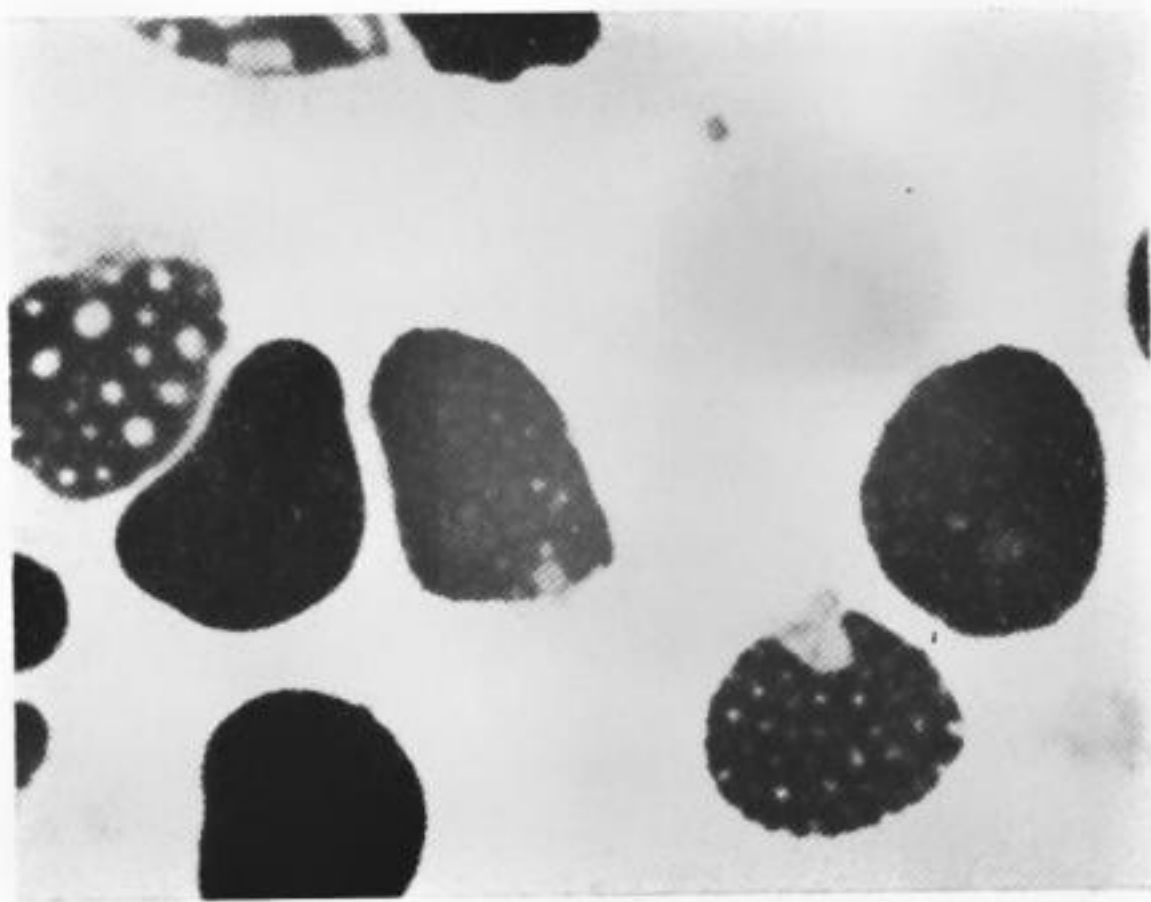


Рис. 2. Умеренное содержание SH-групп в эритроцитах после 15-минутной эквилибрации в МП и последующего замораживания-отогрева.

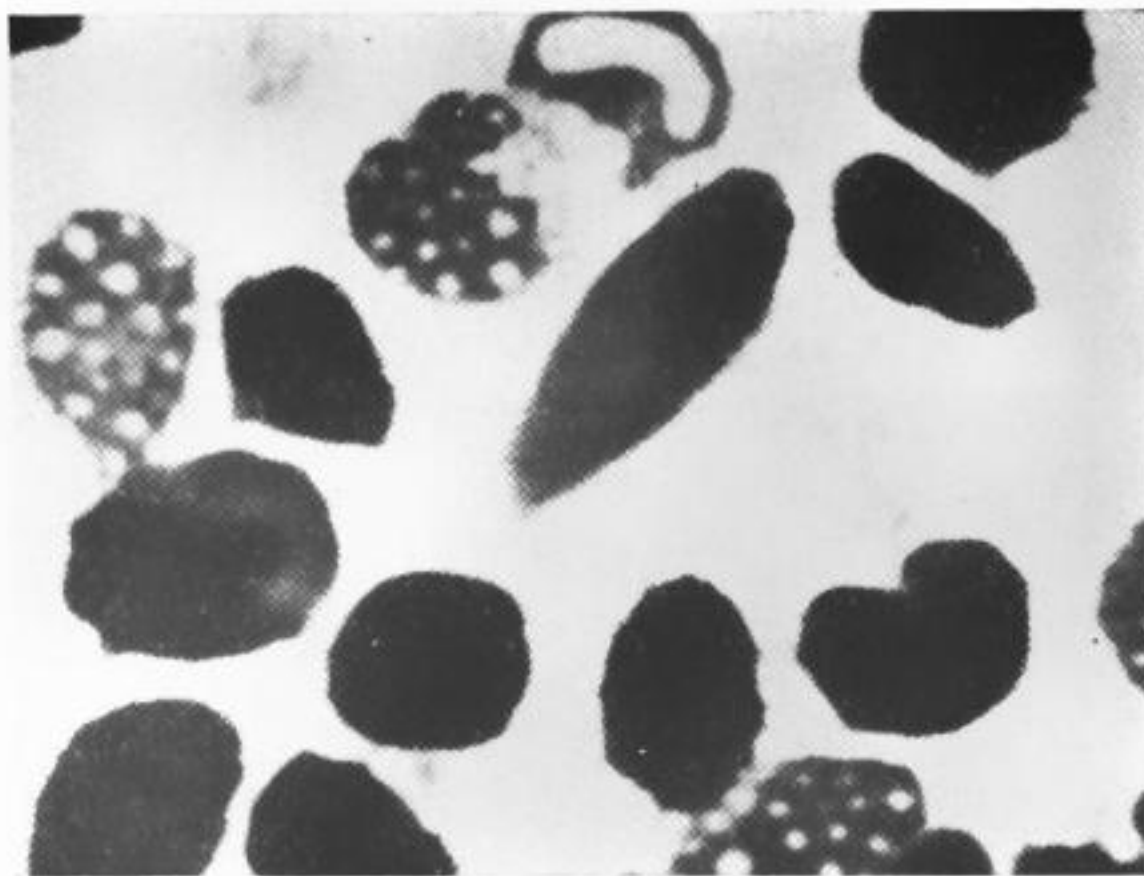


Рис. 3. Умеренное содержание SH-групп в эритроцитах после 30-минутной эквилибрации в МП и последующего замораживания-отогрева.

Влияние омагничивания крови разных доноров

Донор	До замораживания					
	Гемолиз, мг %		K ⁺ , мм		Осмотическая хрупкость	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	26	12	1,96±0,25	2,1±0,36	0,022±0,008	0,022±0,078
2	62	90	5,5 ±0,2	5,5±0,2	0,066±0,025	0,062±0,024

снижение последних составило 56,3% (рис. 4). Следовательно, эквilibрация в МП улучшает сохранность реакционноспособных SH-групп, причем 30-минутная в большей степени, чем 15-минутная.

В экспериментах по изучению действия МП на эритроциты в период замораживания получены данные, указывающие на то, что в ома-

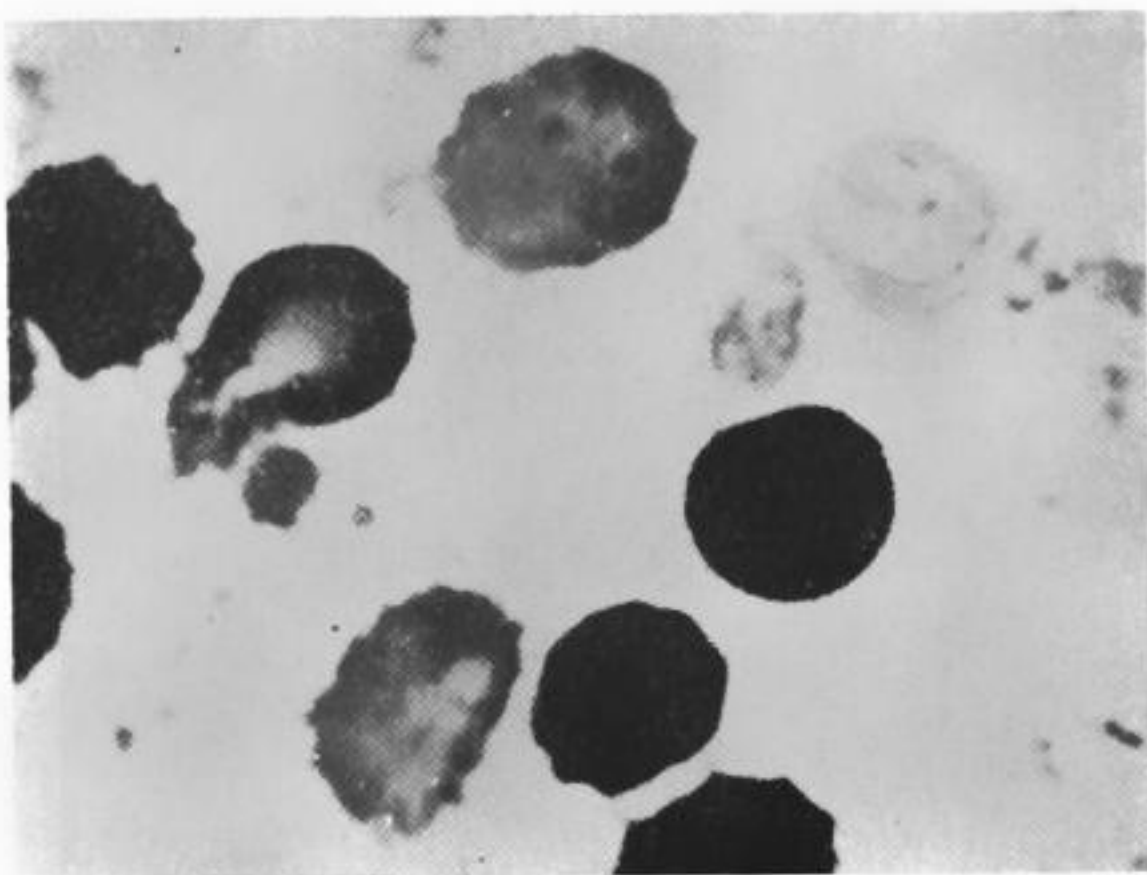


Рис. 4. Низкое содержание SH-групп в эритроцитах после замораживания-отогрева (контроль).

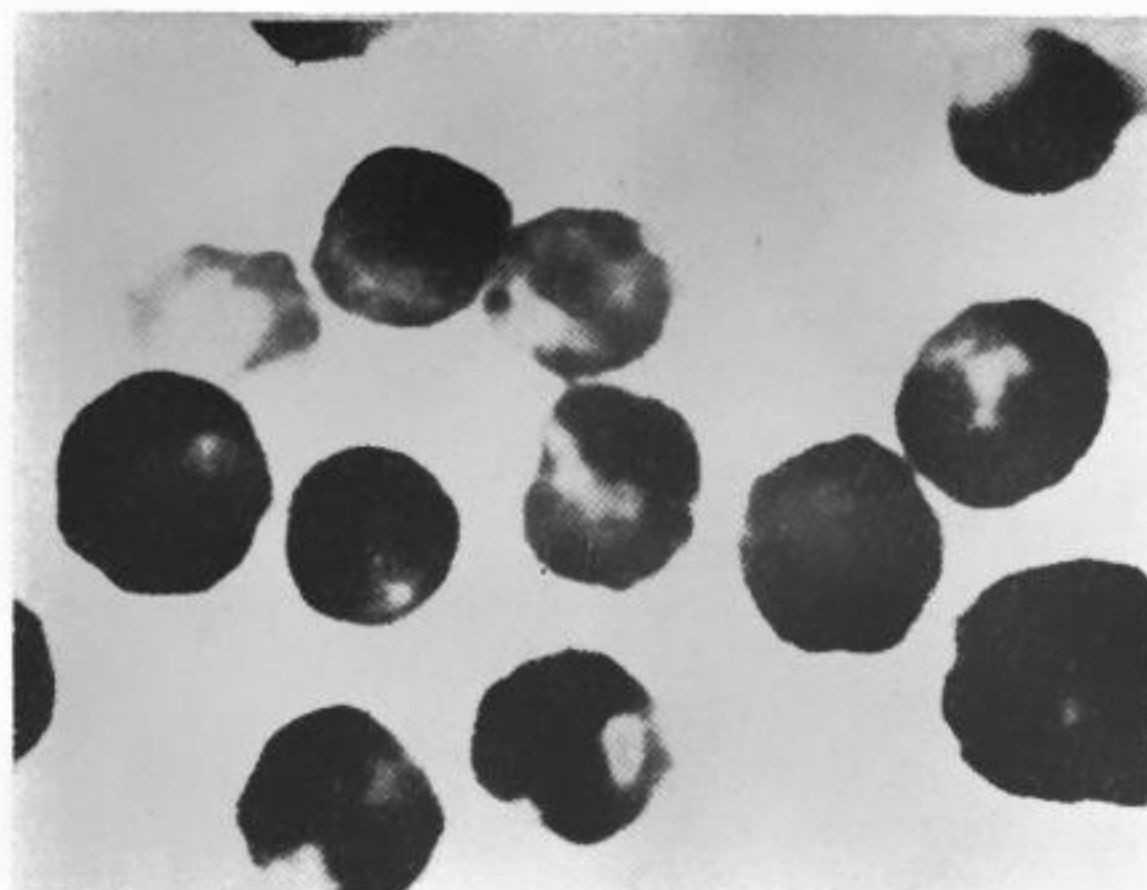


Рис. 5. Высокое содержание SH-групп после предварительной эквilibрации и замораживания в МП.

гниченных образцах после оттаивания только 18% клеток не содержали реакционноспособных SH-групп по сравнению с 47% в контроле (рис. 5). Таким образом, МП, действующее на суспензию клеток во время эквilibрации и замораживания, улучшает сохранность функционально - активных SH-групп эритроцитов при низкотемпературном консервировании.

Обсуждая возможный механизм защитного действия МП на реакционноспособные SH-группы эритроцитов при замораживании, следует обратить внимание на данные литературы, свидетельствующие о стабилизирующем действии МП на воду [12, 13]. В то же время низкие температуры изменяют состояние воды как вне, так и внутри клетки, что вызывает конформационные изменения SH-групп [24]. Можно предположить, что МП снижает степень дегидратации клеток, вызванную низкими температурами, и тем самым препятствует конформационным изменениям белковых молекул с последующим образованием дисульфидных связей.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что действие постоянного магнитного поля напряженностью 2000 Э в тече-

на результаты замораживания ($n=5$)

После отогрева					
Гемолиз, мг %		K ⁺ , мм		Осмотическая хрупкость	
Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
798±72	483±19	49,8±0,2	40,3 ±0,66	0,261±0,004	0,159±0,015
246±14	416±33	32 ±0,7	34,25±0,25	0,195±0,014	0,263±0,013

ние 15—90 мин достоверно улучшает сохранность реакционноспособных SH-групп эритроцитов при глубоком охлаждении. Целостность клеток, их осмотическая резистентность и внеклеточная концентрация ионов K⁺ в среднем не изменяются. Однако эти параметры у эритроцитов крови отдельных доноров достоверно улучшаются или ухудшаются.

1. Абдуллина З. М., Миррахимов М. М., Приживойт Г. Н. О влиянии МП на вязкость и свертывающую активность крови. — *Здравоохранение Киргизии*, 1974, № 5, с. 16—18.
2. Бантыш Л. А., Половский В. Г., Лазаренко Б. Р., Крепонослова А. Н. Влияние внешнего магнитного поля на скорость кристаллизации воды и структуру образующегося льда. — В кн.: *Материалы III Всесоюз. совещ. по электр. обраб. материалов*, М., 1973, с. 50—51.
3. Беклемешев Н. Б. К анализу динамики изменения РОЭ в магнитном поле. — В кн.: *Влияние искусственных магнитных полей на живые организмы: Материалы Всесоюз. симпоз.* Баку, 1972, с. 30—31.
4. Виниченко Э. В., Тюньков И. В. Кислотный гемолиз эритроцитов и активность некоторых ферментов, локализованных в мембране эритроцита белых мышей после пребывания животных в постоянном магнитном поле. — *Науч. тр./Киргиз. мед. ин-т*, 1974, 100, с. 81—83.
5. Влияние искусственных магнитных полей на живые организмы: Материалы Всесоюз. симпоз. — Баку: 1972. — 96 с.
6. Влияние магнитных полей на биологические объекты: Материалы III Всесоюз. симпоз. — Калининград, 1975. — 240 с.
7. Дубова В. М. Исследование активности альдолазы и щелочной фосфатазы сыворотки крови здорового и больного человека в магнитном поле. — В кн.: *Материалы II Всесоюз. совещ. по изуч. влияния магнит. полей на биол. объекты*, 24—26 сент. 1969. М., 1969, с. 83—86.
8. Классен В. И. Омагничивание водных систем. — М.: Химия, 1978. — 237 с.
9. Ковалев М. Г. Влияние постоянного магнитного поля на сперматозоиды быков-производителей. — В кн.: *Актуальные вопросы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных*. Минск, 1969, с. 25—28.
10. Матерова Е. А., Грекова А. Л., Дудина С. Е. Специфичный пленочный кальциевый электрод. — *Электрохимия*, 1972, 8, № 12, с. 1829—1832.
11. Могендович М. Р., Тишанькин В. Р. О механизме влияния МП на РОЭ. — В кн.: *Биологическое и лечебное действие МП*. Молотов, 1948, с. 61—72, с. 79—88.
12. Могендович Ю. М., Волож Ю. Г. Влияние постоянного магнитного поля на гидратационную способность переживающих тканей птиц. — В кн.: *Материалы II Всесоюз. совещ. по изуч. влияния магнит. полей на биол. объекты*. М.: 1969, с. 146—148.
13. Новицкий Ю. И., Федорова О. Е. Действие магнитного поля на сухие семена ржи в связи с их водоудерживающей способностью. — В кн.: *Материалы Всесоюз. совещ. по влиянию магнит. полей на биол. объекты*. М.: 1969, с. 164—167.
14. Павлович С. А. Магниточувствительность микроорганизмов: Реакция биол. систем на магнит. поля. — М.: Наука, 1978. — 103 с.
15. Пирузян Л. А., Барсегян Л. Х. О влиянии постоянного магнитного поля на консервированную кровь. — В кн.: *Применение магнитных полей в клинике: Тез. докл. Куйбышев. обл. конф. Куйбышев: 1976*, с. 67—68.
16. Пирузян Л. А., Глезер В. М., Митрохин Н. М. Влияние постоянного магнитного поля на консервированную кровь. — В кн.: *Применение магнитных полей в клинике: Тез. докл. Куйбышев. обл. конф. Куйбышев: 1976*, с. 66—67.
17. Рождественская М. А. Определение Нв в плазме консервированной крови. — В кн.: *Актуальные вопросы переливания крови*. М.: Медгиз, 1955, с. 55.
18. Саутин С. Н. Планирование экспериментов в химии и химической технологии. — Л.: Химия, 1975, с. 1—24.
19. Тринчер К. С. Состояние и роль воды в биологических объектах. — М.: Наука, 1967. — 250 с.
20. Тюньков И. В., Боровиков Л. М. Влияние слабых магнитных полей на устойчи-

- вость эритроцитов к кислотному гемолизу. — В кн.: Реакция биологических систем на слабые МП: Материалы Всесоюз. симпози. М., 1971, с. 35—37.
21. Чаплюк М. И., Наумова М. А., Голобокий Н. К. Влияние МП на скорость оседания эритроцитов крови онкологических больных. — В кн.: Материалы симпози. 22—23 мая 1972. М.: 1972, с. 66—69.
 22. Astaldi P., Verga L. The glycogen content of the cells of lymphatic leucemia. — Acta haematol., 1957, 17, N 3, p. 129—136.
 23. Barnett R. I., Seligman A. M. — J. Nat. Cancer. Inst., 1952, N 13, p. 215 — Приведено по Дьерд К. Практическая микротехника и гистохимия. — Будапешт: 1962. — 399 с.
 24. Levitt I. A. Sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. — J. Theor. Biol., 1962, 3, N 3, p. 355—391.
 25. Stosser R., Preidel I., Knaack I., Nehring H. Biomagnetische Untersuchungen an Spermien. — Stud. biophys., 1974, 42, N 3, p. 219—223.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
20.03.79

УДК 57.043:576.3.08

Н. Н. Попов, А. М. Бражников, Б. В. Щербина,
С. В. Карпычев, В. И. Гарбуз, Т. Н. Воскобойникова,
О. А. Дроздова

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕССА МИКРОФИЛЬТРАЦИИ СУСПЕНЗИИ МИЕЛОКАРИОЦИТОВ

Один из перспективных способов разделения клеток по размерам — их многоступенчатая микрофльтрация, т. е. последовательное пропускание клеток, суспендированных в физиологическом растворе через фильтры с уменьшающимся диаметром пор.

Описание процесса микрофльтрации по расходным характеристикам можно осуществить, полагая, что расход суспензии через фильтр подчиняется следующей зависимости:

$$q(t) = \bar{w} \bar{s} n(t), \quad (1)$$

где $q(t)$ — расход суспензии (производительность фильтра); $\bar{w}$ — средняя скорость течения суспензии через пору; $\bar{s}$ — средняя площадь поры; $n(t)$ — число свободных пор в фильтре.

Возможность представить расход суспензии через фильтр в виде зависимости (1) основывается на следующих допущениях: а) перемещение суспензии внутри пор фильтрующей перегородки рассматривается как гомогенное течение двухфазной системы, а костномозговая суспензия рассматривается как псевдожидкость; б) поток клеток в процессе фльтрации забивает поры фильтра, а время образования области повышенной концентрации клеток над фильтрующей перегородкой велико. Эффектом образования области повышенной концентрации пренебрегаем; в) предполагается, что поток клеток, подходящих к фильтру, стационарен, т. е. интенсивность поступления клеток через пору r считается величиной постоянной; г) закон изменения числа свободных пор в фильтрующей перегородке принят в виде

$$n(t) = \varepsilon [n_0 e^{-\frac{r}{n_0} t}], \quad (2)$$

где ε — символ «целая часть числа», n_0 — начальное число пор в фильтрующей перегородке.

Допущение «г» фактически означает, что в начальный момент времени забивание клетками пор будет происходить с наибольшей скоростью, а затем скорость забивания пор будет снижаться, в связи с тем что все большее количество пор фильтра будет забито.

С учетом этих допущений описывается начальная стадия процесса микрофльтрации, т. е. стадия наиболее эффективной работы фильтрующей перегородки.

Из (1) и (2) следует

$$q(t) = \bar{\omega} \bar{s} n_0 e^{-\frac{r}{n_0} t}. \quad (3)$$

Общий объем суспензии $V(t)$, прошедшей через фильтр,

$$\frac{dV(t)}{dt} = q(t), \quad (4)$$

откуда, полагая, что при $t=0$, $V(t)=0$, находим

$$V(t) = \frac{n_0^2 \bar{\omega} \bar{s}}{r} (1 - e^{-\frac{r}{n_0} t}). \quad (5)$$

Поскольку уравнение (5) можно рассматривать как переходную функцию инерционного звена с постоянной времени $T = \frac{n_0}{r}$ и коэффи-

циентом усиления $k = \frac{n_0^2 \bar{\omega} \bar{s}}{r}$, то уравнение для расхода суспензии $q(t)$ и объема $V(t)$ имеет вид

$$\frac{n_0}{r} \frac{dv_{(+)}(t)}{dt} + V(t) = \frac{n_0^2 \bar{\omega} \bar{s}}{r} \Delta p^*(t); \quad V(0) = 0, \quad (6)$$

$$\frac{n_0}{r} \frac{dq(t)}{dt} + q(t) = \frac{n_0^2 \bar{\omega} \bar{s}}{r} \frac{d}{dt} [\Delta p^*(t)]; \quad q(\infty) = 0, \quad (7)$$

где $\Delta p^* = \Delta p / [p]$, Δp — перепад давления, $[p]$ — единичное давление.

Экспериментальные данные, приведенные на рисунке, качественно соответствуют зависимости (6) и равносильной ей зависимости (7).

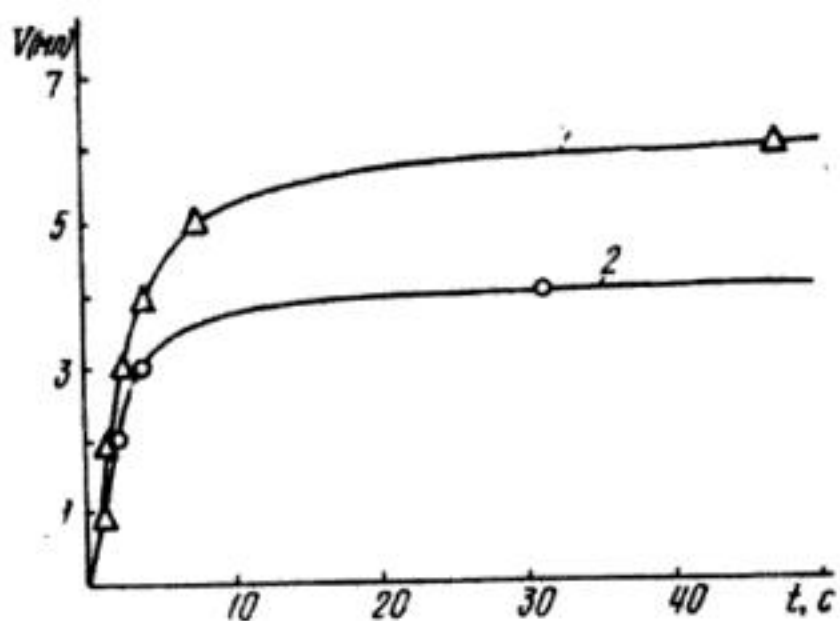
Таким образом, можно считать, что принятые допущения позволяют качественно согласовать расчетные расходные характеристики с экспериментом. Следовательно, в принятых условиях проведения эксперимента (перепад давления, концентрация клеток в суспензии, ее вязкость) гидродинамические особенности течения не должны оказывать существенного влияния на жизнеспособность и морфологическую сохранность клеток. Это связано с тем, что движение суспензии близко к гомогенному, и эффекты, обусловленные обтеканием клетки потоком жидкой фазы, не являются существенными.

По этим соображениям основными причинами травматизма клеток костного мозга при их микрофльтрации, видимо, являются механические повреждения, возникающие при контакте клеток с элементами фильтрующих перегородок.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,

Московский технологический
институт мясной и молочной
промышленности

Поступила в редколлегию
28.09.79

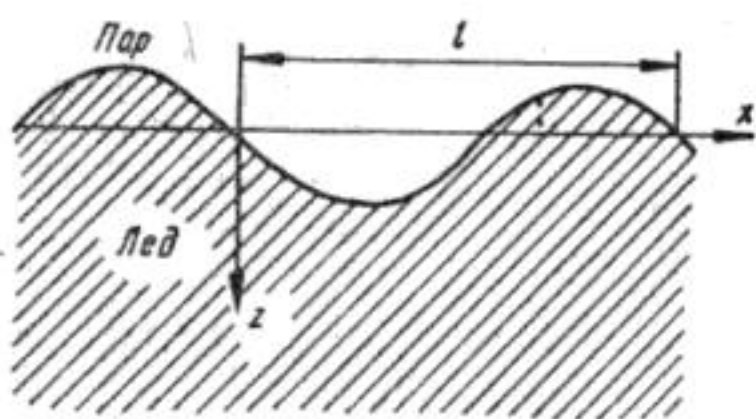


Зависимость общего объема суспензии, прошедшей через фильтр, от времени фильтрации:

1 — $\Delta p = 0,5$ кгс/см²; 2 — $\Delta p = 0,4$ кгс/см².

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПЛОСКОЙ ГРАНИЦЫ РАЗДЕЛА ФАЗ В ХОДЕ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ

Для управления процессом сублимационной сушки необходимо знать динамику развития границы раздела фаз лед—пар. Часто при расчетах эту границу представляют в виде достаточно гладкой поверхности [5]. Однако из эксперимента известно, что испарение льда происходит не только на поверхности, но и в некотором объеме тела (в зоне испарения) [2]. Мы попытались выяснить причину образования зоны



Возмущенная граница раздела фаз лед—пар.

испарения, теоретически изучив устойчивость плоской границы раздела фаз в ходе сублимационной сушки с кондуктивным подводом тепла. Воспользуемся методом, предложенным в [4], и рассмотрим развитие бесконечно малого синусоидального возмущения, наложенного на плоскую границу раздела фаз (рис.). Тогда уравнение возмущенной поверхности раздела имеет вид

$$z = \delta \sin(\omega x), \quad (1)$$

где δ — малый параметр, $\omega = \frac{2\pi}{l}$, а l — длина волны налагаемого возмущения.

Поток пара можно найти, воспользовавшись известной формулой

$$I = \frac{\alpha}{T^{1/2}} (P_H - P_K), \quad (2)$$

где P_H — давление насыщенных паров воды при данной температуре и кривизне поверхности раздела, P_K — парциальное давление паров воды в камере, α — эмпирический коэффициент, T — температура поверхности. Вместе с тем количество сублимирующего льда I_q связано с потоком тепла Q , подводимым к границе через лед, соотношением

$$I_q = \frac{Q}{L}, \quad (3)$$

где L — теплота сублимации льда. Ясно, что нужно требовать равенства

$$I_q = I \quad (4)$$

на возмущенной границе раздела.

Поле температур найдем из стационарного уравнения теплопроводности (поскольку реальные скорости движения границы раздела при сублимации малы)

$$\Delta T = 0. \quad (5)$$

Будем искать возмущенное решение уравнения (5) в виде

$$T(x, z) = T_0(z) + a(z) \delta \sin(\omega x), \quad (6)$$

где $T_0(z)$ — невозмущенное решение. Подставляя (6) в уравнение (5)

и учитывая, что возмущение должно исчезать при удалении от границы раздела, получаем

$$T(x, z) = T_0(z) + Ae^{-z\omega} \delta \sin(\omega x). \quad (7)$$

Значение константы A определим из уравнения (4).

Поток тепла к границе Q равен

$$Q = \kappa \Delta T \vec{n}, \quad (8)$$

где $\vec{n}$ — нормаль к границе, κ — коэффициент теплопроводности льда. Потребовав малости произведения $\delta\omega$, можно с принятой нами точностью выразить Q через $\frac{\partial T}{\partial z}$

$$Q = \kappa \frac{\partial T}{\partial z}. \quad (9)$$

Тогда с точностью до членов порядка δ можно представить I_q в следующем виде:

$$I_q = \frac{1}{L_0} \kappa \left\{ G - \delta \sin(\omega x) \left[A\omega - \frac{1}{L_0} \frac{\partial L}{\partial T} (G + A) \right] \right\}, \quad (10)$$

где $G = \frac{\partial T_0(z)}{\partial z}$, $L_0 = L[T_0(0)]$.

Известно, что давление насыщенных паров зависит как от температуры, так и от кривизны поверхности [1]. Воспользовавшись формулой (2), получим с точностью до членов порядка δ вид потока пара I :

$$I = \frac{\alpha(P_n - P_k)}{T^{1/2}} + \left[\frac{\alpha \left(\frac{\partial P_n}{\partial T} T_0 + \frac{P_n - P_k}{2} \right) (A + G)}{T^{3/2}} - \frac{\omega^2 \Gamma \alpha P_n}{T^{1/2}} \right] \delta \sin(\omega x), \quad (11)$$

где $\Gamma = \frac{2v_T \beta}{T}$ [1], β — коэффициент поверхностного натяжения, v_T — удельный объем молекулы льда. Теперь из (4), учитывая (11) и (10), получаем выражение для A . В ходе вычислений считаем, что $\frac{\partial P_n}{\partial T} T_0 \gg \frac{P_n - P_k}{2}$ [3], в интересующем нас диапазоне температур — от 60 до -30°C

$$A = \frac{-\frac{\kappa}{L^2} \frac{\partial L}{\partial T} G^2 - \frac{\alpha}{T^{1/2}} \frac{\partial P_n}{\partial T} G + \alpha \Gamma \omega^2 P_n}{\frac{\kappa \omega}{L} + \frac{G \kappa}{L^2} \frac{\partial L}{\partial T} + \alpha \frac{\partial P_n}{\partial T}}.$$

Скорость движения границы раздела V связана с потоком сублимирующего вещества I

$$V = \frac{I}{\rho},$$

где ρ — плотность льда. Тогда можно определить величину отклонения скорости движения границы V от ее невозмущенного значения V_0

$$V - V_0 = \frac{I - I_0}{\rho} = V_0 \sin(\omega x) \delta \times$$

$$\times \frac{\frac{\rho V_0 \omega}{P_n} \frac{\partial P_n}{\partial T} - \Gamma \omega^2 \left(\frac{\kappa}{L_0} \omega + \frac{\rho V_0}{L_0} \frac{\partial L}{\partial T} \right)}{\frac{\kappa \omega}{L_0} + \frac{V_0 \rho}{L_0} \frac{\partial L}{\partial T} + \frac{V_0 \rho}{P_n} \frac{\partial P_n}{\partial T}}.$$

Устойчивость границы раздела зависит от знака выражения

$$\tau = \frac{V - V_0}{\delta \sin(\omega x)}.$$

Если это выражение положительно, то возмущение развивается, в противном случае возмущение релаксирует. Приведем оценку для τ при скорости движения фронта сублимации $V \sim 3 \cdot 10^{-3} \frac{\text{см}}{\text{с}}$ и температуре поверхности $T = -40^\circ\text{C}$:

$$\tau \approx a \cdot 10^{-5} (b - 3 \cdot 10^{-6} \omega^2), \quad (12)$$

где $a \sim 3 \text{ с}^{-1} \text{ см}^2$, $b \sim 1 \text{ см}^{-2}$.

Из приведенной оценки следует, что предположение о возможности использования стационарного уравнения (5) справедливо, поскольку τ достаточно мало. Кроме того, из (12) следует, что τ положительно при $\omega < 10^{-3} \text{ см}^{-1}$, поэтому плоская поверхность сублимации неустойчива. Иначе говоря, случайно возникающие углубления будут развиваться, фронт будет разрыхляться и образуется зона сублимации. Следовательно, увеличивается поверхность сублимации и возрастает перепад температур между разными точками образца. Этот факт нужно учитывать при разработке программы сублимационной сушки и при выборе метода управления процессом.

1. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Статистическая физика. — М.: Наука, 1976. — 583 с.
2. Лебедев Д. П., Перельман Т. Л. Тепло- и массообмен в процессах сублимации в вакууме. — М.: Энергия, 1973. — 336 с.
3. Лыков А. В. Теория сушки. — М.: Энергия, 1968. — 469 с.
4. Маллинз В., Секерка Р. Устойчивость плоской поверхности раздела фаз при кристаллизации разбавленного бинарного сплава: Проблемы роста кристаллов. — М.: Мир, 1968. — 392 с.
5. Хаяси, Комори. Теоретическое и экспериментальное исследование самозамораживания. — Теплопередача, 1975, № 3, с. 1—6.
6. Хирс Д., Паунд Г. Испарение и конденсация. — М.: Металлургия, 1966. — 140 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
28.08.79

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.043:541.64:612.111

В. Г. Лубяный, Л. П. Бредихина, М. И. Шраго

КРИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ОЛИГОМЕРОВ ОЭГ В НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Одним из этапов исследований по созданию новых криозащитных веществ, проводимых в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, являются работы, посвященные всестороннему изуче-

нию оксиэтильных производных многоатомных спиртов, в том числе гомологического ряда продуктов оксиэтилирования трехатомного спирта — глицерина (ОЭГ).

Исходное вещество синтеза ОЭГ — хорошо известный и широко применяемый в практике низкотемпературного консервирования криопротектор глицерин. Обладая высокой криозащитной эффективностью, он имеет ряд существенных недостатков, связанных в первую очередь с необходимостью удаления его из размороженной клеточной взвеси перед переносом клеток в изоосмотическую среду. Использование в криоконсервировании экстрацеллюлярных криопротекторов может значительно упростить подготовку реконсервированного материала к применению [5]. Методы органического синтеза, в частности полимеризации, сополимеризации и другие, позволяют направленно видоизменять свойства исходных веществ. Так, в результате оксиэтилирования проникающего в клетки двухатомного спирта этиленгликоля получен гомологический ряд активных криопротекторов полиэтиленоксидов, олигомеры которого молекулярной массы свыше 1000 относятся к экстрацеллюлярным в отношении эритроцитов [7, 9].

Процесс оксиэтилирования глицерина изучался в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР [3]. Разработаны методы синтеза и очистки ОЭГ, получены оксиэтильные производные со степенью замещения 1—50. С целью их идентификации исследованы основные физико-химические и токсико-фармакологические характеристики [1, 4, 7, 8], позволившие предположить у данных веществ наличие криопротекторной активности.

На первом этапе работы нами проведен отбор в ряду олигомеров ОЭГ с целью выявления образцов, обладающих достаточно высокой криозащитной активностью в отношении эритроцитов. Для этого изучали влияние растворов полученных соединений на стадии эквilibрации, так как замораживанию клеточной суспензии предшествует пребывание клеток в среде криозащитного вещества при положительной температуре и после замораживания-оттаивания.

Материалом исследования служили эритроциты консервированной крови, заготовленной на консерванте № 76 Харьковской областной станцией переливания крови, в первые двое суток хранения. Изучаемые растворы ОЭГ со степенью замещения 1—5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 готовили в 5, 10, 20, 30 и 40%-ной концентрации на бидистиллированной воде и 0,9%-ном растворе хлористого натрия. Коррекцию рН проводили *трис*-буфером в пределах 7,0—7,4. Клеточную взвесь получали добавлением растворов к эритроцитной массе в соотношении 1 : 1 по объему. Время экспозиции 30—60 мин. Замораживание осуществляли в полиэтиленовых ампулах объемом 1,5—2 мл погружением в жидкий азот, а оттаивание — в термостатируемой водяной бане при температуре 42—43°C.

Наиболее простым и информативным тестом для определения явного повреждения эритроцитов является показатель гемолиза, который может быть выражен в мг% свободного гемоглобина в надосадочной жидкости (НОЖ) после центрифугирования клеточной суспензии либо в процентах, вычисленных по перераспределению гемоглобина в клеточной массе и взвешивающей среде [6, 10].

Как установлено, после присоединения первых четырех-пяти оксиэтильных звеньев глицерин терял способность проникать в эритроциты и при перенесении последних в изоосмотическую среду не наблюдалось гемолиза [8]. Не отмечен также выход гемоглобина при эквilibрации эритроцитов в растворах ОЭГ со степенью замещения $n=5$ и выше, приготовленных с добавлением 0,9% хлористого натрия.

Водные растворы ОЭГ, включающие более 10 оксиэтильных звеньев, в концентрации 5% оказывают повреждающее действие, и свободный гемоглобин в НОЖ превышает 200 мг%. Растворы этих полимер-

Свободный гемоглобин в надосадочной жидкости (мг%)

ОЭГ	20%-ный раствор		30%-ный раствор		40%-ный раствор	
	Водный	Солевой	Водный	Солевой	Водный	Солевой
n=20 До замораживания После оттаивания	9,0±4,6 2200±210	4,6±1,6 871,6±305,9	6,9±4,2 1276,4±204,9	4,0±1,7 9223,13±37,4	9,4±4,5 1052,0±205,7	7,7±4,8 984,0±134,2
n=25 До замораживания После оттаивания	11,0±7,4 1490±151	5,2±1,6 848,0±174,6	6,8±3,7 764,0±185,7	5,8±3,5 201,7±18,2	6,4±4,5 582±48	9,5±7,2 898±10
n=30 До замораживания После оттаивания	7,7±4,3 1164±145	6,8±2,8 256±10	5,5±3,1 318,0±75,5	8,6±5,0 238,0±44,7	2,3±1,4 171,3±28,3	2,7±2,5 250,4±36,0
n=40 До замораживания После оттаивания	6,9±3,6 1732±225	6,3±3,6 364,7±16,4	4,4±1,7 248,0±28,3	10,7±8,5 223,6±14,1	1,8±0,9 182,0±22,4	8,7±6,7 188,7±23,9

Пр и м е ч а н и е. Различия между показателями до замораживания и после оттаивания во всех случаях достоверны ($p<0,05$); содержание свободного гемоглобина в контроле $2,1\pm0,7$ мг%.

Осмотическая хрупкость эритроцитов в 0,6%-ном NaCl (%)

ОЭГ	20%-ный раствор		30%-ный раствор		40%-ный раствор	
	Водный	Солевой	Водный	Солевой	Водный	Солевой
n=20 До замораживания После оттаивания	1,3±0,2 66,0±5,5	1,7±0,3 81,2±4,0	1,5±0,5 84,1±4,8	1,2±0,3 17,8±1,4	1,9±0,4 67,2±3,8	3,5±0,6 63,5±6,0
n=25 До замораживания После оттаивания	1,7±0,6 52,9±7,7	1,1±0,2 59,6±2,9	1,5±0,4 77,4±8,3	1,6±0,6 20,7±2,7	1,8±0,3 63,1±7,0	2,1±1,1 61,0±5,7
n=30 До замораживания После оттаивания	1,3±0,3 56,2±8,6	1,2±0,3 17,8±2,1	1,6±0,4 71,5±6,5	1,3±0,5 48,3±8,6	1,8±0,4 46,3±3,8	5,5±0,8 57,7±5,7
n=40 До замораживания После оттаивания	15,5±6,4 52,9±6,7	6,4±3,1 20,7±2,1	8,9±6,5 73,2±6,4	8,6±2,1 65,7±8,0	22,0±8,1 60,7±4,0	12,9±5,6 76,4±6,3

Пр и м е ч а н и е. Различия между показателями до замораживания и после оттаивания во всех случаях достоверны ($p<0,05$); осмотическая хрупкость эритроцитов контроля $2,4\pm0,4$ %.

Осмотическая хрупкость эритроцитов в 0,9% NaCl (%)

ОЭГ	20%-ный раствор		30%-ный раствор		40%-ный раствор	
	Водный	Солевой	Водный	Солевой	Водный	Солевой
$n=20$ До замораживания После оттаивания	$1,1 \pm 0,4$ $61,3 \pm 7,4$	$1,1 \pm 0,4$ $77,4 \pm 7,8$	$1,4 \pm 0,6$ $82,4 \pm 3,5$	$1,7 \pm 0,3$ $17,8 \pm 10,6$	$1,5 \pm 0,2$ $66,1 \pm 4,0$	$2,5 \pm 0,4$ $58,9 \pm 5,9$
$n=25$ До замораживания После оттаивания	$1,3 \pm 0,2$ $40,7 \pm 4,8$	$1,5 \pm 0,4$ $56,5 \pm 4,3$	$1,8 \pm 0,3$ $76,7 \pm 8,6$	$2,1 \pm 0,5$ $15,0 \pm 2,0$	$1,8 \pm 0,5$ $46,4 \pm 3,4$	$2,4 \pm 0,7$ $55,3 \pm 5,7$
$n=30$ До замораживания После оттаивания	$1,4 \pm 0,2$ $50,0 \pm 5,5$	$1,6 \pm 0,3$ $15,0 \pm 1,3$	$2,1 \pm 0,5$ $62,3 \pm 5,7$	$1,5 \pm 0,6$ $55,2 \pm 8,9$	$2,4 \pm 0,4$ $41,5 \pm 3,9$	$2,5 \pm 1,0$ $54,4 \pm 6,0$
$n=40$ До замораживания После оттаивания	$1,1 \pm 0,2$ $47,5 \pm 7,0$	$2,5 \pm 1,1$ $15,9 \pm 1,4$	$1,9 \pm 0,4$ $68,5 \pm 7,4$	$1,7 \pm 0,3$ $50,7 \pm 7,6$	$2,1 \pm 0,5$ $55,4 \pm 5,6$	$4,4 \pm 1,5$ $72,8 \pm 7,2$

Примечание. Различия между показателями до замораживания и после оттаивания во всех случаях достоверны ($p < 0,05$); осмотическая хрупкость эритроцитов контроля $1,0 \pm 0,1\%$.

Общий объем эритроцитов — гематокрит (%)

ОЭГ	20%-ный раствор		30%-ный раствор		40%-ный раствор	
	Водный	Солевой	Водный	Солевой	Водный	Солевой
$n=20$ До замораживания После оттаивания p	$28,0 \pm 1,2$ $20,0 \pm 1,0$ $< 0,05$	$22,6 \pm 0,7$ $21,3 \pm 0,9$ $> 0,05$	$25,2 \pm 0,8$ $23,3 \pm 0,8$ $> 0,05$	$23,3 \pm 1,3$ $20,6 \pm 1,0$ $> 0,05$	$21,7 \pm 1,2$ $25,3 \pm 0,9$ $< 0,05$	$22,6 \pm 0,9$ $21,7 \pm 1,0$ $> 0,05$
$n=25$ До замораживания После оттаивания p	$28,2 \pm 2,0$ $21,5 \pm 0,8$ $< 0,05$	$24,9 \pm 1,1$ $23,0 \pm 0,7$ $> 0,05$	$24,0 \pm 0,6$ $21,8 \pm 1,1$ $> 0,05$	$23,2 \pm 0,7$ $22,2 \pm 1,0$ $> 0,05$	$21,7 \pm 1,0$ $23,7 \pm 0,7$ $> 0,05$	$23,0 \pm 1,0$ $23,4 \pm 1,3$ $> 0,05$
$n=30$ До замораживания После оттаивания p	$32,3 \pm 1,5$ $23,8 \pm 0,8$ $< 0,05$	$25,1 \pm 1,3$ $22,4 \pm 1,0$ $> 0,05$	$27,9 \pm 1,3$ $25,3 \pm 1,5$ $> 0,05$	$23,2 \pm 0,9$ $23,3 \pm 0,8$ $> 0,05$	$24,5 \pm 0,7$ $24,6 \pm 0,9$ $> 0,05$	$21,0 \pm 0,4$ $24,2 \pm 0,8$ $< 0,05$
$n=40$ До замораживания После оттаивания p	$33,5 \pm 1,6$ $23,2 \pm 1,0$ $< 0,05$	$26,9 \pm 1,2$ $24,7 \pm 1,3$ $> 0,05$	$27,1 \pm 1,3$ $23,3 \pm 0,6$ $< 0,05$	$25,6 \pm 0,6$ $22,6 \pm 0,9$ $< 0,05$	$25,7 \pm 1,1$ $23,6 \pm 0,6$ $> 0,05$	$21,6 \pm 1,4$ $22,6 \pm 0,4$ $> 0,05$

Примечание. p — достоверность различий; гематокрит контроля $31,1 \pm 1,0\%$.

		Количество гемолизированных	
ОЭГ		20 %-ный раствор	
		Водный	Солевой
$n=20$	До замораживания	$0,09 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,02$
	После оттаивания	$18,4 \pm 2,3$	$6,0 \pm 1,2$
$n=25$	До замораживания	$0,11 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,01$
	После оттаивания	$13,2 \pm 1,6$	$6,1 \pm 1,2$
$n=30$	До замораживания	$0,03 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$
	После оттаивания	$9,8 \pm 1,5$	$2,1 \pm 0,2$
$n=40$	До замораживания	$0,02 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,03$
	После оттаивания	$13,7 \pm 2,3$	$3,1 \pm 0,2$

Примечание. Различия между показателями до замораживания и после оттаивания

гомологов в более высокой концентрации не вызывают явного гемолиза. Выраженным криозащитным действием обладают растворы ОЭГ со степенью замещения $n=20, 25, 30$ в концентрации 20—40%. Как в водных, так и в солевых растворах ОЭГ более низкой молекулярной массы и меньших концентраций после замораживания-оттаивания отмечен интенсивный гемолиз. Таким образом, предварительный отбор в ряду олигомеров ОЭГ показал, что дальнейшего, более детального изучения заслуживают образцы с 20 и более оксиэтильными звеньями.

На следующем этапе криопротекторную активность отобранных ОЭГ оценивали по комплексу показателей, включающему кроме определения свободного гемоглобина в НОЖ: 1) определение общего объема клеток — гематокрита как показателя осмотического и дегидратирующего воздействия; 2) вычисление процента гемолиза по формуле Хаггинса [10]: количество гемолизированных клеток (%) =

$$= \frac{\text{Гемоглобин в НОЖ}}{\text{Гемоглобин общий}} (100 - \text{гематокрит});$$

3) определение осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-ных растворах хлористого натрия в процентах к полному гемолизу в дистиллированной воде [2] как показателя степени латентного повреждения клеток в условиях градиента осмотического давления.

Общий план эксперимента оставался таким же: испытывали водные растворы и 0,9%-ные растворы хлористого натрия, содержащие ОЭГ со степенью полимеризации $n=20, 25, 30, 40$ в 20—40%-ной концентрации. Определение перечисленных показателей проводили после экспозиции эритроцитов в криозащитных растворах и после замораживания-оттаивания. Результаты опытов приведены в табл. 1—5.

Свободный гемоглобин в НОЖ на этапе эквilibрации эритроцитов в растворах ОЭГ не превышает нормы (табл. 1). Анализ результатов определения осмотической хрупкости показывает, что после пребывания в растворах ОЭГ устойчивость эритроцитов в 0,9%-ном растворе хлористого натрия снижается, а в 0,6%-ном растворе несколько повышается по сравнению с контролем. Лишь растворы полимергомолога с 40 оксиэтильными звеньями понижают устойчивость эритроцитов к гипотоническому воздействию и в больших концентрациях вызывают значительное увеличение осмотической хрупкости — свыше 20% (табл. 2, 3). Кроме того, растворы ОЭГ $n=40$ в концентрации 40% вызывают агрегацию клеток и после центрифугирования осажденные эритроциты образуют плотную, трудно разделяемую массу. Это явление можно объяснить выраженным дегидратирующим действием данных растворов

клеток (%)

30%-ный раствор		40%-ный раствор	
Водный	Солевой	Водный	Солевой
$0,07 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
$9,6 \pm 1,4$	$1,9 \pm 0,3$	$6,8 \pm 1,7$	$9,6 \pm 1,7$
$0,06 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
$6,5 \pm 1,8$	$1,8 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,6$	$7,1 \pm 0,6$
$0,05 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,03$
$2,3 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,3$
$0,04 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,06$
$2,2 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$

во всех случаях достоверны ($p < 0,05$); гемолиз контроля $0,014 \pm 0,005\%$.

криопротектора на эритроциты, что подтверждается изменением общего объема клеток — гематокрита (табл. 4).

Водные растворы ОЭГ $n=30, 40$ в 20%-ной концентрации вызывают увеличение общего объема эритроцитов, тогда как солевые растворы этих полимергомологов уменьшают гематокрит, и обезвоживание клеток усиливается с увеличением концентрации ОЭГ. Эти особенности действия ОЭГ также можно объяснить его значительной дегидратационной способностью [8], возрастающей с повышением степени полимеризации, и осмотическим давлением среды, находящимся в обратной зависимости от молекулярной массы.

Количество гемолизированных клеток после экспозиции эритроцитов в растворах ОЭГ (табл. 5) практически не отличается от контроля и коррелирует с количеством свободного гемоглобина в НОЖ. После замораживания-оттаивания взвеси эритроцитов в растворах ОЭГ количество свободного гемоглобина в НОЖ достоверно повышается по сравнению с контролем, уменьшаясь с ростом степени полимеризации ОЭГ, и в лучших сочетаниях концентрации со степенью замещения и типом растворителя (физиологический раствор, бидистиллированная вода) равно 200—300 мг% (табл. 1).

Осмотическая хрупкость реконсервированных клеток в испытанных средах (табл. 2, 3) колеблется в значительных пределах в зависимости от степени полимеризации и концентрации ОЭГ, причем ее показатели в изотоническом и гипотоническом растворах хлористого натрия оказываются близкими. Следует отметить, что в солевых растворах ОЭГ отмечается меньшее латентное повреждение эритроцитов при замораживании-оттаивании, и для 20%-ного ОЭГ $n=30$ и 30%-ного ОЭГ $n=25$ количество поврежденных клеток составляет 15—17%. Общий объем эритроцитов (табл. 4) после криоконсервирования снижается по сравнению с контролем и исходным состоянием до замораживания. Количество гемолизированных клеток (табл. 5) составляет от 1 до 18%.

Выводы. 1. ОЭГ со степенью замещения $n=20—30$ в концентрации 20—40% обладает выраженным криозащитным действием в отношении эритроцитов человека. Включение 0,9%-ного NaCl в раствор, содержащий ОЭГ, повышает его эффективность.

2. Криозащитная активность растворов ОЭГ возрастает с увеличением степени замещения до $n=30$ и повышением концентрации до 20—40%.

3. Растворы ОЭГ $n=40$ вызывают агрегацию эритроцитов, что затрудняет их восстановление в процессе криоконсервирования. 4. Растворы ОЭГ изученных молекулярных масс и концентраций вызывают дегидратацию эритроцитов, о чем свидетельствуют уменьшение общего объема клеток и повышение их осмотической хрупкости.

5. Латентное повреждение эритроцитов при замораживании-оттаивании менее выражено в 20%-ном растворе ОЭГ $n=30$ и 30%-ном растворе ОЭГ $n=25$, в которых осмотическая хрупкость клеток составляет 15—17%.

1. Верховский Б. А., Мазалов В. К., Сигал Н. С., Элькина Л. З. Влияние малых доз оксигенированного глицерина $n=30$ на функцию почек. — В кн.: Вопросы криоконсервирования биологических объектов. Киев: Наук. думка, 1978, с. 18—21.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. Ультрабыстрое замораживание эритроцитов для их долгосрочного хранения. — В кн.: Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. М.: Наука, 1967, с. 322—328.
3. Кочуровская Г. Г., Матвеец Н. М., Лубяный В. Г. Некоторые аспекты оксигенирования полиолов. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 76—78.
4. Матвеец Н. М. Оксигенирование глицерина — метод создания криозащитных веществ. — В кн.: Современные проблемы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1976, с. 15—19.
5. Пушкарь Н. С., Наконечный А. А., Калугин Ю. В. Некоторые аспекты механизма действия криопротектантов. — В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков: 1972, с. 98—114.
6. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови. — Актуал. вопр. переливания крови, 1955, вып. 4, с. 55—57.
7. Шраго М. И., Калугин Ю. В., Гучок М. М. О некоторых подходах к созданию криопротекторов. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 45—46.
8. Шраго М. И., Калугин Ю. В., Кочуровская Г. Г. и др. Влияние оксигенирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 31—33.
9. Шраго М. И., Тимченко В. Г., Бредихина Л. П., Лубяный В. Г. Некоторые интегральные показатели сохранности эритроцитов после контакта с экзоцеллюлярными криопротекторами. — Физиол. журн., 1978, 24, № 3, с. 387—391.
10. Huggins C. E. Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethyl sulfoxide. — Transfusion, 1963, 5, N 4, p. 483—493.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
20.06.79

УДК 57.643(612.111:615.014.41)

А. Н. Новиков, Т. Ф. Гордеева, А. В. Черкашина

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВВОДА КРИОПРОТЕКТОРА ПЭО-1500 НА СОХРАННОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ

Из литературных источников [1, 4] и практики криоконсервирования биологических объектов известно о большой роли условий ввода криопротектора в подготавливаемую для замораживания биосистему. Несмотря на неоспоримую важность условий проведения этой стадии криоконсервирования, она исследована недостаточно. В частности, отсутствуют данные о совместном влиянии факторов, определяющих процесс ввода криопротектора: скорости добавления криопротектора, интенсивности перемешивания и температуры системы. В связи с этим нами проведено исследование, целью которого была количественная оценка совместного влияния перечисленных факторов при вводе криопротектора ПЭО-1500 в подготавливаемую к замораживанию суспензию эритроцитов на их сохранность.

Методика эксперимента. В термостатируемый стеклянный сосуд, снабженный винтовой мешалкой, с варьируемой скоростью вращения вносилось определенное количество суспензии эритроцитов. При установлении в суспензии необходимой температуры производился ввод криопротектора ПЭО-1500 в виде 40%-ного водного раствора с заданной скоростью до 20% содержания его в системе. Температура вводи-

мого криопротектора варьировалась, но была одинаковой с температурой суспензии эритроцитов. После завершения ввода раствора ПЭО-1500 при остановленной мешалке система выдерживалась 15 мин при неизменной температуре.

Затем суспензия эритроцитов разливалась в полиэтиленовые ампулы емкостью 1 мл и замораживалась погружением в азот.

Размораживание осуществлялось в водяной бане с температурой +40°C. Сохранность размороженных эритроцитов определялась по методам подсчета количества клеток и оценке гемолиза [2—3]. В постановке эксперимента и в

Таблица 1

Пределы варьирования факторов полного трехфакторного эксперимента

Характеристика влияющих факторов	Влияющие факторы		
	x_1 , скорость прилива-ния раствора ПЭО-1500, мл/мин на мл суспензии эритроцитов	x_2 , интенсивность перемешивания системы, R —число Рейнгольда	x_3 , температура системы, °C
Основной уровень	0,505	578,5	10,0
Интервал варьирования	0,495	170,5	10,0
Верхний уровень	1,000	749,0	20,0
Нижний уровень	0,010	408,0	0,0

оценке полученных результатов использован метод оптимального планирования — метод полного трехфакторного эксперимента [5]. Данные о принятых влияющих факторах и пределах их варьирования приведены в табл. 1. Число Рейнгольда (R) — общепринятая мера интенсивности движения жидкости. Рассчитывается по данным скорости перемешивания, параметрам вмещающего сосуда, вязкости среды [6]. В применяемой методике числу $R=749,0$ соответствовала скорость вращения мешалки 330 об/мин. $R=408,0$ —180,0 об/мин. В качестве функции отклика использовали данные по подсчету количества целых клеток y_1 , шт/мл и их гемолизу — y_2 , мг% после размораживания.

Матрица планирования и полученные значения принятых функций отклика полного трехфакторного эксперимента отображены в таблице 2.

Обсуждение результатов эксперимента. Проверка воспроизводимости показала, что с достоверной вероятностью 0,95 результаты экспериментов, полученных по принятой методике, воспроизводимы. По полученным значениям функции от-

Таблица 2

Матрица планирования и полученные значения функций отклика полного трехфакторного эксперимента

Факторы			Функция отклика	
x_1	x_2	x_3	y_1	y_2
—	—	—	250·10 ⁴	597
+	—	—	211·10 ⁴	1079
—	+	—	240·10 ⁴	687
+	+	—	223·10 ⁴	1254
—	—	+	234·10 ⁴	644
+	—	+	238·10 ⁴	742
—	+	+	254·10 ⁴	715
+	+	+	237·10 ⁴	781

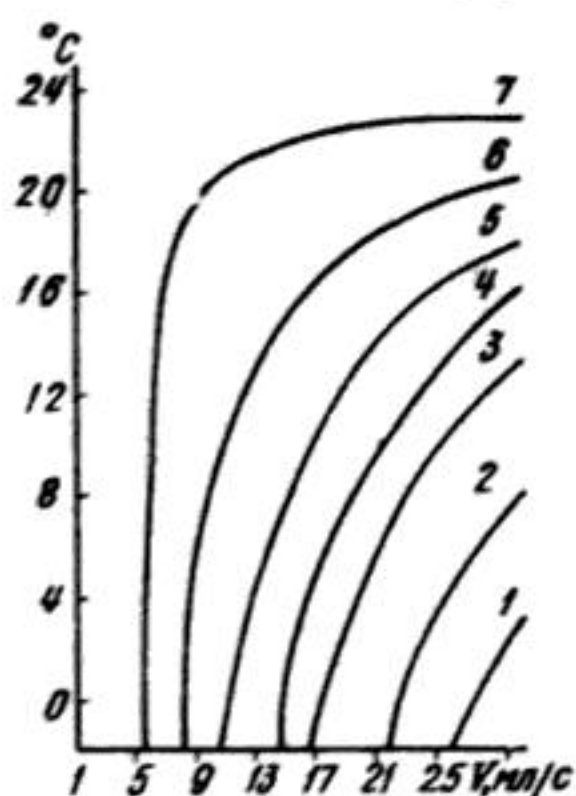
клика с учетом расчетной величины значимости (соответственно для функций отклика y_1 и y_2 —2; 12×10^4 и 88,65) рассчитаны величины коэффициентов, позволивших составить уравнения регрессии:

$$y_1 = 235,9 \cdot 10^4 - 8,6 \cdot 10^4 x_1 + 5,0 \cdot 10^4 x_3 + 5,2 \cdot 10^4 x_1 x_3, \quad (1)$$

$$y_2 = 812,5 + 151,4 x_1 - 92,0 x_3 - 110,8 x_1 x_3. \quad (2)$$

Проверка полученных уравнений на адекватность подтвердила, что они достаточно хорошо описывают исследуемый процесс. Обращает внимание однородный вид полученных уравнений. Это значит, что ис-

следующие факторы на принятые функции отклика y_1 и y_2 влияют весьма сходно. Так, отрицательное значение коэффициента при x_1 в уравнении (1) и положительное — в уравнении (2) показывают, что увеличение скорости ввода криопротектора уменьшает пропорционально его величине количество целых клеток и увеличивает гемолиз. Положительное значение коэффициента при факторе x_3 в уравнении (1) и отрицательное — в уравнении (2) свидетельствуют, что



Зависимость гемолиза эритроцитов от температуры и скорости приливания криопротектора ПЭО-1500:

1 — 1100 мг%; 2 — 1000;
3 — 900; 4 — 850; 5 — 800;
6 — 750; 7 — 700 мг%.

повышение температуры при вводе криопротектора в суспензию эритроцитов способствует их сохранности (увеличивает количество целых клеток и уменьшает их гемолиз) пропорционально величинам соответствующих коэффициентов.

Более полная расшифровка парного влияния факторов x_1 и x_2 проведена с помощью графоаналитической оценки их действия. Результаты ее указывают, что увеличение скорости ввода криопротектора значительно понижает сохранность эритроцитов при низких температурах и незначительно — при высоких.

Отсутствие в уравнениях регрессии фактора x_2 (интенсивность перемешивания суспензии эритроцитов при вводе криопротектора) свидетельствует о незначительности его влияния или вообще об отсутствии влияния этого фактора в исследуемом диапазоне его изменения. На рисунке приведена графическая интерпретация уравнения (2). Кривые 1—7 — изолинии функции отклика — гемолиз эритроцитов в координатах влияющих факторов: скорость ввода криопротектора в мл/с на 1 мл суспензии и температура в °С.

Повышение температуры системы способствует снижению отрицательного действия повышенных скоростей ввода криопротектора. Очевидно, подобные закономерности связаны с неодинаковой проницаемостью и различным допустимым осмотическим напором на мембраны эритроцитов при разных температурах.

При исследованных повышенных температурах мембраны, по-видимому, легче переносят осмотический напор воды, вызываемый обезвоживанием эритроцитов криопротектором.

1. Вишневский В. И., Душейко А. Г., Скорняков Б. А. Температурный режим введения криопротектора при замораживании эритроцитов. — В кн.: Первый Всесоюз. съезд гематологов и трансфузиологов (Баку, окт. 1979 г.): Тез. докл. Баку, 1979, с. 310—311.
2. Дервиз Р. В., Воробьев Б. И. Количественное определение Нв крови посредством аппарата ФЭК-М — Лаб. дело, 1959, 5, вып. 3, с. 3—5.
3. Кост Е. А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. — М.: Медицина, 1975. — 382 с.
4. Лобынцева Г. С., Маркова О. П., Полякова А. И. и др. Низкотемпературное консервирование ядерных клеток крови под защитой производных окиси этилена. — В кн.: Современные проблемы криобиологии и медицины. М.: Внешторгиздат, 1975, с. 85—90.
5. Саутин С. Н. Планирование эксперимента в химии и химической технологии. — Л.: Химия, 1975. — 47 с.
6. Яровский Б. Н., Детлаф А. А. Справочник по физике. — М.: Наука, 1974. — 332 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
25.05.79

М. М. Петров, О. В. Кушко, Л. Н. Юхимук

КРИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО ГЛИЦЕРИНА И ВЛИЯНИЕ НА НИХ НЕКОТОРЫХ ДОБАВОК ЭКСТРА- И ИНТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕЙСТВИЯ

Открытая в 1949 г. способность глицерина защищать эритроциты от разрушения при замораживании [13] легла в основу разработки методов их долгосрочного хранения. Последующий опыт применения в качестве криопротекторов глицерина и ряда других веществ (диметилсульфоксид, декстран, полиэтиленоксид, оксиэтилкрахмал, поливинилпирролидон и др.), обладающих разным механизмом взаимодействия с клеткой [1—7, 9—12], показал, что глицерин остается лучшим в их числе.

Один из важнейших недостатков применяющихся криопротекторов — необходимость отмывания деконсервированных эритроцитов от защитного вещества до переливания реципиенту. Это достаточно кропотливая и длительная процедура сопряжена с весьма реальной опасностью инфицирования трансфузионной среды. Следует подчеркнуть, что надежды, возлагавшиеся на криозащитные вещества с экстрацеллюлярным механизмом действия (ПВП и др.), связанные с возможностью отказаться от отмывания, не оправдались, и процесс отмывания остается одной из обязательных составных частей подготовки размороженных эритроцитов к переливанию. Следовательно, изыскание криозащитных агентов, не требующих отмывания после деконсервации, является одним из актуальных направлений проблемы криоконсервирования эритроцитов. В этой связи представляется перспективным использование оксиэтилированного глицерина (ОЭГ), включающего пять и более оксиэтильных звеньев, что обеспечивает такое снижение осмотического давления их растворов, которое не ведет к разрушению клеток при замене на изоосмотическую среду [8].

При изучении ОЭГ в качестве потенциального криопротектора, не требующего отмывания, возникал и другой вопрос — необходимость выявления возможностей улучшения криозащитных свойств ОЭГ путем сочетания с некоторыми веществами, оказывающими криопротекторный

Таблица 1

Некоторые показатели сохранности эритроцитов, криоконсервированных в растворах
ОЭГ 20- и 30%-ной концентрации, ЦОЛИПК-11, и № 1-ПВП $M \pm m$

Показатель	Криозащитный раствор			
	ОЭГ		ЦОЛИПК-11,	№ 1-ПВП
	20%-ный	30%-ный		
Гемолиз, %	$8,8 \pm 1,1$	$5,5 \pm 0,8$	$8,4 \pm 0,9$	$20,1 \pm 0,9$
Количество сфероцитов, %	29 ± 5	36 ± 6	15 ± 3	87 ± 9
Осмотическая резистентность к 0,6%-ному NaCl, %	$56 \pm 2,6$	$54 \pm 4,5$	0	$16 \pm 1,1$
Калий внутриклеточный, мг%	$196 \pm 10,8$	$220 \pm 5,0$	$238 \pm 9,5$	$176 \pm 5,3$
Калий внеклеточный, мг%	$87 \pm 6,8$	$79 \pm 8,1$	$48 \pm 4,1$	$116 \pm 8,1$

эффект. Таким образом, целью проведенного изучения являлось изыскание на основе использования ОЭГ (синтезированного в Харьковском институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР) нового ограждающего раствора для эритроцитов, не требующего отмывания. При этом ставились следующие задачи: определение оптимальной концентрации ОЭГ в криозащитном растворе; оценка влияния на криоза-

Влияние маннита на криопротекторные свойства

Показатель	После от-		
	Контроль		20%-ный
	20%-ный ОЭГ	2,5%	5%
Гемолиз, %	$8,0 \pm 0,65$	$10,2 \pm 0,6$	$9,3 \pm 1,7$
Осмотическая резистентность к 0,6%-ному NaCl, %	$59 \pm 3,1$	$63 \pm 7,9$	$63 \pm 5,9$
Нативная капля, %	743 ± 97	800 ± 26	814 ± 71
нормоциты	120 ± 28	194 ± 24	182 ± 68
шиповидные сфероциты	53 ± 12	6 ± 3	4 ± 3

щитные свойства растворов ОЭГ включений в виде маннита, ПВП, глюкозы, лактозы в различных концентрациях.

Для приготовления криоконсерванта, содержащего ОЭГ, необходимое количество вещества (с учетом содержания воды в препарате) растворяли в изотоническом растворе хлористого натрия. Раствор выдерживали при комнатной температуре в течение суток.

Консервировали эритроциты второго дня хранения в соотношении с криозащитным раствором 1:1. Замораживание производили в алюминиевых асимметричных контейнерах (после 30-минутной экспозиции при комнатной температуре) в жидком азоте при -196°C . Количество замораживаемой смеси составляло 50 мл. Оттаивание производили на водяной бане при $+42^{\circ}\text{C}$ при равномерном покачивании (вручную). Оценку биологической сохранности эритроцитов проводили до замораживания и после оттаивания по следующим показателям: степень гемолиза; осмотическая резистентность эритроцитов к 0,6- и 0,9%-ным растворам хлорида натрия; содержание внутри- и внеклеточного калия; форма эритроцитов в препарате нативной капли.

Для выявления оптимальной концентрации ОЭГ эритроциты взвешивали и замораживали в растворах 10-, 20-, 30- и 40%-ной исходной концентрации. Контролем служила взвесь эритроцитов в физиологическом растворе хлористого натрия. Опыты проведены на 10 образцах донорской крови. Сопоставление вели по степени гемолиза эритроцитов и их форме в препарате нативной капли. Наименьший гемолиз был в растворах ОЭГ 30- и 40%-ной концентрации. Однако при смешивании эритроцитов с 40%-ным раствором ОЭГ наступала резко выраженная агломерация, в 30%-ном растворе агломераты были единичны. Поэтому дальнейшие исследования проводились с 20- и 30%-ными растворами ОЭГ.

Исследования эритроцитов, замороженных в 20- и 30%-ных растворах ОЭГ, в сопоставлении с эритроцитами, замороженными с криоконсервантами ЦОЛИПК-11 и № 1-ПВП, проведены на 17 образцах донорской крови. Из табл. 1 видно, что после оттаивания эритроцитов наименьший гемолиз наблюдался во взвеси, криоконсервированной с ОЭГ 30%-ной концентрации. Содержание внутриклеточного калия здесь было достоверно выше, чем в эритроцитах, замороженных с ОЭГ 20%-ной концентрации.

Исследование введения в растворы ОЭГ таких присадок, как глюкоза (5, 10 и 20%), поливинилпирролидон (5, 10 и 15%), лактоза (5, 10 и 20%) и маннит (2,5, 5 и 7%) показало, что глюкоза и ПВП оказывают неблагоприятное влияние на клетки, проявляющееся в снижении осмотической резистентности деконсервированных эритроцитов; ПВП, кроме того, вызывал резко выраженную агломерацию их. Добав-

20- и 30%-ных растворов ОЭГ, $M \pm m$

таивания					
ОЭГ+маннит		Контроль	30%-ный ОЭГ + маннит		
	7%	30%-ный ОЭГ	2,5%	5%	7%
	9,0±1,5	6,1±0,86	4,0±0,3	4,4±0,5	5,3±0,7
	57±4,9	53±6,5	63±6,0	69±4,0	60±6,5
	807±40	679±116	830±29	798±57	854±44
	190±38	135±33	154±33	183±56	135±39
	3±2	186±40	16±10	18±17	11±9

ление лактозы существенно не изменяло криопротекторные свойства ОЭГ. Маннит, введенный в 20%-ный раствор ОЭГ, не менял показателей сохранности эритроцитов после оттаивания. Добавление маннита к 30%-ному раствору ОЭГ устраняло агломерацию эритроцитов, несколько снижало степень гемолиза во взвеси размороженных эритроцитов, улучшало их осмотическую резистентность и морфологическое состояние. Так, если в контрольном растворе (30% ОЭГ) после оттаивания количество дискоидных форм эритроцитов составляло $679 \pm 116\%$, сфероцитов — $186 \pm 40\%$, то при добавлении маннита количество дискоидных форм значительно возрастало, сферических — снижалось (табл. 2).

Заключение. Таким образом, изучение криозащитной активности оксиэтилированного глицерина ($n=30$), синтезированного в Харьковском институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, показало следующее:

1. Оксиэтилированный глицерин в концентрациях 20 и 30% по криозащитному действию приближается к разрабатываемому криопротектору, не требующему отмывания, поскольку осмотическая устойчивость деконсервированных эритроцитов превышает 50%.

2. Указанные растворы ОЭГ по ограждающей эффективности значительно превосходят принятые в нашей стране криоконсерванты ЦОЛИПК-114 и N1-ПВП, обеспечивая меньшую степень разрушения и более высокую осмотическую стойкость эритроцитов.

3. Маннит в концентрации 2,5, 5 и 7% несколько улучшает криопротекторные свойства ОЭГ.

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е., Гинзбург Ф. Р. и др. Долгосрочное хранение крови в замороженном состоянии. — Воен.-мед. журн., 1966, № 1, с. 27—33.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Крутиков В. А., Тальская И. Н. и др. Применение поливинилпирролидона при ультрабыстром замораживании цельной крови и эритроцитной массы и рациональные пути использования их для трансфузии в клинике. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1969, № 1, с. 41—48.
3. Лаврик С. С., Полубояринова А. Г., Кушко О. В. и др. Консервирование эритроцитов глубоким замораживанием при применении низкомолекулярного поливинилпирролидона. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1973, № 9, с. 15—19.
4. Михнович Е. П., Рождественская М. А., Недельский Г. Т. Криоконсервация эритроцитов при -196° с проникающими и непроникающими веществами. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, 1974, с. 161—164.
5. Пушкарь Н. С., Калугин Ю. В., Степин Л. Д. и др. К вопросу о механизме действия криофилактиков группы полиэтиленоксида. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, 1974, с. 26—29.
6. Рудченко А. В. К вопросу о внутренних напряжениях в криофилактиках на основе глицерина при низких температурах. — В кн.: Болезни крови, кровезаместители, консервирование крови. М., 1975, с. 90—91.

7. Шраго М. И. Замораживание эритроцитов в растворах полиэтиленоксида. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1971, № 6, с. 17—19.
8. Шраго М. И., Калугин Ю. В., Кочуровская Г. Г. и др. Влияние оксиэтилирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина. — Криобиология и криомедицина, 1976, № 2, с. 31—33.
9. Bricka M., Bessis M. On the preservation of erythrocytes by freezing at low temperatures in the presence of PVP and dextran. — C. r. Soc. biol., 1955, 149, N 9/10, p. 875—877.
10. Mannoni P., Beaujean F., Forestier Ch. le. Conservation des hematies par congelation en azote liquide. Utilisation du regenerateur de sang. — Rev. franc. transfus., 1975, 18, N 4, p. 425—428.
11. Meryman H. Cryoprotective agents. — Cryobiology, 1972, 9, N 4, p. 262.
12. Richards C. A. Initial clinical experience with liquid nitrogen preserved blood, employing PVP as a protective additive. — Amer. J. Surg., 1964, 108, N 2, p. 313—322.
13. Smith A. Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood cells. — Lancet, 1950, N 11, p. 910—911.

Киевский научно-исследовательский
институт гематологии
и переливания крови МЗ УССР

Поступила в редколлегию
13.08.79

УДК 57.043:615.9

В. М. Гучок, Э. А. Зборовская

О ТОКСИЧНОСТИ α -ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЯ

Пропиленгликоль обладает криозащитными свойствами [7] и служит исходным продуктом при поиске новых криопротекторов. Он рекомендуется в качестве источника энергии при парентеральном питании [1, 2], используется в фармацевтической практике [8] в качестве растворителя лекарственных веществ (антибиотиков, барбитуратов, витаминов А и Д, сульфаниламидов и др.). В СССР применяется пропиленгликоль зарубежного изготовления.

Пропиленгликоль (1,2-пропандиол, α -пропиленгликоль) — представляет собой жидкость с молекулярной массой 76,09, относительной плотностью (d_4^{20}) — 1,040 и неограниченной растворимостью в воде при 20°C. Кипит при температуре 189°C [3].

В литературе имеются лишь единичные сообщения о токсичности вещества при парентеральном введении в организм [1, 8]. Токсичность отечественного образца α -пропиленгликоля, предлагаемого для применения в указанных выше целях, вообще не изучена.

Предметом настоящего исследования явилось изучение токсичности α -пропиленгликоля отечественного изготовления. При этом его острую токсичность сравнивали с токсичностью α -пропиленгликоля зарубежного изготовления (ГДР), применяемого в фармацевтической практике СССР.

Методы исследования. Опыты проведены на 120 беспородных белых мышах обоего пола массой 18,0—20,0 г и 131 беспородной белой крысе обоего пола массой 90,0—120,0 и 150,0—175,0 г. Использованы α -пропиленгликоль, изготовленный ПО «Азот» (ТУ-6-09-2434-72) и α -пропиленгликоль, выпускаемый в ГДР.

Сравнительное исследование токсичности проведено в острых опытах на мышах при введении неразведенного вещества подкожно и через рот и на крысах — внутривенно и внутрь. Все животные были разделены на равные группы по шесть в каждой. Наблюдение за животными проводилось в течение 72 ч с момента введения вещества. Учитывали выживаемость и общее состояние животных. Расчет ДЛ-50 проведен по В. Б. Прозоровскому [5]. В хронических опытах на 35 крысах с начальной массой в 150,0—175,0 г, разделенных на две группы, изучена токсичность малой дозы отечественного α -пропиленгликоля.

Животным опытной группы (19 крыс) вещество вводилось вместе с пищей в дозе 3,15 мл/кг (3,28 г/кг) массы пять раз в неделю в течение 3 мес. Исследуемая доза составила 10% максимально вводимой крысам в острых опытах, которая, судя по данным литературы, близка к максимально переносимой. В пищу животных контрольной группы добавлялись соответствующие объемы воды.

В ходе эксперимента в динамике изучались показатели периферической крови (гемоглобин, СОЭ, эритроциты, лейкоциты и лейкограмма), электрокардиограмм, некоторые показатели функционального состояния почек — водный диурез, удельная масса мочи (весовым методом), сахар по Бенедикту [4], микроскопия осадка мочи, а также показатели весовых коэффициентов внутренних органов и их микроскопическая структура, общее состояние и динамика массы животных. Полученные экспериментальные данные подвергнуты статистической обработке.

Результаты и их обсуждение. В острых опытах изучены картина интоксикации и степень токсичности α -пропиленгликоля. Подкожное введение белым мышам неразбавленного вещества в дозах, меньших среднесмертельной, сопровождалось быстро наступающим учащением дыхания и общим угнетением животных продолжительностью до 20—30 мин. Дозы вещества, близкие в ДЛ-50 или превышающие ее, вызывали одышку, резкое общее угнетение и нарушение координации движений, периодические тонические судороги, цианоз и гибель части или всех животных, которая обычно наступала через 30 мин — 24 ч после введения вещества. Продолжительность жизни погибших крыс зависела от величины смертельной дозы и путей применения вещества. Аналогичные по характеру симптомы интоксикации наблюдались и после введения вещества через рот. При внутривенном введении α -пропиленгликоля белым крысам характер интоксикации не изменился, но развивалась она более быстро и бурно.

Введение крысам вещества через рот в дозах 20,8—32,75 г/кг приводило к развитию характерной картины интоксикации. Однако в течение 72-часового срока наблюдения животные не погибали и уже на вторые сутки внешне не отличались от интактных. Большие дозы вещества применять через рот было невозможно из-за превышения допустимых объемов введения. Данные о степени токсичности α -пропиленгликоля, полученные в острых опытах, приведены в табл. 1, из которой следует, что отечественный образец α -пропиленгликоля является малотоксичным веществом и по данным острой токсичности при парентеральном введении не отличается от зарубежного.

Т а б л и ц а 1

Показатели токсичности неразбавленного α -пропиленгликоля
для белых мышей и крыс обоего пола

Вещество	Животные	Способ введения	Токсичность, г/кг массы		ДЛ-84
			ДЛ-16	ДЛ-50 и ее доверительные границы	
α -пропиленгликоль (Кемерово)	Белые мыши	Подкожно	11,02	17,37 (12,83÷21,91)	23,92
	То же	Через рот	16,64	20,3 (17,9÷22,7)	23,75
	Белые крысы	Внутривенно	10,92	13,1 (11,56÷14,64)	15,29
α -пропиленгликоль (ГДР)	Белые мыши	Подкожно	13,52	19,5 (15,58÷23,42)	24,70
	Белые крысы	Внутривенно	10,92	12,68 (11,48÷13,68)	14,35

Дальнейшее исследование токсичности α -пропиленгликоля проведено в плане изучения его безвредности в хроническом эксперименте на крысах. Изучаемые показатели исследовались до введения вещества, через один, два и три месяца после начала его применения.

Все животные в ходе эксперимента увеличивались по массе, положительная динамика которой обеих групп крыс значимо не отличалась между собой. Не отмечено каких-либо различий в общем состоянии опытных и контрольных животных.

Полученные средние величины 4-часового водного диуреза колебались в пределах $2,7 \pm 0,38$ — $8,1 \pm 0,62$ мл. Показатели диуреза, удельного веса мочи опытных и контрольных крыс во все периоды наблюдения значимо не различались между собой. В осадке мочи опытных и контрольных животных отмечались в примерно одинаковых количествах кристаллы солей мочевой кислоты, изредка лейкоциты и клетки мочевыводящих путей. Эритроциты, цилиндры и клетки почечного эпителия не обнаруживались. Сахар в моче всех животных отсутствовал.

Показатели электрокардиограммы, СОЭ, содержание гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов, лейкограммы во все периоды наблюдения в обеих группах животных не выходили за пределы известных физиологических колебаний и значимо не отличались между собой.

При патологоанатомическом вскрытии животных не выявлено заметных патологических изменений. Показатели коэффициентов массы внутренних органов опытных и контрольных животных (табл. 2) зна-

Т а б л и ц а 2

Весовые коэффициенты внутренних органов крыс

Животные	Количество животных	Статистические критерии	Весовые коэффициенты, г/100 г массы тела животных						
			Сердце	Легкие	Печень	Почки		Надпочечники	Селезенка
						левая	правая		
Крысы опытной группы Сравнение средних	19	$\bar{x}_1 \pm Sx$	$0,32 \pm 0,0079$	$0,75 \pm 0,0042$	$3,19 \pm 0,123$	$0,36 \pm 0,023$	$0,37 \pm 0,022$	$0,04 \pm 0,003$	$0,39 \pm 0,047$
		p	$<0,1$	$>0,5$	$<0,5$	$<0,5$	$>0,5$	$>0,5$	$<0,25$
Крысы контрольной группы	16	$\bar{x}_1 \pm Sx_1$	$0,30 \pm 0,0074$	$0,73 \pm 0,030$	$3,06 \pm 0,073$	$0,34 \pm 0,013$	$0,36 \pm 0,011$	$0,04 \pm 0,002$	$0,51 \pm 0,087$

чимо не отличались между собой. При гистологическом исследовании внутренних органов не найдено существенных изменений в их структуре.

Комплекс полученных данных позволяет заключить, что α -пропиленгликоль производства ПО «Азот» при однократном парентеральном его введении в организм животных даже в неразбавленном виде согласно укрупненной классификации, утвержденной пленумом Секции предельно допустимых концентраций [6], является малотоксичным веществом.

Отечественный α -пропиленгликоль в дозе, близкой к 1/10 части, предельно переносимой для белых крыс, при длительном (в течение 3 мес.) его введении животным через рот не вызывает патологических сдвигов изученных нами показателей. По-видимому, эта доза близка к безвредной для крыс при введении через рот.

α -Пропиленгликоль отечественного изготовления по токсичности существенно не отличается от 1,2-пропандиола и других зарубежных

образцов [8], изготавливаемых в ГДР, что позволило нам рекомендовать его для практического использования в указанных выше целях взамен зарубежного.

Результаты изучения α -пропиленгликоля, полученные в острых и хронических опытах на белых мышах и крысах, а также данные литературы позволяют сделать следующие выводы:

1. 1,2-пропандиол при однократном подкожном и внутривенном введении в организм согласно классификации Секции ПДК относится к малотоксичным веществам. Его ДЛ-50 для мышей (подкожно) составила 17,37 (12,83÷21,91) г/кг и для крыс (внутривенно) — 13,1 (11,56÷14,64) г/кг массы.

2. Длительное (в течение 3 мес.) введение α -пропиленгликоля через рот в дозе, примерно равной 1/10 части максимально переносимой для крыс, не нарушает его общего состояния и положительной динамики массы животных, состава периферической крови, сердечно-сосудистой деятельности, функции почек и не изменяет микроскопическую структуру внутренних органов животных.

1. Бауман В. Р., Кохта А. Я., Кремер Ю. Н. Гепатоксическое действие некоторых метаболизирующих спиртов при их парентеральном введении. — Изв. АН Лат. ССР, 1970, № 7, с. 64—69.
2. Кремер Ю. Н., Шмидт А. А. Обеспечение пластических и энергетических потребностей организма парентеральным путем (современное состояние вопроса и перспективы). — Вопр. питания, 1971, 30, № 2, с. 3—12.
3. Люблина Е. И., Бройтман А. Я. Спирты и фенолы. — В кн.: Вредные вещества в промышленности. I. Органические вещества / Под общей ред. Н. В. Лазарева и Э. Н. Левиной. 7-е изд. перераб. и доп. Л.: Химия, 1976, с. 364—365.
4. Предтеченский В. Е. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям / Под ред. Л. Г. Смирновой и Е. А. Кост. — 5-е изд. перераб. и доп. — М.: Медгиз, 1960. — 962 с.
5. Прозоровский В. Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. — Фармакология и токсикология, 1962, № 1, с. 115—120.
6. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М.: Медицина, 1975. — 328 с.
7. Karow A. M. Cryopreservation: Pharmacol. considerat. — In: Organ preservation for transplantation. Boston: Little, Brown and Co, 1974, p. 86—107.
8. Krowczyński L. Technologia leków parenteralnych. — Warszawa: Państw. Zakt. wyd. lek., 1966. — 290 s.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,

Поступила в редколлегию
06.02.78

Харьковский научно-исследовательский
химико-фармацевтический
институт Министерства
медицинской промышленности СССР

УДК 57.043.615.9

В. М. Гучок

О ТОКСИЧНОСТИ ГЛИЦЕРИНА И ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО ГЛИЦЕРИНА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 1412 ДЛЯ КРЫС И МЫШЕЙ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Глицерин используется в медицинской практике для борьбы с отеком мозга, в качестве криопротектора при криоконсервировании клеток крови и костного мозга и в других целях. Оксиэтилированный глицерин со средней молекулярной массой 1412 (ОЭГ—1412), синтезированный Г. Г. Кочуровской, Н. М. Матвиец и Т. П. Линник в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, является перспективным криопротектором для низкотемпературного консерви-

рования эритроцитов человека, не требующим отмывания перед введением размороженных клеток в организм. Использование размороженных эритроцитов вместе с криопротектором и глицерина перспективно и для детской клинической практики. В литературе нам не удалось найти сведений о токсичности глицерина для молодых животных и детей. ОЭГ-1412 в этом аспекте также не изучен. Вместе с тем известны выраженные морфологические особенности и различия физиологических функций животных и детей на различных этапах их постнатального развития. Все это и послужило основанием для настоящего исследования, посвященного сравнительному изучению токсичности глицерина и оксиэтилированного глицерина для животных ранних периодов постнатального развития и взрослых особей.

Методы исследования. Опыты проведены на беспородных белых крысах и мышах обоего пола различных возрастных групп — от новорожденных до половозрелых. В соответствии с рекомендациями И. А. Аршавского [1], Д. У. Эрматовой [7], В. Д. Розановой (5) и других исследователей все животные были разделены на указанные в табл. 1 и 2 группы. Всего было использовано 300 крысят, 410 мышат, 60 половозрелых крыс и 60 половозрелых мышей. Глицерин квалификации «ЧДА» и ОЭГ-1412 вводили внутрибрюшинно однократно в 20%-ных растворах, приготовленных на 0,9%-ном растворе NaCl (1).

Интегральным показателем токсичности, отражающим всю совокупность развивающихся морфофункциональных изменений, считали гибель животных и ее сроки в течение 2-недельного наблюдения.

Верхние параметры токсичности определяли методом пробит-анализа по В. Б. Прозоровскому [4]. Кроме того, для всех возрастных групп животных вычисляли показатель функции угла наклона (S) по Литчфилду и Уилкоксону [9], суммарный показатель опасности по фор-

муле $\frac{1}{\text{ДЛ-50} \cdot S}$ (2), приведенной И. С. Саноцким и И. П. Улановой [6],

и коэффициент видовой чувствительности.

Результаты и их обсуждение. Из табл. 1 видно, что для новорожденных животных токсичность глицерина была самой низкой для обоих видов животных. Для новорожденных крысят ДЛ-50 в 2,58 раза превысила соответствующие дозы взрослых животных, а у мышат — в 2,33 раза. Затем в процессе раннего постнатального онтогенеза животных токсичность глицерина постепенно нарастала и к 3 — 3,5-недельному возрасту крысят и 4-недельному возрасту мышат достигла уровня взрослых.

Токсичность оксиэтилированного глицерина (табл. 2) для крысят и мышат всех ранних этапов их постнатального развития была значительно ниже уровня, установленного для взрослых животных. Среднесмертельная доза ОЭГ-1412 для новорожденных крысят в 2,84 раза и мышат в 1,85 раза превысила ДЛ-50 взрослых особей. С увеличением возраста мышат токсичность веществ непрерывно снижалась и к 27—30-дневному возрасту была в 2,86 раза ниже уровня, установленного для взрослых животных. Лишь к 1,5-месячному возрасту токсичность ОЭГ-1412 начала возрастать, не превысив, однако, к этому сроку своей первоначальной величины, и только к периоду половозрелости мышей достигла уровня взрослых животных.

В опытах на крысятах токсичность ОЭГ-1412 существенно повысилась к возрасту 5—10-дневному и была лишь в 1,56 раза ниже уровня, присущего взрослым особям. Однако по мере развития животных она постепенно снижалась и к 27—30-дневному возрасту вновь достигла уровня периода новорожденности. К 1,5-месячному возрасту крысят токсичность ОЭГ-1412 соответствовала степени, присущей взрослым животным.

Таблица 1

Данные о токсичности глицерина для белых крыс и мышей
при внутрибрюшинном введении в постнатальном онтогенезе

Вид и возраст животных	Токсичность, г/кг			Некоторые другие критерии опасности развития острого смертельного отравления		Коэффициент видовой выносливости
	ДЛ-16	ДЛ-50 и ее доверительные границы	ДЛ-84	S	1	
					ДЛ-50 · S	
Крысы взрослые, ♂	6,17	7,35 (6,68÷8,01)	8,40	1,16	0,1165	1,06
Крысы взрослые, ♀	5,58	6,66 (5,92÷7,40)	7,73	1,18	0,1272	1,04
Крысята 2—3-дневные	13,88	17,18 (14,05÷20,32)	20,47	1,21	0,0481	1,05
Крысята 5—10-дневные	11,15	13,90 (11,91÷16,21)	17,40	1,23	0,0584	1,07
Крысята 11—17-дневные	7,95	9,92 (8,05÷11,79)	11,90	1,37	0,0735	1,10
Крысята 18—26-дневные	5,66	7,31 (5,83÷8,79)	8,96	1,21	0,1130	1,66
Крысята 27—30-дневные	6,32	8,82 (6,67÷10,96)	11,34	1,39	0,0815	1,16
Мыши взрослые, ♂	3,90	6,93 (5,25÷9,15)	9,94	1,61	0,0895	1,04
Мышата 2—3-дневные	14,14	16,21 (14,55÷17,87)	18,40	1,13	0,0546	1,05
Мышата 5—10-дневные	11,69	12,96 (11,87÷14,04)	14,22	1,11	0,0695	1,07
Мышата 11—17-дневные	5,08	9,13 (5,49÷12,76)	13,17	1,62	0,0676	1,10
Мышата 18—26-дневные	7,92	12,17 (9,51÷14,83)	16,42	1,44	0,0570	1,66
Мышата 27—30-дневные	7,03	7,20 (6,94÷7,47)	7,42	1,03	0,1348	1,16
Мышата 1,5-месячные	6,78	7,92 (7,10÷8,74)	9,12	1,16	0,1088	—

При сравнении полученных данных (рис. 1 и 2) обращает на себя внимание существенное различие изменений токсичности глицерина и оксиэтилированного глицерина в процессе постнатального развития белых крыс и мышей. Изменения токсичности глицерина для обоих видов животных носят однонаправленный линейный характер. Токсич-

Таблица 2

Данные о токсичности ОЭГ-1412 для белых крыс и мышей
при внутрибрюшинном введении в постнатальном онтогенезе

Вид и возраст животных	Токсичность, г/кг			Некоторые другие критерии опасности развития острого смертельного отравления		Коэффициент видовой выносливости
	ДЛ-16	ДЛ-50 и ее доверительные границы	ДЛ-84	S	1	
					ДЛ-50 · S	
Крысы взрослые, ♂	4,68	7,90 (6,23÷9,57)	11,10	1,55	0,0810	1,07
Крысята 2—3-дневные	17,55	22,50 (18,63÷26,39)	27,45	1,22	0,0364	1,66
Крысята 5—10-дневные	9,94	12,39 (10,29÷14,49)	14,85	1,22	0,0661	1,25
Крысята 11—17-дневные	10,90	14,44 (11,42÷17,46)	17,98	1,28	0,0541	1,34
Крысята 18—26-дневные	17,64	19,24 (18,22÷20,42)	21,04	1,09	0,0472	1,12
Крысята 27—30-дневные	10,99	20,75 (16,46÷26,14)	30,48	1,68	0,0286	1,01
Крысята 1,5 месячные	4,68	7,27 (6,15÷9,46)	11,10	1,54	0,0892	2,22
Мыши взрослые, ♂	5,12	7,33 (6,11÷8,79)	9,54	1,87	0,0729	1,07
Мышата 2—3-дневные	9,68	13,52 (11,53÷15,50)	17,34	1,38	0,0556	1,66
Мышата 5—10-дневные	9,14	15,58 (10,33÷20,84)	22,04	1,56	0,0411	1,25
Мышата 11—17-дневные	16,35	19,38 (16,50÷22,25)	22,40	1,17	0,0441	1,34
Мышата 18—26-дневные	10,95	17,34 (14,94÷20,11)	23,66	1,47	0,0392	1,12
Мышата 27—30-дневные	16,00	21,00 (17,17÷24,83)	26,00	1,32	0,0360	1,01
Мышата 1,5-месячные	13,27	16,20 (14,12÷18,28)	19,20	1,20	0,0514	2,22

ность вещества постепенно повышается и задолго до развития у крыс и мышей половозрелости достигает уровня, свойственного взрослым животным.

Изменения токсичности оксиэтилированного глицерина для обоих видов животных носят разнонаправленный характер. В процессе

развития мышат токсичность вещества вначале постепенно снижается и, достигнув наименьшей выраженности, затем к периоду половозрелости возрастает до уровня, присущего взрослым животным. Кривая изменений токсичности ОЭГ-1412 для крысят имеет вид ломаной линии с двумя изгибами. При этом повышение токсичности после периода новорожденности сменяется постепенным ее снижением к исходно-

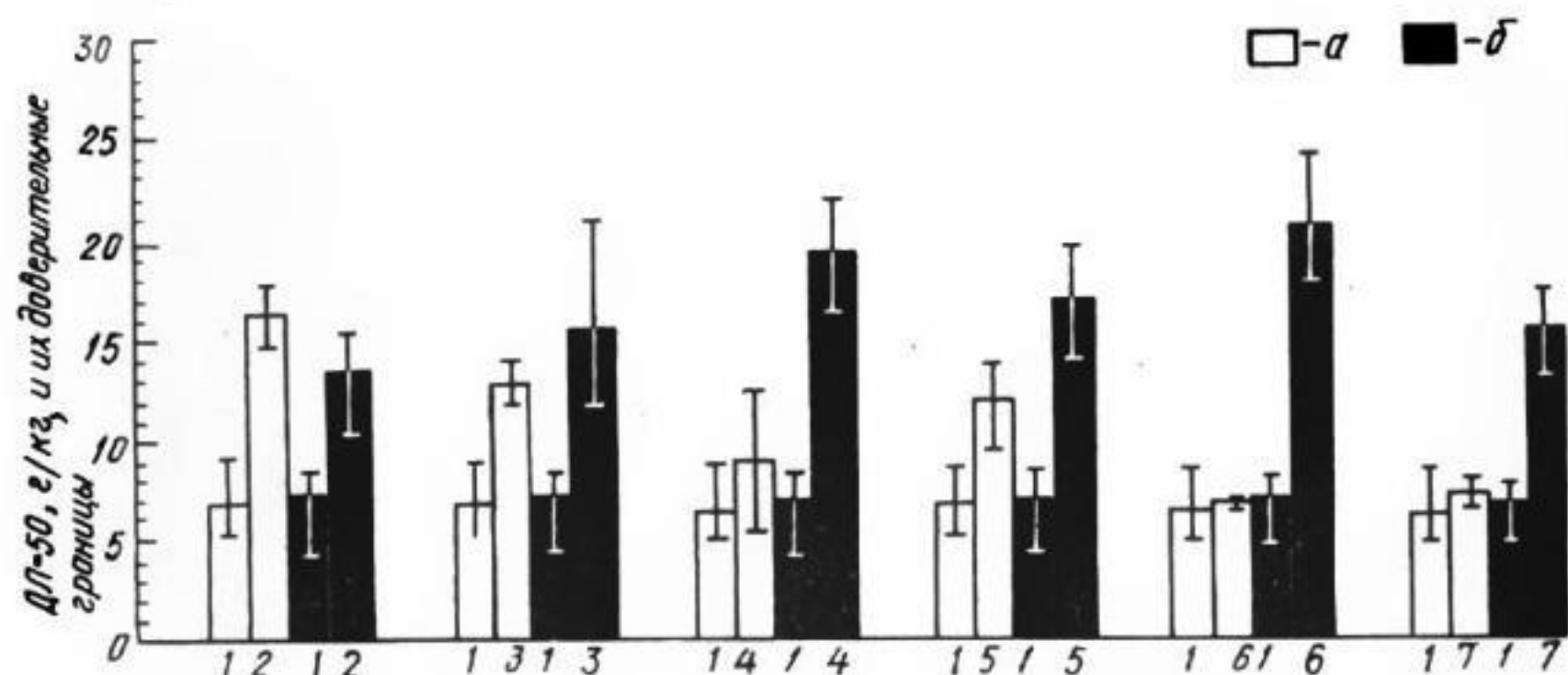


Рис. 1. Изменение токсичности глицерина и оксиэтилированного глицерина для крыс в постнатальном онтогенезе:

a — глицерин ЧДА; б — ОЭГ-1412; 1 — крысы взрослые, 2 — 6 — соответственно крысята 2—3-; 5—10-; 11—17-; 18—26-; 27—30-дневные; 7 — крысята 1,5-месячного возраста.

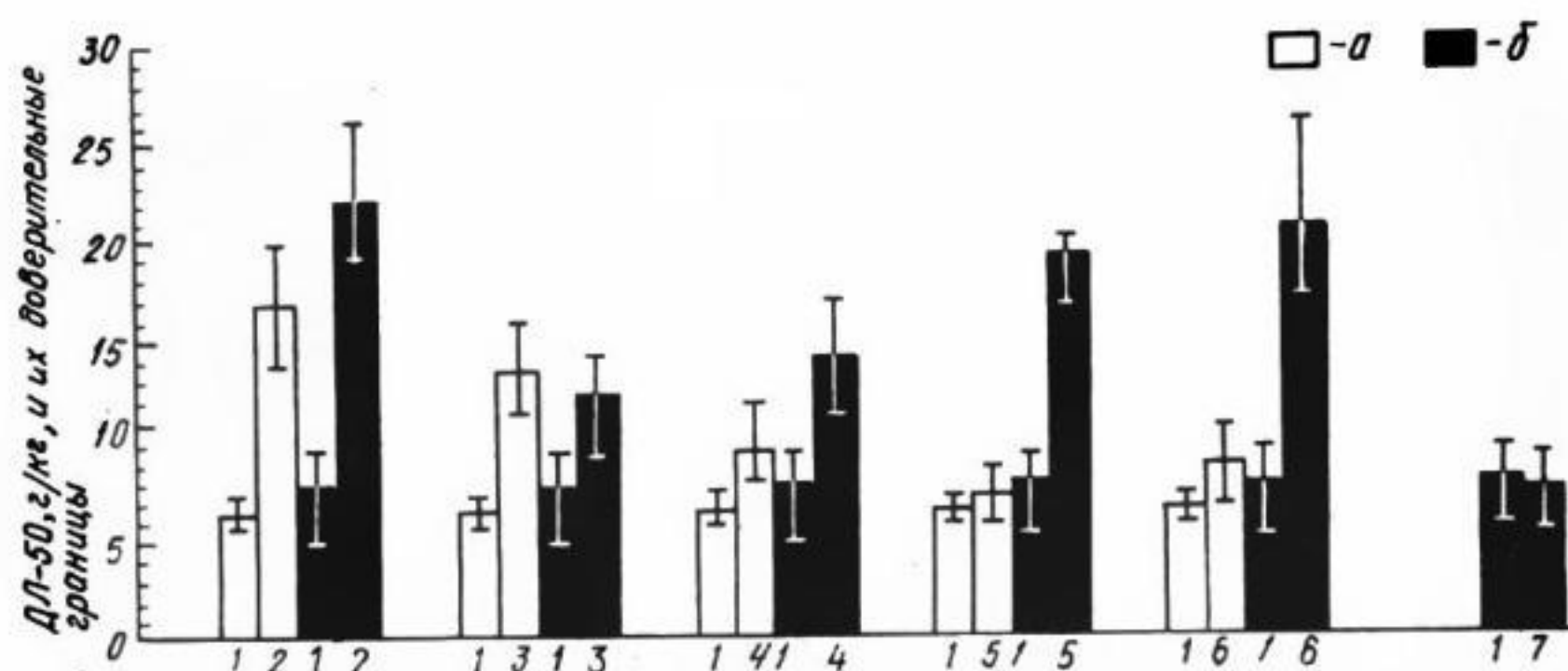


Рис. 2. Изменение токсичности глицерина и оксиэтилированного глицерина для мышей в постнатальном онтогенезе:

a — глицерин ЧДА; б — ОЭГ-1412; 1 — мыши взрослые, 2—6 — соответственно мышата 2—3-, 5—10-, 11—17-, 18—26-, 27—30-дневные; 7 — мышата 1,5-месячного возраста.

му состоянию и затем новым резким нарастанием до уровня, свойственного взрослым крысам. Из других показателей опасности развития острого смертельного отравления (см. табл. 1 и 2) также видно, что степень риска отравления у крысят и мышат, как правило, ниже опасности для взрослых животных. Однако она не полностью соответствует изменениям среднесмертельных доз глицерина в раннем постнатальном онтогенезе животных. Гибель крысят, мышат и взрослых животных в ходе экспериментов при введении исследуемых веществ наступала примерно в одни и те же сроки.

Коэффициенты видовой чувствительности веществ во все возрастные периоды животных не превышали 1,01—2,2 (см. табл. 1 и 2), что, по данным литературы [6], свидетельствует о невыраженности различий видовой чувствительности.

Мы не изучали причин столь выраженных различий степени раннего постнатального периода их развития и половозрелых крыс и мы-

шей. Однако правомерно предположить, что в основе их лежит определенный комплекс изученных авторами [1—3; 5, 7, 8, 10, 11] морфологических особенностей и различий физиологических функций и их регуляторных механизмов, свойственных животным и детям разных периодов постнатального развития, а также различия химической структуры веществ.

Полученные в работе данные характеризуют реакцию молодых животных на вещества, обладающие гидратационно-дегидратационным типом действия, и представляют практический и теоретический интерес.

Выводы. Белые крысы и мыши в период раннего постнатального развития более резистентны к однократному воздействию больших доз глицерина и оксиэтилированного глицерина, чем взрослые животные.

Степень и направленность изменений токсичности глицерина и оксиэтилированного глицерина существенно различаются между собой и зависят от химической структуры веществ и этапов постнатального развития животных. При этом видовые отличия чувствительности животных остаются невыраженными.

Токсичность глицерина для крыс и мышей с возрастом постепенно повышается и задолго до развития у них половозрелости достигает уровня, свойственного взрослым животным.

Динамика токсичности оксиэтилированного глицерина отличается большей длительностью повышенной резистентности обоих видов животных, неравномерностью и разнонаправленностью изменений. С развитием мышей токсичность вещества постепенно снижается и, достигнув к 4-недельному сроку наименьшей выраженности, к периоду половозрелости возрастает до уровня, присущего взрослым животным. С развитием крыс некоторое повышение токсичности криопротектора после периода новорожденности сменяется постепенным ее снижением к 4-недельному возрасту до исходного низкого уровня и к 1,5-месячному сроку — новым повышением до величин, свойственных взрослым особям.

Установленные особенности токсичности глицерина и оксиэтилированного глицерина необходимо учитывать при использовании их в детской клинической практике.

1. Аршавский И. А. Очерки по возрастной физиологии. — М.: Медицина, 1967. — 476 с.
2. Гинецинский А. Г. Физиологические механизмы водно-солевого равновесия. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1963. — 427 с.
3. Гундобин Н. П. Особенности детского возраста. — СПб.: 1906. — 122 с.
4. Прозоровский В. Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. — Фармакология и токсикология, 1962, № 1, с. 115—119.
5. Розанова В. Д. Очерки по экспериментальной возрастной фармакологии. — Л.: Медицина, 1968. — 223 с.
6. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М.: Медицина, 1975. — 328 с.
7. Эрматова Д. У. К анализу коррелятивных соотношений между интенсивностью энергетических затрат, деятельностью дыхательной и сердечно-сосудистой системы у крыс и кроликов в процессе постнатального развития: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М.: 1965. — 16 с.
8. Krasnogorski N. J. Über die Störungen des Wasserhaushaltes (Saltznährschaden) bei Säuglingen. — Jahrb. Kinderheilkunde, 1909, 72, S. 373—375.
9. Litchfield J. T., Wilcoxon I. and F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1949, 96, N 2, p. 99—113.
10. McCance R., Wilkinson E. Response of adult and suckling rats to administration of water and hypertonic solution of urea and salts. — J. Physiol., 1947, 106, p. 256.
11. McCance R., Joung W. The secretion of urine by newborn infants. — J. Physiol., 1941, 99, p. 265.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
14.09.79

УДК 57.043

*А. Е. Баранов, Д. М. Мхеидзе, Г. Д. Селидовкин,
С. И. Шерешков, Е. К. Пяткин, Н. И. Белянчикова*

ВОССТАНОВЛЕНИЕ МИЕЛОПОЭЗА АУТОЛОГИЧНЫМИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПРИ БЛАСТНОМ КРИЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

В последние годы доказана способность лейкоцитов периферической крови восстанавливать миелопоэз у крупных лабораторных животных после облучения в суперлетальных дозах [4—7, 18]. Клинические наблюдения показывают, что после инфузий лейкомассы, полученной от здоровых доноров [8] или больных хроническим миелолейкозом [11], у реципиентов в состоянии иммунодепрессии может возникнуть вторичная болезнь или произойти временное восстановление миелопоэза из донорских клеток. Эти экспериментальные и клинические наблюдения, а также высокий уровень коммитированных гранулоцитарно-моноцитарных предшественников в периферической крови больных хроническим миелолейкозом [14] позволяют полагать, что можно обратить бластный криз хронического миелолейкоза (БК ХМЛ) в стабильную фазу заболевания с помощью трансплантации аутологичных криоконсервированных лейкоцитов периферической крови после эрадицирующего лечения цитостатиками [17].

В 1978 г. были опубликованы результаты указанного способа лечения БК ХМЛ у двух больных [10, 22]. Нами также предпринята попытка получить восстановление миелопоэза с помощью аутологичных криоконсервированных лейкоцитов, введенных больной с БК ХМЛ после очередного курса цитостатического лечения.

Методы. Лейкоциты периферической крови получали с помощью сепаратора клеток крови («Аминко») обычным способом [2, 11, 12]. Лейкомассу переносили из пластикового мешка в стеклянный стакан и оставляли при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ на ночь. Утром отделяли плазму вместе со слоем лейкоцитов (эритроциты выбрасывали). К плазме с лейкоцитами добавляли 15% полиэтиленоксида (ПЭО) или 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Материал разливали по 8 мл в полиэтиленовые пробирки емкостью 10 мл или по 150—170 мл в полиэтиленовые контейнеры емкостью 200 мл. Замораживание вели по программе: $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры -40°C , $5^{\circ}/\text{мин}$ до -80 и $20^{\circ}/\text{мин}$ до -120°C . Затем пробирки и контейнеры помещали в жидкий азот (-196°C). Размораживание осуществляли в водяной бане при температуре $+40^{\circ}\text{C}$. После размораживания лейкомассу переливали в большие центрифужные стаканы и добавляли равное по объему количество полиглюкина (6%-ный раствор декстрана). Содержимое стаканов перемешивали, центрифугировали при 1400 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость выбрасывали. Отмывание клеток повторяли дважды, если для консервации использовали ДМСО. После отмывания клетки вновь ресуспендировали в полиглюкине, переносили в одну емкость и в таком виде переливали внутривенно через обычную систему для гемотрансфузий. Время от начала оттаивания до окончания инфузии лейкомассы составляло 5—7 ч. Количество КОЕ_к определяли по методу, описанному в литературе [15].

История болезни. Хронический миелолейкоз у больной К., 38 лет выявлен при случайном исследовании крови в декабре 1975 г. Диагноз подтвержден цитогенетическими исследованиями костного мозга — Ph'-хромосома на 100% метафаз. Больная не жаловалась, селезенка не пальпировалась, лейкоциты 150 000—250 000 /мкл.

До начала цитостатического лечения с 1 по 16 марта 1976 г. проведено три цитофереза, получено и заморожено около 500×10^9 лейкоцитов. Лейкоцитарная формула лейкомаcсы была приблизительно такой же, как и периферической крови: бласты 2,5%; пмц 3,5%; мц 24,5%; ммц 11,5%; п 21,5%; с 22,5%; баз 3,5%; эоз 5,0%; лимф 3,5%; мон 2,0%.

В дальнейшем проводилось курсовое лечение обычными дозами миелосана. Бластный криз диагностирован в октябре 1978 г. — слабость, субфебрильная температура, анемия, тромбоцитопения, лейкопения (2000—3000 /мкл), в периферической крови количество бластных клеток 5—7%, в костном мозге — 98%, клеточность костного мозга — 315 000 /мкл.

С 11 по 15 октября и с 29 ноября по 4 декабря 1978 г. проведено лечение цитозаром и рубомицином в относительно небольших дозах ввиду выраженной лейкопении и тромбоцитопении (цитозар по 100 и 120 мг/день соответственно в течение пяти и шести дней, рубомицин по 45 мг/день в первые два дня каждого курса).

Оба курса цитостатической терапии сопровождалась выраженной лейкопенией и тромбоцитопенией с медленным восстановлением количества клеток периферической крови до исходных низких значений. В период наибольшей лейкопении после второго цитостатического курса перелито однократно 270 мл ($35,3 \times 10^9$ клеток) замороженной аутологичной лейкомаcсы с целью определить ее переносимость без отмывания клеток от ДМСО. Побочных эффектов не отмечено, за исключением сильного запаха ДМСО изо рта больной во время инфузии лейкомаcсы.

Во время цитостатического лечения бластные клетки исчезли из периферической крови, однако 4 января 1979 г. их количество в костном мозге было равно 87% при клеточности пунктата 150 000 /мкл.

10 и 11 января (день 0, день +1, рис. 1,б) внутривенно капельно перелито по 500 мл аутологичной лейкомаcсы, содержащей, соответственно, 223×10^9 и 132×10^9 (40 и 23×10^8 /кг массы) клеток. Содержание КОЕ_к в криоконсервированной лейкомаcсе составляло в среднем 20 КОЕ_к / 10^5 клеток (три последовательных определения). Таким образом, было перелито 0,8 и $0,47 \times 10^6$ КОЕ_к на 1 кг веса больной.

Несмотря на вливание больших количеств аутологичных лейкоцитов увеличения количества лейкоцитов в крови через 1 ч и 12—18 ч после инфузии не наблюдалось. После второй инфузии лейкомаcсы появилась кровоточивость, что потребовало трансфузий свежих донорских тромбоцитов.

В клиническом отношении последний цитостатический курс с введением аутологичных лейкоцитов протекал несколько тяжелее, чем предыдущие — лихорадка, легкая кровоточивость, нетяжелая орофарингсальная инфекция — ангина, гингивит с + 7-го по + 15-й день.

На + 5-й день после инфузии лейкомаcсы нейтрофилы исчезли из периферической крови и не обнаруживались в ежедневных анализах до + 9 дня включительно. В следующем анализе, произведенном на + 12-й день — лейкоцитов $0,8 \times 10^3$ /мкл, нейтрофилов $0,5 \times 10^3$ /мкл. В последующие дни уровень нейтрофилов быстро нарастал и достиг 1000 клеток/мкл к + 19-му дню. Состояние больной быстро улучшалось — исчезла температура, появился аппетит. На + 18-й день отменен режим профилактики инфекции (изоляция в асептической палате и внутривенное введение гентамицина). При пункции костного мозга 23 января 1979 г. (+ 13-й день) бластные клетки не обнаружены, клеточность пунктата — 8 000/мкл. При кариологическом исследовании костного мозга Ph'-хромосома найдена в 100% метафаз. Больная выписана из стационара на 22-й день после инфузии аутологичной лейкомаcсы.

В начале марта вновь появились признаки бластного криза — общее недомогание, повышенная температура, быстро стала увеличиваться селезенка, которая прежде никогда не пальпировалась, в костном мозге 87% бластных клеток, клеточность пунктата 150 000/мкл. Больная скончалась 15 мая 1979 г. Причиной смерти была печеночная недостаточность, вызванная бурным прогрессированием лейкоза и септициемией, возникшей в период очередного миелотоксического агранулоцитоза.

Результаты и обсуждение. Восстановление миелопоэза при аутологичной трансплантации кроветворной ткани, по-видимому, можно доказать только динамикой восстановления количества клеток в периферической крови. На рисунках (рис. 1, а—е) представлено общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов и лимфоцитов периферической крови больной после трех аналогичных цитостатических курсов (цитозар, рубомицин).

Восстановление всех типов клеток, за исключением лимфоцитов, произошло значительно раньше — после инфузии лейкомаcсы, несмотря на большую дозу цитостатиков (рис. 1). Это дает основание предполагать, что в данном случае имело место приживание, пролифе-

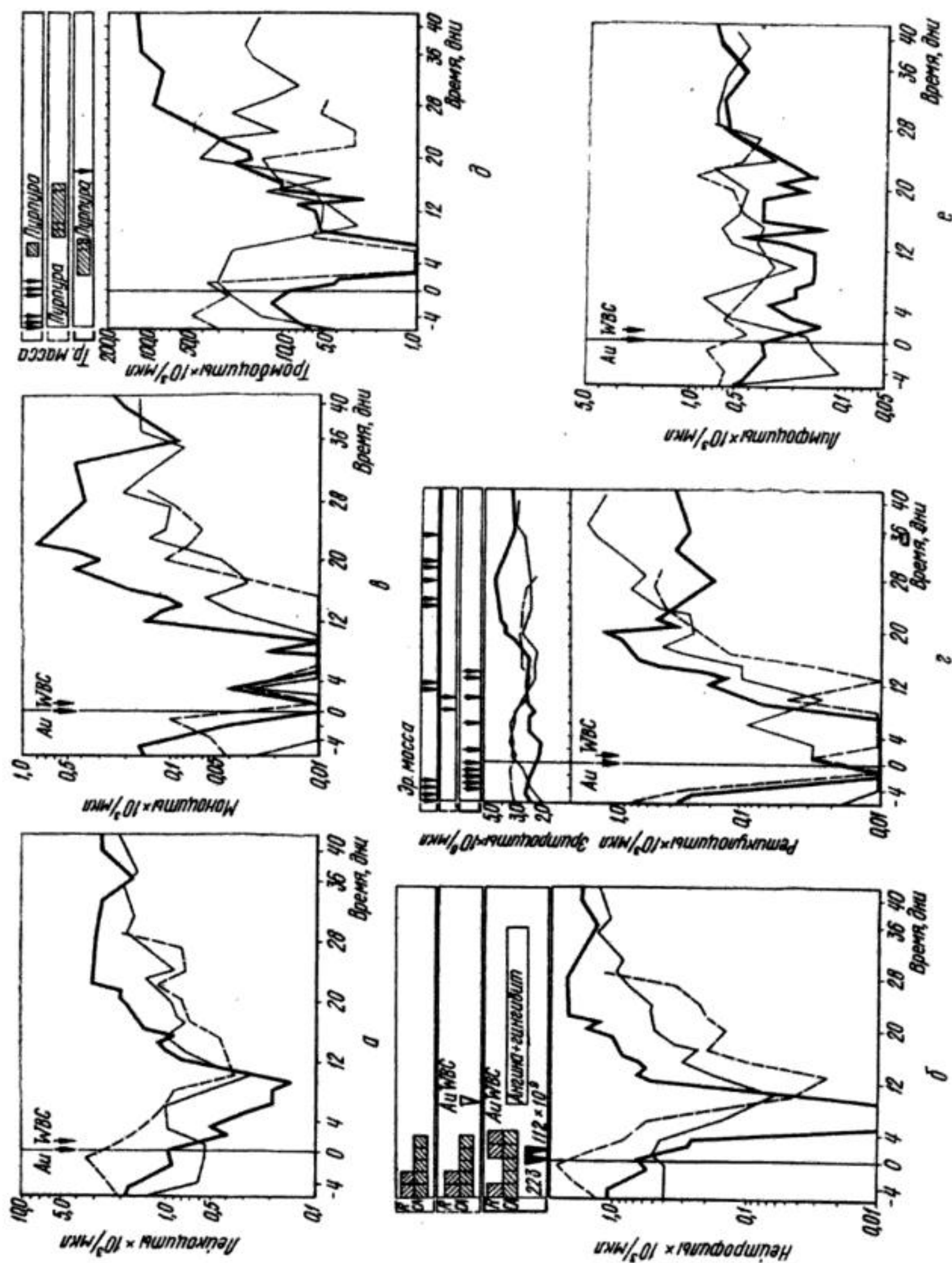


Рис. 1. Изменение количества лейкоцитов (а), нейтрофилов (б), моноцитов (в), ретикулоцитов и эритроцитов (г), тромбоцитов (д) и лимфоцитов (е) периферической крови у больной К. после трех последовательных курсов цитостатической терапии. День «0» — день инфузии первой порции лейкомассы, или первый день после окончания цитостатического курса:

R — рубомин по 45—70 мг/кг массы/сут;
 CA — цитозар по 120—180 мг/кг массы —
 сут; AuWBC — аутологичная лейкомасса.
 Стрелками обозначено введение лейкомассы, тромбоцитарной и эритроцитарной.

рация и дифференцировка клеток-предшественников всех ростков миелопоэза или стволовых гемопоэтических клеток, находившихся в аутологичной криоконсервированной лейкомассе.

В пользу такого предположения может свидетельствовать также и то, что время начала восстановления и скорость увеличения количества нейтрофилов периферической крови после инфузии аутологичной лейкомассы у данной больной совпадают с аналогичными показателями кривых нейтрофилов при аутологичных пересадках костного мозга [2], произведенных у больных злокачественными лимфомами после цитостатического воздействия (ВАСТ-режим), практически исключающего спонтанное восстановление миелопоэза в ранние сроки (рис. 2).

Однако нельзя считать, что нами получены бесспорные доказательства восстановления миелопоэза вследствие пролиферации стволовых клеток аутологичной лейкомассы. При данном цитостатическом курсе в принципе получается обратимая миелодепрессия, а более раннее восстановление показателей периферической крови по сравнению с предыдущими курсами может быть обусловлено как «удачной» циторедукцией лейкозного клона клеток, так и стимуляцией миелопоэза продуктами распада большого количества лейкоцитов.

Представленные в литературе два примера успешной реверсии бластного криза в стабильную фазу хронического миелолейкоза с помощью инфузии аутологичной криоконсервированной лейкомассы также не дают, на наш взгляд, окончательного доказательства восстановления миелопоэза из стволовых миелоидных клеток, находящихся в этой лейкомассе.

В одном случае [10] имело место слишком быстрое восстановление количества нейтрофилов в периферической крови — начало его приходится на 6-й день после инфузии лейкомассы (150×10^9 клеток). Анализируя динамику количества лейкоцитов и нейтрофилов по рисунку в статье [10] можно предположить, что эффект очень быстрого восстановления количества нейтрофилов после второго цитостатического курса (доксорубицин, цитозар, Р16-213) является не следствием инфузии лейкомассы, а естественным результатом активной спонтанной постцитостатической регенерации миелопоэза, наступившего к этому времени после первого семидневного цитостатического курса, начатого за 19 дней до второго и за 32 дня до начала восстановления нейтрофилов.

Во втором случае [22] трансфузия аутологичной лейкомассы (160×10^9 клеток) произведена больному с бластным кризом после довольно массивного цитостатического воздействия — циклофосфан по 50 мг/кг массы в день 4 дня подряд. Однако восстановление уровня лейкоцитов (нейтрофилов) началось только с 23-го дня. В связи с этим можно допустить, что и в данном случае имело место спонтанное восстановление миелопоэза, поскольку показано [2], что при более жестком цитостатическом режиме, каким, несомненно, является ВАСТ-терапия, происходит спонтанное восстановление миелопоэза. При этом начало восстановления количества нейтрофилов в периферической крови происходит с 18-го по 36-й день (см. рис. 2).

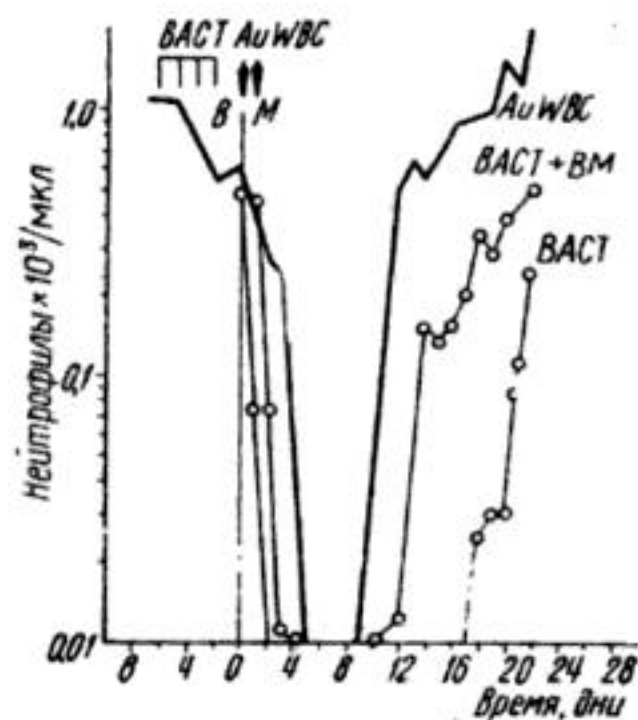


Рис. 2. Изменение количества нейтрофилов у больной К. после инфузии аутологичной лейкомассы и средние кривые нейтрофилов у больных злокачественными лимфомами после ВАСТ-полихимиотерапии и ВАСТ-полихимиотерапии с последующей пересадкой аутологичного криоконсервированного костного мозга (Оппельбаум и соавт., 1978). День «0» — день инфузии аутологичной лейкомассы (AuWBC) или костного мозга (BM).

Полученные нами результаты показывают, что довольно простая техника, использованная для получения, криоконсервации и введения аутологичных лейкоцитов в больших количествах (порядка 60×10^8 клеток на 1 кг массы), является вполне безопасной для больного хроническим миелолейкозом. Используя данный метод получения и хранения клеток, мы намерены предпринять следующие попытки реверсии бластного криза в стабильную фазу хронического миелолейкоза, последовательно (от больного к больному) увеличивая силу цитостатического воздействия.

1. Баранов А. Е., Калюта Б. А., Калинин Н. Н. и др. Опыт лечения инфекционных осложнений и кровоточивости инфузиями лейкоцитарной и тромбоцитарной массы, получаемых при помощи сепаратора клеток крови. — Терапевт. арх., 1976, 48, № 8, с. 44—54.
2. Appelbaum F. R., Herzig G. P., Ziegler J. L. et al. Deisseroth A. B. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. — Blood, 1978, 52, N 1, p. 85—95.
3. Buckner D., Graw G., Eisel R. J. et al. Leukapheresis by continuous flow centrifugation (CFC) in patients with chronic myelocytic leukemia (CML). — Blood, 1969, 33, N 2, p. 353—368.
4. Calvo W., Flidner T. M., Herbst E. W., Fache I. Regeneration of Blood-forming Organs After Autologous Leukocyte Transfusion in Lethally Irradiated Dogs. I. Distribution and Cellularity of the Bone Marrow in Normal Dogs. — Blood, 1975, 46, N 3, p. 453—457.
5. Calvo W., Flidner T. M., Herbst E. et al. Regeneration of blood-forming organs after autologous leukocyte transfusion in lethally irradiated dogs. II. Distribution and cellularity of the marrow in irradiated and transfused animals. — Blood, 1976, 47, N 4, p. 593—601.
6. Flidner T. M., Flad H. D., Bruch C. et al. Treatment of aplastic anemia by blood stem cell transfusion a canine model. — Hematologica, Pavia, 1976, 61, p. 141—156.
7. Flidner T. M., Körbling M., Calvo W. et al. Cryopreservation of blood mononuclear leukocytes and stem cells suspended in a large fluid volume. A preclinical model for a blood stem cell bank. — Blut, 1977, 35, N 3, p. 195—202.
8. Ford J. M., Cullen M. H., Lucey J. J., Tobias J. S. Fatal graft-versus-host disease following transfusion of granulocytes from normal donors. — Lancet, 1976, 27, p. 1167—1169.
9. Gale R. P., Feig S. A., Sarwa G. A cytoreductive conditioning program for bone marrow transplantation in resistant leukemia (SCARI). — Transplant. Proc., 1977, 9, N 1, p. 177—180.
10. Goldman J. M., Calton D. A. D. Reversal of blast-cell crisis in C. G. L. by transfusion of stored autologous buffycoat cells. — Lancet, 1978, 25, p. 437—438.
11. Graw R. G., Buckner C. D., Whang-Peng J. et al. Complication of bone-marrow transplantation. — Lancet, 1970, 2, p. 338—341.
12. Graw R. G., Herzig G. P., Eisel R. J., Perry S. Leukocyte and platelet collection from normal donors with continuous flow blood cell separator. — Transfusion, 1971, 11 N 2, p. 94—101.
13. Herbst E. W., Fleidher T. M., Calva W. Untersuchungen über die Gewinnung hemopoetischer Stammzellen aus dem peripheren Blut von Hunden und über ihre Fähigkeit. — Blutzellbildung regenerieren, 1975, 30, N 6, p. 265—276.
14. Lowerthal R. M., Park D. S., Goldman J. M. et al. The cryopreservation of leukaemia cells: Morphological and functional changes. — British J. Haematol., 1976, 34, N 1, p. 105—117.
15. Pike B. L., Robinson W. A. Bone marrow colony growth in agar gel. — J. Cell Compar. Physiol., 1970, 76, p. 77—82.
16. Santos G. W., Elfenbein G. J., Tutshka P. J. Bone marrow transplantation — present status. — Transplant. Proc., 1979, 11, N 1, p. 182—188.
17. Spiers A. S. D. The treatment of chronic granulocytic leukaemia: Annot. — Brit. J. Haematol., 1976, 32, N 2, p. 291—298.
18. Storb R., Graham Th. G., Epstein R. B. et al. Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by cross circulation. — Blood, 1977, 50, N 3, p. 537—542.
19. Thomas E. D., Buckner C. D., Banaji M. et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. — Blood, 1977, 49, N 4, p. 511—533.
20. Thomas E. D., Fefer A., Buchner C. D., Storb R. Current status of bone marrow transplantation for aplastic anemia and acute leukemia. — Blood, 1977, 49, N 5, p. 671—681.
21. UCLA Bone Marrow Transplant Team. A phase-II trial of practionated total body

- radiation in bone marrow transplantation for acute leukemia. — Transplant. proc., 1979, 11, N 1, p. 205—207.
22. Whittaker J. A., Bailey—Wood R. Autologous buffy-coat cells for chronic granulocytic leukaemia in blast-cell crisis. — Lancet, 1978, 30, p. 1380—1381.

Институт биофизики МЗ СССР,
Институт экспериментальной
и клинической онкологии АН СССР

Поступила в редколлегию

09.11.79

УДК 57.043:615.387.014.41

И. А. Морозов, Ю. В. Кононов, С. А. Вакуленко

ТРАНСФУЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ КОСТНОМОЗГОВОЙ ВЗВЕСИ, КОНСЕРВИРОВАННЫХ ПРИ ПЛЮСОВЫХ И УЛЬТРАНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

В современной трансфузиологии применяется компонентная терапия, представляющая возможность целенаправленного и полного использования клеток крови и костного мозга [1—4]. При выделении ядродержащих клеток костномозговой взвеси остаются эритроциты, которые можно также использовать для переливания больным.

Мы располагаем опытом применения эритроцитов донорской костномозговой взвеси, консервированных при температурах $+4$ и -196°C , в комплексном лечении заболевания у 100 больных в возрасте 30—60 лет. Из этого числа у 60 больных была гипопластическая анемия, у 40 — анемия при остром лейкозе.

Костномозговую взвесь в количестве 200 мл консервировали в растворе ЦОЛИПК N 3 в соотношении 1:1. В течение 30—45 мин консервированная костномозговая взвесь в количестве 400 мл отстаивалась, после чего удалялся надстой, содержащий миелокарициты. Клеточный осадок в основном содержал эритроциты, встречались ядродержащие клетки. Гемоглобин эритроцитов составлял $135 \pm \pm 55$ г/л.

Трансфузии эритроцитов костномозговой взвеси, консервированных при плюсовых температурах, производились в день заготовки внутривенно в дозе 200 мл. Посттрансфузионных реакций не наблюдалось. Оценка результатов трансфузий эритроцитов костномозговой взвеси производилась по динамическим исследованиям периферической крови с учетом общего состояния больного.

Полученные данные сравнивались с аналогичными показателями такого же количества больных контрольной группы, которым переливалось то же количество эритроцитов крови.

У больных после трансфузии эритроцитов костномозговой взвеси отмечалось улучшение общего состояния. У 50 больных с гипопластической анемией и у 20 больных с анемией при остром лейкозе увеличивались показатели красной крови: гемоглобин — на 20—30 г/л, эритроциты — на $1-2 \times 10^{12}$ г/л. Аналогичные результаты получены в контрольной группе больных.

Криоконсервирование эритроцитов костномозговой взвеси производилось на растворе ЦОЛИПК-11₄ по общепринятой методике. Содержание свободного гемоглобина в размороженной взвеси эритроцитов в среднем составляло 350 мг/л, гемоглобин эритроцитов — 130 г/л, натрий плазмы — 145 мк эк/л, натрий эритроцитов — 30 мк эк/л, калий плазмы — 5 мк эк/л, калий эритроцитов — 80 мк эк/л, осмотическая резистентность эритроцитов — минимальная 0,48%, максимальная 0,24%.

Трансфузии криоконсервированных эритроцитов костномозговой взвеси производились в день размораживания внутривенно, 250 мл эритроцитарной взвеси (эритроциты и раствор ЦОЛИПК-86 в соотношении 1 : 1) на введение. Посттрансфузионных реакций не наблюдалось. Оценка результатов трансфузий производилась по показателям, приведенным ранее. У всех больных отмечалось отчетливое улучшение самочувствия и выраженный заместительный эффект. Полученные данные не отличались от результатов переливания размороженных эритроцитов крови. Применение криоконсервированных эритроцитов и ядросодержащих клеток костномозговой взвеси от одного и того же донора одновременно больному с гипопластической анемией дает более выраженный клинический эффект.

Наш опыт трансфузий эритроцитов костномозговой взвеси позволяет рекомендовать их для клинического применения по тем же показаниям, что и эритроциты крови.

1. Абдулкадыров К. М., Шабалин В. Н. Трансплантация костного мозга. — Л.: Медицина, 1976. — 144 с.
2. Аграненко В. А. Принципы компонентной гемотерапии. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, № 6, с. 3—10.
3. Токарев Ю. Н., Скачилова Н. Н. Трансфузии размороженных эритроцитов в лечении больных талассемией. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, № 4, с. 31—36.
4. Файнштейн Ф. Э., Турбина Н. С., Любимова Л. С. Актуальные вопросы проблемы гипопластических (апластических) анемий. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1979, № 5, с. 3—7.

Харьковская областная станция
переливания крови МЗ УССР,
Харьковский областной
онкологический диспансер МЗ УССР

Поступила в редколлегию
06.09.79

УДК 57.043:615.387.014.41

И. А. Морозов, Ю. В. Кононов, В. П. Зайцев

ОПЫТ РАЦИОНАЛИЗАТОРСКОЙ РАБОТЫ В БАНКЕ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА

В настоящее время не вызывает сомнений актуальность задачи создания значительных запасов клеток крови и костного мозга. Создание таких запасов возможно только при долгосрочном хранении клеток жизнеспособными, что на данном этапе достигается лишь с помощью глубокого охлаждения биологических объектов. Для решения этой задачи в ряде институтов и станций переливания крови созданы банки крови и костного мозга. Объем работы банка крови и костного мозга Харьковской областной станции переливания крови рассчитан на обеспечение Харьковской и прилегающих областей необходимым количеством клеток крови и костного мозга. Располагается банк в цокольном помещении станции, где предусмотрена возможность его дальнейшего расширения. Учтена также необходимость прямой связи с боксами, лабораториями и экспедицией станции.

Жидкий азот доставляется в хранилища биоконцентрации. Для каждого вида биообъекта выделено специальное хранилище. Взвесь клеток крови и костного мозга поступает в банк из боксов в маркированных контейнерах полностью подготовленной к замораживанию. В качестве криопротектора используется глицерин и полиэтиленоксид (ПЭО). Замораживание ядросодержащих клеток крови и костного мозга по двухэтапной программе под защитой ПЭО-400 обеспечивает выживаемость и сохранение репродуктивных свойств в среднем $90 \pm$

$\pm 10\%$ клеточных элементов. Замораживание эритроцитов методом очень быстрого охлаждения до -196°C под защитой глицерина позволяет также сохранить неповрежденными $90 \pm 10\%$ клеток.

Вся аппаратура банка работает безотказно. В то же время при подготовке биообъектов к замораживанию и при их размораживании и подготовке к переливанию не предусмотрена малая механизация труда. С целью повышения производительности труда и создания более благоприятных условий работы рационализаторами станции сделаны и использованы предложения, способствующие повышению эффективности труда сотрудников банка. Это устройства: для заполнения флаконов с эритроцитарной массой растворами, заполнение контейнеров эритроцитарной массой, отмывания эритроцитов от ограждающего раствора, обработки контейнеров щелочным раствором, манипулятор для работы в среде жидкого азота и другие. Разрабатывается поточная линия по замораживанию и размораживанию биообъектов.

В качестве примера более подробно расскажем о двух из использованных рационализаторских предложений. Известно, что для деглицеринизации эритроцитов используется значительная доля ручного труда. Устройство для отмывания эритроцитов представляет собой каретку с вращающимися осями и роликами под флаконы с эритроцитарной взвесью. Вращение осей достигается с помощью цепной передачи от микроэлектромотора со скоростью вращения 2 об/мин. Медленное механическое вращение флаконов с эритроцитарной взвесью уменьшает процент гемолиза эритроцитов и освобождает от ручного труда.

Обработка контейнеров — трудоемкий процесс. Устройство для обработки контейнеров щелочным раствором — приспособление с электроприводом, с помощью которого создается медленное круговое вращение контейнеров, закрепленных на валу под углом к вертикальной оси.

Устройство состоит из электромотора мощностью 0,18 кВт, 1300 об/мин, редуктора 1/14, ременной передачи, станины, вала с установочно-зажимным приспособлением для контейнеров. Одновременно устанавливается до 20 контейнеров, заполненных щелочным раствором. Вал устройства вращается со скоростью 2—3 об/мин. Достигается двойное ополаскивание щелочным раствором всех внутренних поверхностей контейнеров за 1 оборот вала устройства.

Комплекс мероприятий по увеличению заготовки костного мозга и крови, а также механизации трудоемких работ позволили значительно перевыполнить плановые задания по низкотемпературному консервированию клеток крови и костного мозга. Размороженный материал передается в лечебные учреждения согласно заявкам. Контроль за правильностью хранения и использования гомотканей осуществляется станцией переливания крови совместно с Институтом проблем криобиологии и криомедицины АН УССР.

Наш опыт применения консервированных при ультранизких температурах (-196°C) ядросодержащих клеток крови и костного мозга подтверждает их высокую эффективность при лечении депрессий кроветворения различной этиологии. Трансфузии размороженных эритроцитов не только так же эффективны, как и консервированных при положительных температурах, но и имеют преимущество, поскольку протекают без посттрансфузионных реакций даже у гиперреактивных больных.

Создание широкой сети банков долгосрочного хранения объектов позволит в недалеком будущем более полно решить вопрос обеспечения клиник необходимым количеством материала.

Харьковская областная станция
переливания крови МЗ УССР

Поступила в редколлегия
06.09.79

В. Г. Эпштейн, Р. В. Тоциловская

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВРЕМЕНИ ПРОМЕРЗАНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА НА ЗАДАННУЮ ГЛУБИНУ

Радикальное лечение предраковых заболеваний слизистой рта и губ — актуальная задача стоматологии. Эффективное средство лечения этой патологии — метод криотерапии, результатом которой является полная деструкция патологически измененной ткани. Криоороситель КАС-01, применяемый в клинической практике, работает нестабильно, так что характер охлаждения, а следовательно, и глубина наркоза ткани в зоне замораживания могут не воспроизводиться. Таким образом, возникает необходимость контроля замораживания с целью определения диапазона вариации условий криовоздействия, связанной с нестабильностью парожидкостной азотной струи.

Измерения температуры в зоне воздействия существенно затруднены вследствие малой глубины промерзания тканей (2—3 мм) и больших градиентов температуры (до 50°C/мм), так что определить, связаны ли различные характеристики охлаждения с вариацией параметров струи, с индивидуальными особенностями ткани или с погрешностью измерений температуры затруднительно. Возможно, однако, определить важную характеристику режима замораживания — время промерзания ткани на заданную глубину.

В работе [1] предложено определить границу крионекроза по изменению активной составляющей импеданса ткани на частоте 20 кГц. Электроды помещались вдоль границы пораженной зоны ткани. При полном вымерзании растворов солей в ткани импеданс резко возрастал, что служило сигналом для прекращения криовоздействия. Зона некроза с высокой точностью совпадала с положением электродов. Авторы приходят к выводу о том, что изменение электропроводности служит более надежным показателем крионекроза ткани, чем температурный порог.

Мы задались целью модифицировать методику измерения электропроводности ткани так, чтобы она позволяла определять глубину промерзания ткани в тех случаях, когда эта глубина не превышает нескольких миллиметров.

Электрод (рисунок), изготовленный из стальной иглы 0,2 мм, вводят в ткань перпендикулярно ее поверхности. Рабочая часть электрода (1) имеет заданную длину, которая и определяет глубину промерзания. Форма электрода обеспечивает надежный контроль вертикальности введения. Другой электрод накладывается на кожу животного на некотором удалении от зоны криовоздействия. Электропроводность ткани измеряется широко распространенным прибором АВО-5 М (2) при постоянном токе. В момент отсечения рабочего электрода нарастающим фронтом замороженной зоны (3) электропроводность резко возрастает от $\sim 10^4$ до $\sim 10^7$ Ω , что свидетельствует о равенстве глубины промерзания длине электрода.

Методика опробована на прозрачном желатиновом геле (3% желатина и 97% физиологического раствора). Время резкого падения электропроводности всегда совпадало с моментом захвата конца рабочего электрода замерзающим гелем. Метод измерения времени промерзания применялся нами для определения стабильности работ инструмента КАС-01 (т. е. стабильности парожидкостной азотной струи). В экспериментах на язвах губы кролика определялось время промерзания на глубину $h=2,3$ мм. Проведено 50 опытов с электродом $h=$

$\approx 2,3$ мм. В тех случаях, когда напор струи, определяемый нами визуально, был признан нормальным, время промерзания находилось в пределах 20—30 с (70% опытов). В 30% опытов время промерзания превышало 30 с и в этих условиях работа инструмента была признана неудовлетворительной.

Приобретенный таким образом опыт использовался затем в клинических условиях. Для обработки язв губы готовились два инструмента КАС-01. Если напор парожидкостной смеси был неудовлетворительным, производилась перезарядка инструмента или же использовали другой инструмент. Такая практика полностью оправдала себя с точки зрения стабильности результатов криовоздействия.

В 20 экспериментах на язвах губы кроликов определялась связь глубины промерзания с глубиной некроза эпителиальной ткани. Проведено 10 опытов с электродом $h=1,7$ мм и 10 опытов с электродом $h=2,3$ мм. Измеряли время промерзания на заданную глубину и глубину некроза. Для глубины промерзания 2,3 мм время промерзания колеблется от 10 до 40 с, при этом глубина некроза составляет от 0,22 до 0,45 мм.

Для глубины промерзания 1,7 мм время промерзания составляет 9—28 с при глубине некроза 0,07—0,3 мм. Таким образом, наблюдается тенденция к увеличению глубины некроза с увеличением глубины промерзания. Вариация приведенных данных связана с тем, что глубина некроза зависит от всех параметров режима замораживания, а эти параметры могут различаться при одинаковой глубине промораживания ткани.

Выводы. Метод измерения электропроводности ткани служит простым и надежным средством измерения времени промерзания ткани на заданную глубину. Он обеспечивает объективность измерения важной характеристики теплового режима и может использоваться для определения стабильности работы криораспылителя. В условиях стабильной работы криораспылителя метод позволит установить связь между временем криовоздействия и глубиной промерзания ткани.

1. Pivert P. le, Binder P., Ougier T. Measurement of intratissue bioelectrical low frequency impedance: A new method to predict per-operatively the destructive effect of cryosurgery. — Cryobiology, 1977, 14, N 2, p. 245—250.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
24.05.79

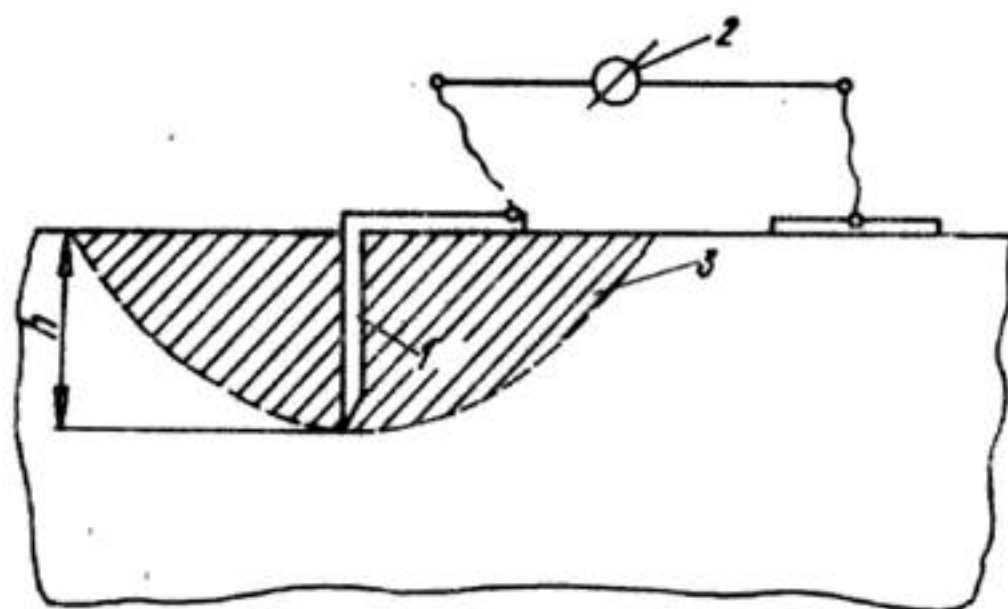


Схема размещения электрода.

С. Д. Юрченко, Г. Ф. Катурова, Н. Д. Левченко

КРИОТЕРАПИЯ ГЕАНГИОМ ПОЛОСТИ РТА И ПРИРОТОВОЙ ОБЛАСТИ

Опухоли, исходящие из кровеносных сосудов, — гемангиомы занимают видное место среди доброкачественных новообразований. Они разнообразны по форме и локализации, но в 60%, а по некоторым данным в 80%, встречаются в челюстно-лицевой области [1, 2, 9—11]. Для лечения гемангиом предложен ряд медикаментозных средств и оперативных вмешательств. Действие их направлено на различные элементы или всю опухоль и в конечном итоге рассчитано на ее облитерацию, склерозирование или некроз, на частичное или полное ее удаление. Однако эффективность консервативных методов лечения недостаточно высока, сопровождается повреждением окружающих опухоль тканей, требует много времени. Оперативные методы оставляют обширные рубцы, косметические изъяны.

Опыт применения низких температур в медицине и развитие соответствующих технических средств позволили применить в качестве лечебного фактора холод. Работы, проведенные в данном направлении [4—6], показали, что локальное криовоздействие и последующий крионекроз не вызывают отрицательных реакций организма. Местная реакция вокруг очага поражения тканей минимальна. Восстановительные процессы в зоне криоповреждения происходят без образования гипертрофических и келлоидных рубцов.

В литературе имеются сообщения об использовании низких температур для лечения сосудистых опухолей, но они малочисленны [3, 6—8]. Цель настоящего исследования — разработка нового криогенного метода лечения сосудистых опухолей полости рта и приротовой области с помощью новой криогенной аппаратуры. Исследовались непосредственные, ближайшие и отдаленные результаты при криотерапии больных с сосудистыми опухолями полости рта и приротовой области. Настоящее сообщение основано на материалах клинических наблюдений 50 больных с сосудистыми новообразованиями указанной локализации, леченных криогенным методом.

У 32 наблюдавшихся нами больных гемангиомы носили врожденный характер, у 8 больных старшего возраста появление их связывается с травмой. При выполнении работы использовалась классификация, разработанная Международным комитетом по классификации болезней Всемирной организации здравоохранения (Женева, 1971, 1973 гг.): капиллярная гемангиома, ветвистая, капиллярно-ветвистая, кавернозная, капиллярно-кавернозная, ангиофиброма и звездчатая ангиома.

Из 50 больных капиллярная гемангиома диагностирована у 14, кавернозная — у 23, ангиофиброма — у 3, капиллярно-ветвистая — у 4, капиллярно-кавернозная — у 3 и звездчатая — у 3 больных. Диагностика гемангиом челюстно-лицевой области в большинстве случаев не сложна. Диагноз обычно ставился на основании анамнеза и клинических данных. Необходимости в дополнительных методах исследования не возникало.

Сосудистые опухоли наиболее часто локализовались в области губ, щек, носа, полости рта. Множественные (кавернозные) гемангиомы были у одной больной. Размеры наблюдаемых опухолей колебались от нескольких квадратных миллиметров до значительной площади поражения с распространением на всю половину лица.

Лечение гемангиом проводилось локальным криовоздействием капиллярной парожидкостной струи азота. С целью повышения эффек-

тивности криповреждения проводились многократные криовоздействия с пролонгированием периода оттаивания. Повторные криовоздействия проводились у 18 больных и только после полного отпадения некротической корочки; трижды сеансы криовоздействия проводились у 2 больных. Длительность криовоздействия в каждом объеме зоны замораживания колебалась в пределах 10—20 с. Через 5—10 мин на месте криовоздействия обычно появлялась отечность тканей, а через 10—12 ч — пузырь с желтоватым содержимым. Через сутки отек спадал, а пузырь либо вскрывался, либо содержимое его постепенно рассасывалось и на его месте возникала некротическая пленка, которая, постепенно уплотняясь, превращалась в корочку.

Спустя 14—16 сут очаг крионекроза полностью эпителизировался. Никаких осложнений, в том числе кровотечений, ни во время криовоздействия, ни позднее не наблюдалось. У одного ребенка лечение плоской капиллярной гемангиомы проводилось комбинированным методом: прошивание отдельных участков сочеталось с последующим криовоздействием на эти участки (гемангиома занимала половину лица). У другого ребенка комбинированное лечение гемангиомы проводилось в другой модификации: глубокая кавернозная часть обкалывалась хинин-уретаном, а поверхностный участок капиллярной гемангиомы разрушался криовоздействием. Эти больные находятся в стадии лечения.

Результаты лечения прослежены в течение года у 35 больных. У 24 из них наблюдался полный терапевтический эффект, у 10 — значительное улучшение и только у 1 больной после трехкратного воздействия на капиллярную гемангиому эффект был незначительный.

Полученные результаты криотерапии гемангиом полости рта и приротовой области, наблюдаемые у 50 больных, дают основание сделать вывод о том, что метод отличается локальностью воздействия, управляемостью, доступностью, простотой выполнения, не требует специальной подготовки больных. Лечение криовоздействием больные переносят легко, реакция окружающих тканей в виде быстро проходящего отека несущественна. Непосредственные и ближайшие результаты лечения положительны. Заживление происходит без образования рубцов, что дает высокий косметический эффект.

1. Григорьева А. В. Лечение ангиом лучами радия. — Тр. Зап. краевого ин-та физ. методов, 1936, 4, с. 148—156.
2. Долецкий С. Я. Гемангиома кожных покровов у детей и ее лечение. — Сов. медицина, 1952, № 7, с. 58—61.
3. Кондрашин Н. И. Клиника и лечение гемангиом у детей. — М.: Медгиз., 1978. — 103 с.
4. Никитин В. А., Воронина Л. И., Точилова Р. В., Григорьева К. В. Криотерапия предраковых заболеваний слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ. — Стоматология, 1977, № 4, с. 27—29.
5. Никитин В. А., Григорьева К. В., Реусова Е. П., Воронина Л. И. Криотерапия лейкоплакии. — Терапевт. стоматология, 1975, вып. 10, с. 83—86.
6. Пачес А. И., Шенталь В. В., Птуха Т. П. и др. Криогенный метод лечения опухолей головы и шеи. — М.: Медгиз, 1978. — 168 с.
7. Прусаков В. А., Митрофанов Г. Г., Комаров Б. А. Криохирurgia гемангиом полости рта и лица. — Стоматология, 1976, № 4, с. 49—51.
8. Шенталь В. В., Птуха Т. П., Михайловский А. В. Лечение опухолей кожи лица и головы методом криогенного воздействия. — В кн.: Новые приборы и устройства в биологии и медицине. Киев: 1975, с. 11—12.
9. Conway H., McKinney P., Climo M. Permanent camouflage of vascular nevi of the face by intradermal injection of insoluble pigments (Tattooing): Experience through twenty years with 1022 cases. — Plast. Reconst. Surg., 1967, 40, N 5, p. 457—462.
10. Lueza Y. M. Les angiomes des regions buccales et per-buccales. — Rev. Odontostomatol., 1961, 19, N 4, p. 131—171.
11. Smith R. M., Robbins M. Hereditary hemorrhagic teleangiectasia. — Oral. Surg., 1965, 19, p. 595—598.

Украинский институт усовершенствования
врачей МЗ СССР,

Харьковский медицинский
институт

5—3743

Поступила в редколлегию
14.08.79

Б. П. Сандомирский, Л. Ф. Журихина, Ю. И. Исаев

ОБЩАЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВИ ПОСЛЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА КОЖУ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Протеолитические ферменты играют важную роль в биохимических механизмах продукции вазоактивных веществ, а также в процессах некролиза и регенерации после термических ожогов [1, 6]. По мнению ряда исследователей [2, 3, 7], показатели общей протеолитической активности крови повышаются после термического ожога соответственно тяжести и глубине поражения. В ряде работ [5, 9] показано благоприятное действие охлаждения на термические ожоги, что приводило к уменьшению глубины поражения, токсичности некротических тканей и ускорению заживления. Сведения об общем протеолизе после действия холода на кожу с лечебной целью нами не выявлены.

Цель настоящего исследования — изучение активности протеолитических ферментов крови крыс после термического ожога, криовоздействия и ожога с последующим охлаждением.

Опыты произведены на белых крысах линии Вистар весом 160—180 г, на участки спины которых после эпиляции шерсти оказывали температурные воздействия. Ожоги вызывались пламенем горящего бензина на площади 20 см², для чего использовалось 2 мл бензина и 100 мг ваты. Криовоздействие проводилось на такой же площади распылением жидкого азота с помощью аппарата АСК-6 (ФТИНТ АН УССР) до побеления и образования инея. Ожоги охлаждались таким же способом, непосредственно после прекращения горения. Подкожную температуру измеряли на отдельной группе аналогичных животных с помощью пластины медной фольги площадью 20 см², толщиной 0,1 мм, подпаянной к ней термопарой, помещенной под кожу в зоне температурных воздействий [9]. К окончанию горения температура повышалась до $+66 \pm 5^\circ\text{C}$, после криовоздействия составляла $-52 \pm 4^\circ\text{C}$, и криовоздействия на обожженную кожу — $-6 \pm 3^\circ\text{C}$.

Общую протеолитическую активность цельной крови определяли через 1, 3 ч и на 1-е, 3-е, 6-е и 9-е сут после воздействий по приросту остаточного азота в пробах при аутолизе, происходящем в условиях 24-часовой инкубации при 37°C [10], остаточный азот — гипобромитным методом Раппопорта и Эйхгорна [4].

Как видно из таблицы, тепловой и холодовой некрозы кожи сопровождаются резким снижением протеолитической активности в первые 3 ч, после чего она повышается и достигает максимальных значений к 3-м сут после ожога и к 1-м — после криовоздействия. При ожоге с последующим охлаждением концентрация протеолитических ферментов резко возрастает непосредственно после воздействия, к 3-му ч достигает величин, близких к нормальным, далее возрастая до максимальных значений.

Отсутствие протеолитических ферментов в крови вскоре после действия на кожу пламени или жидкого азота может быть обусловлено двумя причинами, а именно: полной денатурацией клеточных структур в зоне действия температурных факторов или блокированием поступления из места их возникновения в общий кровоток.

Как известно [11], температурные повреждения сопровождаются периферическим сосудистым спазмом, выраженность и продолжительность которого связаны с интенсивностью и видом воздействия. Низкий уровень протеолитических ферментов в крови после ожога или криовоздействия, вероятно, обусловлен выраженным спазмом сосуди-

57 Динамика общей протеолитической активности крови после температурных воздействий (мг % остаточного азота)

Воздействие	Статистический показатель	Сроки после температурных воздействий					
		1 ч	3 ч	1 сут	3 сут	6 сут	9 сут
Ожог	<i>n</i>	5	7	6	5	7	7
	$M \pm m$	0	$2,785 \pm 3,24$	$17,0 \pm 2,86$	$246 \pm 1,12$	$14,14 \pm 1,42$	$11,36 \pm 1,3$
	p_1	<0,001	>0,05	<0,01	<0,001	<0,01	>0,05
	p_2	—	>0,05	<0,01	<0,05	<0,001	>0,05
Криовоздействие	<i>n</i>	5	8	6	6	6	6
	$M \pm m$	0	$6,0 \pm 2,34$	$26,5 \pm 2,94$	$7,5 \pm 2,14$	$14,5 \pm 3,98$	$4,0 \pm 2,0$
	p_1	<0,001	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	<0,05
	p_2	—	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,05
Ожог с крио- воздействием	<i>n</i>	6	6	6	6	6	6
	$M \pm m$	$16,5 \pm 3,17$	$6,0 \pm 1,34$	$27,0 \pm 2,68$	$8,5 \pm 3,32$	$19,5 \pm 6,38$	$7,0 \pm 2,53$
	p_1	<0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
	p_2	—	<0,05	<0,001	<0,01	>0,05	>0,05

Примечание. p_1 — по отношению к контролю ($8,88 \pm 0,474$, $n=25$); p_2 — сравнение произведено последовательно.

стых сфинктеров, капиллярным стазом и нарушением транспорта ферментов в центральное кровеносное русло. Кроме того, отсутствие протеолитических ферментов в крови через 1 ч после температурного повреждения может быть обусловлено полной денатурацией клеточных органелл под действием высокой и низкой температуры в месте их приложения, тогда как последующее повышение активности протеолитических ферментов связано с их поступлением из очага поражения и из других тканей. Показано [8], что деструктивные изменения лизосомальных мембран печени обнаруживаются уже через 1,5 ч после ожога, последующие сроки характеризуются нарастанием деструкции и выходом ферментов в цитоплазму и кровь. Криовоздействие, произведенное на ожог, улучшает сосудисто-тканевую циркуляцию [5], что сопровождается поступлением протеолитических ферментов в общий кровоток уже в первые часы после охлаждения ожогов.

Существенная роль нарушений сосудисто-тканевой циркуляции проявляется в сроках максимальной активности протеолитических ферментов после различных температурных воздействий. Так, через 3 сут после ожога при нормализации проницаемости из тканей в кровеносное русло нами выявлен пик активности общего протеолиза, тогда как после криовоздействия и сочетания ожога с охлаждением это происходит на 2 дня раньше.

Полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего изучения взаимосвязи между образованием вазоактивных веществ после различных температурных воздействий и их поступлением в систему общей гемокрикуляции, через которую они реализуют свое действие.

1. *Воспаление, иммунитет и гиперчувствительность* / Под ред. Г. Мовэта — М.: Медицина, 1975. — 560 с.
2. Заец Т. Л. Биохимия ожоговой болезни. — Патол. физиология, 1962, № 2, с. 76—82.
3. Камаев М. Ф., Ващук В. В. Изменение протеолитической активности крови у больных с острой ожоговой токсемией. — Пробл. гематологии, 1976, № 8, с. 20—22.
4. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. — Минск: Беларусь, 1976. — 310 с.
5. Пекарський Д. О., Сандомирський Б. П., Белоусова Є. В. та ін. Кріовплив у лікуванні опіків шкіри. — Вісн. АН УРСР, 1978, № 11, с. 42—49.
6. Поликар А. Воспалительные реакции и их динамика: Биология, патология и фармакодинамика. — Новосибирск: Наука, 1969. — 231 с.
7. Портнова К. Ф. Протеолитическая активность крови у больных в период острой ожоговой токсемии. — В кн.: Острая ожоговая токсемия. Киев: 1976, с. 52—53.
8. Ремизова М. И., Кочетыгов Н. И. Изменение состояния лизосомального аппарата печени при тяжелых ожогах у крыс. — В кн.: Острая ожоговая токсемия. Киев: Здоров'я, 1976, с. 26—28.
9. Сандомирский Б. П., Пекарский Д. Е., Исаев Ю. И. и др. Обоснование криохирургии термических ожогов в эксперименте. — Клин. хирургия, 1977, № 12, с. 3—7.
10. Соринов А. Н., Филов В. А. Об определении общей протеолитической активности биологических жидкостей: Аннот. — Лаб. дело, 1967, № 5, с. 304.
11. Чернух А. М. Воспаление: Очерки патологии и эксперим. терапии. — М.: Медицина, 1979. — 448 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.10.79

В. Ф. Криворотько

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КРИОХИРУРГИЧЕСКОГО МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Клиническое применение криохирurgicalических методов в разных областях медицины [1—6] основано на использовании низких температур для некроза участков органов и тканей. Дальнейший прогресс в криохирurgicalии, очевидно, зависит от результатов совершенствования криохирurgicalического оборудования и нахождения наиболее оптимальных режимов его использования, что принципиально достижимо на основе имеющегося опыта применения криовоздействий при лечении больных.

Предложенный Жондером и Суаресом [7, 9] в 1965 г. метод замораживания опухолей предстательной железы у больных с высокими степенями операционного риска применялся нами в 19 случаях лечения аденомы и рака предстательной железы. В настоящей статье приводится накопленный нами фактический материал по использованию различных криогенных установок для деструкции опухолей предстательной железы, клиническому течению периода после криовоздействия, а также анализируются возникающие при этом осложнения.

Операции проведены на пациентах старше 60 лет, страдавших сопутствующей патологией, характер которой представлен в таблице.

Распределение больных по характеру сопутствующей патологии

Характер сопутствующей патологии	Количество случаев		Доминирующая патология в группах	
	1-я группа, 9	2-я группа, 10	1-я группа, 9	2-я группа, 10
Общий атеросклероз с преимущественным поражением сосудов мозга, сердца и нижних конечностей	9	8	4	2
Гипертоническая болезнь	3	5	1	2
Хроническая патология органов дыхания	8	5	2	2
Сочетание основного заболевания с другими заболеваниями органов мочеполовой системы	5	3	2	3
Хронические заболевания органов желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата	2	7	—	1

При этом у части наблюдаемых больных указанная выше патология была резко выраженной и носила характер доминирующей.

Первую группу составили 9 больных, из которых у 8 была аденома и у одного рак предстательной железы. Криовоздействия производили при острой задержке мочи и завершали установлением постоянного катетера (3 случая) в сочетании с наложением надлобкового свища мочевого пузыря (3 случая), либо выполнялось при ранее наложенном надлобковом свище (3 случая). Опухоли замораживали криокатетером под общим обезболиванием. Наркоз продолжался в период замораживания и полного оттаивания с целью готовности к тампонаде и обеспечения работы системы орошения мочевого пузыря. Перед криовоздействием мочевой пузырь заполняли кислородом или воздухом, а в ткани вокруг хирургической капсулы устанавливали иглы-

термопары, соединенные с самопишущим потенциометром ПС-8. Теплообменную камеру криокатетера длиной 56 мм устанавливали проксимальной границей на уровне верхушки аденомы к моменту фиксации криокатетера, проверяли место положения теплообменной камеры, после чего продолжали криовоздействие до затвердевания опухоли. Первоначальная экспозиция (2—5 мин) по морфологическим показаниям оказалась недостаточной. Учитывая нестандартную холодопроизводительность, криогенный контроль за степенью замораживания осуществлялся пальпаторным определением полного затвердевания опухоли до появления признаков фиксации слизистой прямой кишки. При этом наблюдалось постепенное уплотнение ткани опухоли от центра к периферии, а в ряде случаев — преимущественно в одной из долей. Прижимая ткани менее плотной доли к криокатетеру, удавалось обеспечить равномерное замораживание долей.

После нагревания и извлечения криокатетера происходило самопроизвольное отогревание опухоли в течение 16—48 мин. В этот период у больных отмечалось появление умеренной уретроррагии, практически прекращаемой после установления постоянного катетера. Опасность кровотечения и возможной тампонады пузыря независимо от величины уретроррагии определяли необходимость орошения пузыря, а также контроля и ухода за работой постоянного катетера.

После криовоздействия состояние больных оставалось удовлетворительным, сохранялся аппетит, температура была нормальной. Через 2—3 дня исчезала примесь крови в моче. Общий объем кровопотери не превышал 80—90 мл. Через 5—8 дней после криовоздействия начинался период раннего отторжения поверхностных, прилежащих к уретре участков опухоли. Клинически это сопровождалось появлением умеренных болей по ходу мочеиспускательного канала, над лобком и в области промежности, а также императивных позывов к мочеиспусканию, изменялся внешний вид мочи, появлялся скудный слизистогнойный, иногда кровянистый осадок, мелкие кусочки некротизированной ткани опухоли, усиливалось ее щелочное брожение. У отдельных больных болевые ощущения усугублялись вследствие имевшегося постоянного катетера.

При ректальном исследовании после криовоздействия к 5—7-му дню железа становится мягче, в особенности на междолевой бороздке и ближе к верхушке. При легком надавливании на нее отмечалось отхождение слизисто-гнойного отделяемого по катетеру или дренажу, что уменьшало тенезмы и дизурические явления.

В целях активации некролиза всем больным проводили инстилляции мочевого пузыря раствором фурациллина с протеолитическими ферментами (трипсин, хемотрипсин и химопсин) в дозе от 50 до 100 мг, что улучшало течение воспалительного процесса. При этом затихали дизурические явления, уменьшалась степень пиурии, рН мочи изменялся в кислую сторону. Однако действие ферментов недостаточно для радикального влияния на течение некролиза даже в случаях их длительного (до 1 мес) применения.

Период раннего отторжения мелких некротических участков опухоли, представленных в основном железистыми элементами, заканчивался в течение 10—12 дней. К этому времени исчезали дизурические явления, моча приобретала обычный вид. В случаях осложненного течения (восходящий флеботромбоз) отмечалось нарастание местных симптомов и явлений общей интоксикации, что требовало соответствующего лечения.

В последующем процесс деструкции опухоли продолжался в основном за счет ее фиброзно-волокнутой стромы путем медленного отторжения сравнительно крупных участков опухоли. Это сопровождалось активизацией гнойно-некротических процессов как в ткани опу-

холи, так и в зоне хирургической капсулы и дна мочевого пузыря. У ряда больных отмечалось нарастание явлений интоксикации на фоне уже восстановившегося мочеиспускания. Процесс гнойно-некротической деструкции и отторжение зависят главным образом от характера строения опухоли (железистая или фиброзно-волоконистая), адекватности экспозиции криовоздействий, надежности дренирования и общей реактивности организма. Обращает на себя внимание волнообразность течения процессов секвестрации опухолевой ткани, что является характерной особенностью послеоперационного периода и имеет важное практическое значение в процессах реабилитации больных.

У большинства больных через 25—30 дней на фоне продолжающегося отторжения сравнительно мелких фрагментов начинается секвестрация крупных участков опухоли, которые длительное время флотируют в пузыре, вызывая затруднения мочеиспускания. В ряде случаев такие секвестры инкрустируются солями.

Кинетически указанный период характеризуется возобновлением дизурических явлений, схваткообразных болей над лобком и в области промежности, нарушением акта мочеиспускания вплоть до острой задержки мочи. При этом общее состояние больных ухудшается: повышается температура, появляются признаки восходящего пиелонефрита, парацистита и пельвеоперитонита на фоне признаков общей интоксикации. Хирургическое удаление таких секвестров позднего отторжения на фоне вторичных воспалительных изменений в ложе, стенке пузыря, парапростатических и околопузырных тканей сопровождается в послеоперационном периоде тяжелыми гнойно-некротическими изменениями в ране с очень замедленным ее очищением и эпителизацией.

При явлениях поздней секвестрации в связи с активацией гнойно-некротических процессов в зоне глубокого замораживания у 2 больных отмечены нарушения работы сфинктера мочевого пузыря, устьев мочеточников (императивные позывы к мочеиспусканию, поллакиурия, временное недержание мочи, появление пузырно-мочеточниковых рефлексов), а также сфинктера прямой кишки (болезненность в области анального отверстия, рефлекторная задержка стула и газов). Чем продолжительнее процессы гниения и отторжения опухоли, тем более грубые функциональные и анатомические изменения возникают вокруг зоны некроза.

У 8 больных из данной группы в пред- и послеоперационный периоды (сроком от 15 дней до 4 мес) произведены цисто- и уретроцистография, показавшие, что уже через 15 дней, когда при ректальном исследовании размеры аденомы практически остаются прежними, отмечено наличие диффузных затеков контрастного вещества в ткань опухоли. Это свидетельствует о начальном этапе деструкции железистых компонентов опухоли. Тень контрастного вещества в этих случаях негетерогенная. Это свидетельствует о начальном этапе деструкции железистых компонентов опухоли, напоминающих «пчелиные соты» с мелкими, неодинаковыми по величине дефектами наполнения, что обусловлено уретро-паренхиматозными рефлексам в участки витрификации железистых компонентов опухоли. Спустя 30—60 дней на цисто-, уретроцистограммах в области аденомы определяются плотные, гомогенные, различной формы (у-образные, конусовидные, трапецевидные) тени контрастного вещества. В одном наблюдении тень «ложа» напоминала по форме песочные часы (предпузырь). У больных со вторичными изменениями в области устьев мочеточников длительное время определялись устойчивые пузырно-мочеточниковые рефлексы.

Изучение осложнений после криовоздействий у этой группы больных показало, что наиболее частыми из них являлись признаки флеботромбоза тазовых вен. В одном из наблюдений восходящий флеботромбоз привел к тромбозу сосудов брыжейки кишечника с вторичным

некрозом кишечника и перитонитом; в другом — эмболию легочной артерии. Флеботромбоз вызывал выраженные гнойно-некротические процессы типа парапростатической флегмоны, парацистита. Обращают внимание случаи вторичного нарушения пассажа мочи, связанные с секвестрацией фрагментов опухоли, затрудняющих отток.

Из 9 леченых больных умерло 4, из них от эмболии артерии — 1, от восходящего флеботромбоза с тромбозом сосудов брыжейки кишечника — 1, от гнойно-геморрагического расплавления околопузырной клетчатки и пельвеоперитонита — 1 и от диссеминации рака мочевого пузыря — 1. Клинически благоприятные результаты получены у пяти больных: у всех восстановился пассаж мочи, отсутствовала остаточная моча.

Опыт криовоздействия у этой группы больных показал, что хладопроизводительность криогенной системы была недостаточной и не обеспечивала необходимой скорости замораживания. Продолжительная экспозиция криовоздействия оказалась неблагоприятным фактором применения метода криодеструкции. При медленном замораживании охлаждались значительные участки ткани вокруг катетера и отсутствовал необходимый градиент температур зоны криодеструкции по отношению к окружающим тканям, возникла опасность криоповреждения парапростатических тканей и выброс охлажденных потоков крови в сосудистое русло. Это определяло развитие тяжелых местных гнойных осложнений в органах мочевыводящих путей и в парапростатической и паравезикальной клетчатке.

Вторую группу составили 10 больных, из которых у 9 аденома была крупных размеров (одна из них при вскрытии весила 115 г). У 3 больных из этой группы выявлен полидивертикулез пузыря, у 2 — пассивный пузырно-мочеточниковый рефлекс и еще у 2 — уретеропиелозктазия.

У 4 больных криовоздействие проведено под общим обезболиванием, у остальных — в условиях нейролептаналгезии, причем у некоторых ткань опухоли дополнительно инфильтрировалась 0,25—0,5%ным раствором новокаина. Для замораживания использовалась криогенная установка Линде СЕ-4 с криокатетером РР-4. Возможности установки позволяли выдерживать программу замораживания по конечной температуре на уровне теплообменной камеры (до -160°C). Экспозиция замораживания с момента выхода на режим у 3 больных составляла 5—6 мин и у остальных — от 8 до 15 мин.

Клинический опыт криовоздействия показал, что криокатетер РР-4 фиксировался к ткани опухоли на 2—3-й мин, обеспечивал температуру -160°C в течение 2—3 мин, отогревание продолжалось не более 3 мин.

Установлено, что к концу замораживания появляется чувство давления в области промежности и выраженные позывы к дефекации, что следует объяснить раздражением рецепторов хирургической капсулы аденомы. При временном прекращении замораживания боли успокаиваются. Клиническое течение периода после криовоздействия у этой группы больных в целом напоминало динамику его течения у больных первой группы, однако у больных с надлобковым свищем течение периода после криовоздействия было легче, поскольку эвакуация мочи не нарушалась. Лишь у одного больного на 4-й день свищ оказался несостоятельным и был восстановлен введением в пузырь катетера Пеццера с помощью устройства для наложения надлобкового свища мочевого пузыря.

Раннее отторжение поверхностных, прилежащих к криокатетеру тканей опухоли начиналось на 5—8-й день, причем у 2 больных из 8 уже на этом этапе появилось спонтанное мочеотделение при функционирующем надлобковом свище. Поздняя секвестрация у больных

второй группы начиналась на 15—20-й день с отхождением крупных или несколько меньших размеров секвестров и заканчивалось на 18—25-й день после начала отторжения, т. е. на 10—15 дней раньше, чем у больных первой группы.

Клинический период секвестрации характеризовался рядом местных и общих признаков. К местным проявлениям поздней секвестрации мы относим возобновлявшиеся боли над лоном и в области промежности, усиление дизурических явлений, появление признаков реффлекторного пареза кишечника. При использовании постоянного катетера для ускорения заживления надлобкового свища у 2 больных усилились дизурические явления и боли в области промежности, возникли императивные позывы к мочеиспусканию и слизисто-гнойное отделяемое из уретры, из-за чего пришлось удалить катетер. Опыт показывает, что попытки форсировать заживление свища на постоянном катетере даже в поздние сроки (спустя 1—1,5 мес) при сохраняющейся секвестрации неэффективно: катетер усиливает местный гнойно-некротический процесс, что сопровождается симптомами его непереносимости и даже задерживает процессы репарации.

Общие проявления поздней секвестрации — признаки интоксикации и активизации инфекции. Явления интоксикации проявлялись анемизацией, нарушениями деятельности сердечно-сосудистой системы и нервной системы. Наблюдения показали, что заживление свища возможно лишь в случаях, когда процесс секвестрации заканчивался формированием канала, обеспечивающего свободный отток мочи при сохранении тонуса детрузора.

У 6 больных с надлобковым свищем последний закрылся самопроизвольно в стационаре в сроки: через 40, 45, 52 и 78 сут. Двое больных были выписаны из стационара на 28-е и 31-е сут с точечным свищем, который зажил в течение последующих 12—14 сут. Данные цисто- и уретроцистографии, проведенные в сроки от 10 сут до 3 мес, были в целом аналогичны описанному у больных первой группы.

Следует указать, что рентген-анатомический дефект ткани аденомы после криовоздействия на нее не всегда соответствует благоприятным функциональным результатам, особенно при крупных, асимметрических долях аденомы, грубой девиации уретры, а также при выраженных размерах ее средней доли.

Таким образом, использование криокатетера PR-4 с достаточной хладопроизводительностью обеспечивало более интенсивный процесс секвестрации. Отхождение секвестров у этих больных, чаще достаточно крупных размеров, заканчивалось сравнительно раньше по отношению к срокам у больных первой группы. Вместе с тем течение периода после криовоздействия в целом было тяжелее, что объяснялось возрастом больных, характером сопутствующей патологии и, наконец, самой спецификой местных процессов после криодеструкции. Необходимо подчеркнуть, что период после криовоздействия достаточно продолжительный по времени, протекает с явлениями вяло текущего гнойно-некротического процесса в зоне замораживания, а иногда и в соседних тканях и органах с реальной опасностью развития генерализации инфекции.

У 4 из 10 больных исследуемой группы вследствие выраженного гнойно-некротического процесса и поздней секвестрации развились признаки тяжелой интоксикации. На этом фоне заметно усугублялось течение общего атеросклероза, нередко в виде нарушений мозгового кровообращения, вторичного ликворно-гипертензионного синдрома интоксикационного генеза (1 больной), а также явлениями сенильного психоза, деменции, бульбарных нарушений (1 больной). По срокам интоксикация соответствовала периодам ранней или поздней секвестрации, особенно при затруднении отхождения гнойно-некротических

участков опухоли: у 2 больных явления выраженной интоксикации проявлялись на 6—16-е сут и у 2 других — на 25—45-е сут. Для борьбы с интоксикацией больным назначили инфузионную терапию, гемотрансфузии, а для обеспечения оттока мочи и вымывания продуктов гнилостного распада проводили постоянное орошение мочевого пузыря. У 7 из 10 наблюдавшихся больных в различные сроки после криовоздействия возникали осложнения, характер которых был следующим:

Характер осложнений	Число больных
Пневмония	3
Орхоэпидидимиты	4
Уретрит	1
Восходящий пиелонефрит	3
Недержание мочи	1

Данные вывода свидетельствуют, что основная часть (5 из 7) больных имела более одного осложнения. Развитие орхоэпидидимита у 4 больных, которым не выполнялась вазорезекция, отмечалось в период начавшейся энергичной секвестрации (на 15—24-й день), у одного из них в связи с абсцедированием потребовалась гемикастрация. Признаки восходящего пиелонефрита наступали в основном с началом секвестрации, в особенности при затруднениях свободного оттока и застое гнойно-некротического детрита в подадипростатической ямке.

Из больных второй группы умерло трое. Двое больных умерли через 15—24 сут при явлениях восходящего пиелонефрита с исходом в апостематозный нефрит и уросепсис. У этих больных на вскрытии выявлена больших размеров средняя доля, на которую в основном и пришлись основные поражения глубокого замораживания. Ни размеры, ни форма средней доли до секции не были известны. Еще один больной в возрасте 88 лет умер через 89 дней при зажившем надлобковом свище от гриппозной пневмонии и отека легких.

Таким образом, результаты клинических наблюдений при применении криовоздействия с помощью установки Линде СЕ-4 со стандартным криокатетером PR-4 (США) подтвердили данные наших экспериментальных разработок, в которых поддерживается важность высокой холодопроизводительности криокатетера для получения благоприятных результатов лечения. В изучаемой группе практически отсутствовали такие серьезные осложнения общего характера, как флеботромбозы и тромбоэмболии, связанные с использованием криокатетеров низкой холодопроизводительности. Вместе с тем анализ полученных данных показал, что замедленное отторжение некротических секвестров опухоли — одно из самых опасных осложнений криохирургического метода.

1. Ключарев Б. В., Кузьмин В. А. О криохирургии рака предстательной железы. — Урология и нефрология, 1974, № 1, с. 31—32.
2. Никольский А. Д., Латышев М. М. Криохирurgia при раке предстательной железы. — Урология и нефрология, 1976, № 2, с. 35—38.
3. Новиков А. М. О технике криодеструкции новообразований предстательной железы. — Урология и нефрология, 1973, № 4, с. 39—43.
4. Шальников А. И., Фрейдович А. И. Направленная криодеструкция предстательной железы и задней уретры. — Урология и нефрология, 1973, № 3, с. 47—49.
5. Backer O. G., Lung F. Kryoprostektomi: Apparatur und Operations technik. — Nord. Medicin, 1967, 77, N 17, p. 532—534.
6. Dow J. A. Effect of surgical capsular temperature on cryosurgery of the prostate. — J. Urol., 1968, 100, N 1, p. 66—71.
7. Gonder M. J., Soanes W. A., Smith V. Chemical and morphological changes in the prostate following extreme cooling. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, N 2, p. 716—730.
8. Haschek H. Kältechirurgie der Prostata vorläufige Mitteilung. — Urologe, 1968, 72, N 1, s. 103—107.

9. Jordan W. P., Walker D., Miller G. H., Drylie D. M. Cryotherapy of benign and neoplastic tumors of the prostate. — Surg. Gynecol., Obstet., 1967, 125, N 6, p. 1265—1268.

Украинский институт
усовершенствования врачей МЗ СССР

Поступила в редколлегию
18.09.79

УДК 57.043:617.7:547.422.426.1

П. А. Бездетко

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА-1500 НА ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ

Полиэтиленоксиды (ПЭО) — искусственные полимерные соединения, применяемые в фармакологии и клинической медицине. Работы [4, 5, 8—10, 12, 14, 16, 17] и других исследователей открыли полиэтиленоксидам клиническое применение в качестве эффективных, низко-токсичных, не требующих отмывания криопротекторов для консервирования крови и костного мозга.

При переливании 500 мл криоконсервированной эритроцитарной взвеси в организм больного может быть введено до 100 г чистого ПЭО [12]. При введении такого количества ПЭО в связи с его высокой дегидратационной активностью [2, 3, 7, 27] можно ожидать сдвигов в гемодинамике и гидродинамике различных органов и тканей реципиента, в частности в гидродинамике глаза. Мы не нашли сведений об экспериментальных или клинических исследованиях влияния ПЭО на внутриглазное давление, что и послужило поводом для написания настоящей работы.

Опыты проведены на 66 кроликах (здесь и в дальнейшем исследовались оба глаза каждого животного) породы шиншилла, весом 1500—2000 г. Внутриглазное давление (ВГД) измерялось под местной анестезией 0,5%-ным раствором дикаина тонометром А. Н. Маклакова весом 10 г. В первой серии опытов (12 животных) изучено изменение ВГД после внутривенных вливаний растворов ПЭО-1500 различной концентрации. Растворы ПЭО готовились на изотоническом растворе хлористого натрия и вводились в краевую вену уха кролика. 15, 20, 25 и 30%-ные растворы вводились в количестве, соответствующем дозе 1,5 г чистого ПЭО на 1 кг массы животного (в среднем от 10 до 25 мл). При этом учитывалось, что при трансфузиях консервированных крови и костного мозга реципиент получает ПЭО-1500 в количестве 1,0—1,5 г/кг массы больного [12]. Результаты опытов этой серии приведены в табл. 1. Статистическая обработка произведена методом Фишера — Стьюдента. Как следует из представленных данных, при внутривенном введении растворов ПЭО-1500, начиная с 20%-ной концентрации отмечается достоверное снижение ВГД на 5,8—6,63 мм рт. ст.

В следующей серии (12 животных) изучалось изменение ВГД в зависимости от общей дозы введенного внутривенно препарата. ПЭО-1500 в 20%-ном растворе (минимальная концентрация, достоверно снижающая ВГД) вводился в количестве, соответствующем 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 г чистого вещества на 1 кг массы животного. Результаты эксперимента представлены в табл. 2 и свидетельствуют, что достоверное снижение ВГД отмечается при дозах ПЭО-1500, равных 1,0—2,0 г/кг массы.

В опытах на 9 кроликах (3-я серия) прослежена динамика ВГД после внутривенного введения 20%-ного раствора ПЭО-1500 (1,0 г/кг). Установлено, что уже через 30 мин ВГД снижается на 6,2 мм рт. ст.,

Таблица 1

Влияние различных концентраций раствора ПЭО-1500 на внутриглазное давление у кроликов при внутривенном введении, $n=6$

Концентрация, %	Доза, г/кг	Внутриглазное давление, мм рт. ст.			p
		$M_{исх} \pm m$	$M_1 \pm m$	$M_{исх} - M_1$	
15	1,5	$24,7 \pm 1,23$	$23,6 \pm 1,46$	1,1	$>0,05$
20	1,5	$28,3 \pm 2,4$	$21,7 \pm 1,7$	6,63	$<0,05$
25	1,5	$29,3 \pm 1,69$	$22,8 \pm 1,94$	6,5	$<0,01$
30	1,5	$26,9 \pm 1,47$	$21,1 \pm 1,64$	5,8	$<0,01$

затем стабилизируется и через 5 ч начинает возвращаться к исходному (рис. 1).

Таким образом, при внутривенном введении кроликам 20%-ного ПЭО-1500 ВГД снижается аналогично тому, что описано при применении глицерина, мочевины и пропиленгликоля [1, 15, 19, 20—23, 25, 29].

Таблица 2

Влияние различных доз раствора ПЭО-1500 на внутриглазное давление у кроликов при внутривенном методе введения, $n=6$

Доза, г/кг	Концентрация, %	Внутриглазное, давление, мм рт. ст.			p
		$M_{исх} \pm m$	$M_1 \pm m$	$M_{исх} - M_1$	
0,5	20	$25,2 \pm 1,6$	$24,8 \pm 1,5$	0,4	$>0,05$
1,0	20	$29,3 \pm 1,61$	$22,8 \pm 0,9$	7,05	$<0,05$
1,5	20	$28,3 \pm 2,4$	$21,7 \pm 1,7$	6,4	$<0,05$
2,0	20	$28,4 \pm 1,38$	$21,6 \pm 1,0$	6,83	$<0,01$

Учитывая, что указанные препараты вызывают снижение ВГД и при приеме внутрь [1, 13, 21—23], мы провели 3 серии опытов с пероральным введением ПЭО-1500, растворяя его в дистиллированной воде и вводя с помощью тонкого резинового зонда внутрь.

На 12 кроликах исследовано изменение ВГД после введения внутрь 20—30—40—50%-ного раствора ПЭО-1500 (табл. 3). Как видно из по-

Таблица 3

Влияние различных концентраций раствора ПЭО-1500 на внутриглазное давление у кроликов при пероральном методе введения, $n=6$

Концентрация, %	Доза, г/кг	Внутриглазное давление, мм рт. ст.			p
		$M_{исх} \pm m$	$M_1 \pm m$	$M_{исх} - M_1$	
20	1,5	$21,63 \pm 2,83$	$21,6 \pm 1,96$	-0,03	$>0,05$
30	1,5	$21,2 \pm 3,48$	$21,6 \pm 1,69$	-0,4	$>0,05$
40	1,5	$23,76 \pm 2,76$	$21,5 \pm 0,55$	2,26	$>0,05$
50	1,5	$29,2 \pm 1,64$	$21,3 \pm 1,92$	7,9	$<0,01$

лученных данных, при пероральном введении ПЭО-1500 в дозе 1,5 г/кг наступает снижение ВГД в среднем на 7,9 мм рт. ст. ($p<0,01$).

В следующих 30 опытах было изучено ВГД в зависимости от пероральной дозы ПЭО-1500 на 1 кг массы животного (табл. 4) и динамика ВГД (рис. 2). Результаты опытов свидетельствуют о том, что значимое снижение ВГД (5,4—7,9 мм рт. ст.) наступает после перорального введения ПЭО-1500 в количестве 1,5—2,0 г/кг. Максимальным снижением ВГД наступает через 90 мин и длится более 5 ч (рис. 2).

Проведенные опыты показали, что внутривенное и пероральное введения ПЭО-1500 животным в дозе 1,0—2,0 г/кг массы приводят к снижению ВГД в среднем на 5,8—7,9 мм рт. ст. Гипотензивный эффект ПЭО-1500, по всей вероятности, связан с его дегидратирующими и гиперосмотическими свойствами. Известно, что при внутривенном введении ПЭО-1500 вызывает усиленный диурез [2, 7], и в этом случае механизм гипотензивного действия ПЭО-1500 таков же, как и других осмодиуретиков, например мочевины, маннитола [1, 13, 15, 18—21, 23—26, 29].

При пероральном введении ПЭО слабо резорбируется из желудка и кишечника [28, 29]. В указанных условиях гипотензивный эффект ПЭО-1500 можно объяснить активной дегидратацией. Известно, что одна молекула ПЭО-100 может связывать до 6 молекул воды [16]. Благодаря этому ПЭО перемещает воду из крови и тканей в желудочно-кишечный тракт. Количество воды в тканях уменьшается, что и приводит к снижению ВГД. В этом

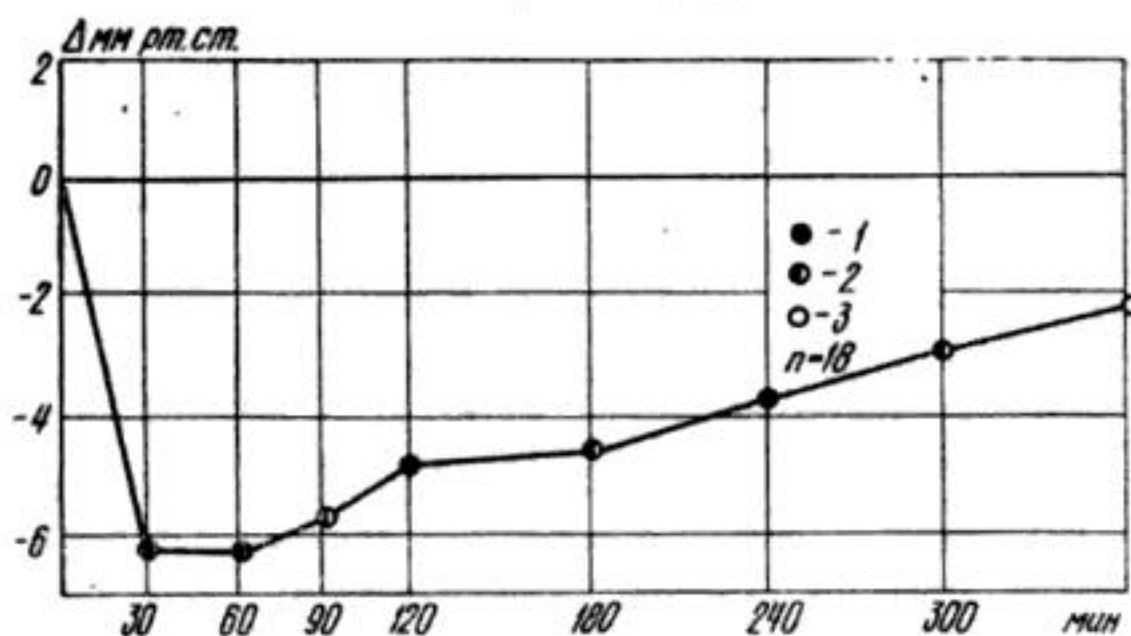


Рис. 1. Динамика внутриглазного давления после внутривенного назначения ПЭО-1500 (20%-ный раствор в дозе 1,0 г/кг) у кроликов. Здесь и на рис. 2: 1 — $p < 0,01$; 2 — $p < 0,05$; 3 — $p > 0,05$.

Таблица 4
Влияние различных доз раствора ПЭО-1500 на внутриглазное давление у кроликов при пероральном методе введения. $n=6$

Доза, г/кг	Концентрация, %	Внутриглазное давление, мм рт. ст.			p
		$M_{исх} \pm m$	$M_1 \pm m$	$M_{исх} - M_1$	
0,5	50	$27,0 \pm 2,5$	$25,4 \pm 1,07$	1,6	$> 0,05$
1,0	50	$26,5 \pm 2,27$	$22,8 \pm 1,14$	3,7	$> 0,05$
1,5	50	$29,2 \pm 1,64$	$21,3 \pm 1,92$	7,9	$< 0,01$
2,0	50	$28,3 \pm 2,41$	$22,9 \pm 1,04$	5,4	$< 0,05$

отношении ПЭО подобен глицерину, мочеvine, пропиленгликолю, успешно применяемым в клинической медицине перорально для снижения ВГД [1, 13, 15, 18—26, 31]. Однако имеются сообщения о токсичности глицерина, мочевины и пропиленгликоля и связанные с этим тяжелые осложнения при внутривенном и пероральном их введении [1, 13, 19—23, 26, 30, 31], в связи с чем возможности их клинического применения ограничены. В отличие от указанных веществ ПЭО практически нетоксичен [6, 7, 9, 28, 29] и может быть рекомендован в качестве средства для снижения ВГД в клинике (Приорететная справка № 2628575/13 (073353) от 22 мая 1978 г.).

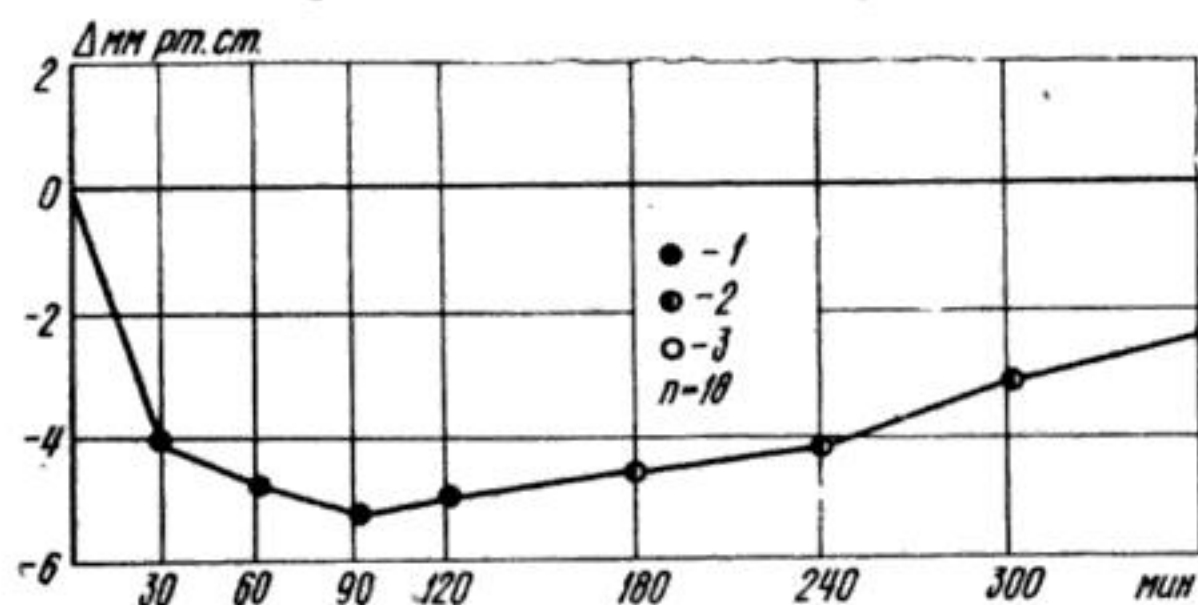


Рис. 2. Динамика внутриглазного давления после перорального назначения ПЭО-1500 у кроликов (50%-ный раствор в дозе 1,5 г/кг).

ности глицерина, мочевины и пропиленгликоля и связанные с этим тяжелые осложнения при внутривенном и пероральном их введении [1, 13, 19—23, 26, 30, 31], в связи с чем возможности их клинического применения ограничены. В отличие от указанных веществ ПЭО практически нетоксичен [6, 7, 9, 28, 29] и может быть рекомендован в качестве средства для снижения ВГД в клинике (Приорететная справка № 2628575/13 (073353) от 22 мая 1978 г.).

Выводы. Полиэтиленоксид молекулярной массы 1500 при внутривенном и пероральном введении снижает внутриглазное давление у подопытных животных; при внутривенном введении ПЭО-1500 максимальное снижение ВГД наблюдается через 30 мин после инъекции 20% раствора из расчета 1,0 г/кг массы животного; при пероральном введении максимальное снижение внутриглазного давления наблюдается в течение 1,5 ч после введения 50%-ного раствора ПЭО-1500 при общей дозе 1,5 г/кг чистого вещества; гипотензивное действие ПЭО-1500 на внутриглазное давление может быть использовано в клинической практике, например при лечении больных глаукомой.

1. Биетти Дж., Буччи М. Г. Гипотензивные глазные средства осмотического действия. — Офтальмол. журн., 1966, № 6, с. 443—453.
2. Винниченко Л. И., Сабинин Г. В., Наточин Ю. В., Шахматова Е. И. Ультраструктура и функция почки при интенсивном диурезе, вызванном фуросемидом и ПЭО-400. — Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии, 1973, № 8, с. 61—63.
3. Дворцовой В. К., Митасов В. И., Марковский А. Л., Моисеев А. В. Состояние воды в почке, перфузированной растворами полиэтиленоксида с молекулярным весом 400. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 71—73.
4. Иткин Ю. А. Исследование некоторых биофизических процессов, происходящих в клетках костного мозга при замораживании: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1972. — 21 с.
5. Иткин Ю. А. Микроскопическое исследование процессов замораживания биологических объектов. — В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, с. 26—29.
6. Наконечный А. А., Михайличенко З. П. Токсикологическая характеристика полиэтиленоксида с молекулярным весом 400. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 121—122.
7. Наточин Ю. В., Шахматова Е. И. Диуретическое действие полиэтиленгликолей. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1970, № 4, с. 79—81.
8. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (-196°) костного мозга и его использование в клинических целях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1968. — 24 с.
9. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А. и др. Консервирование клеток костного мозга под защитой полиэтиленоксидов. — В кн.: Низкотемпературное консервирование костного мозга. Киев: Наук. думка, 1976, с. 118—145.
10. Пушкарь Н. С., Василенко С. М., Лабунская В. В. и др. Токсикологическая характеристика отечественного криофилактика полиэтиленоксида с молекулярным весом 400. — Врачеб. дело, 1972, № 2, с. 120—122.
11. Пушкарь Н. С., Шенберг М. Г., Наконечный А. А. и др. Ограждающее действие полиэтиленоксида на клетки при глубоком замораживании. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 86—88.
12. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 201 с.
13. Саликлите И. И. Гипотензивные влияния мочевины на офтальмотонус в зависимости от пути введения. — Офтальмол. журн., 1964, № 7, с. 487—490.
14. Холодный А. Я., Петренко Г. И., Багаутдинов Ш. М. и др. Опыт применения полиэтиленоксида — 400 при низкотемпературном замораживании клеток посмертного костного мозга. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1976, № 12, с. 49.
15. Фрадкин М. Я., Царицина Р. Н. Гипотензивные действия мочевины при остром приступе глаукомы. — Учен. зап. Ин-та им. Гельмгольца, 1965, вып. 10. Глаукома, с. 337—341.
16. Шраго М. И. О криозащитном действии полимеров окиси этилена на эритроциты человека при глубоком охлаждении: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Харьков, 1971. — 32 с.
17. Шраго М. И., Воротилин А. М. А. с. 318624 (СССР). Способ консервации эритроцитов. — Оpubл. в Б. И., 1971, № 32.
18. Barry K. G., Khoriry A. U., Brooks M. U. Mannitol and isosorbide segmental effects on intraocular pressure, serum, osmol, sodium, solid in normal subjects. — Arch. Ophth., 1969, 81, N 5, p. 695—700.
19. Beccer B., Shaffer R. N. Diagnosis and therapy of the glaucomas. — St. Louis: Mosby, 1961, p. 232.
20. Bung R. N., Danforth R. C., Settlage P. H. Effect of intravenous urea on intraocular pressure in the monkey. — Arch. Ophth., 1957, 57, N 5, p. 659—667.
21. Bietti G. B., Bucci M. G. Le sostanze ipotonizzanti oculari ad azione osmotica. — Boll. Oculist., 1967, 45, N 5, p. 735—770.
22. Bietti G. B. Recent experimental, clinical and therapeutic research on the problem of intraocular pressure and glaucoma. — Amer. J. Ophth., 1972, 73, N 4, p. 475—499.

23. Campos K., Rinaldi G. Le mannitol endoveineux comme hypotonizzante endoculare considerations 50 eas. — Ann. d'oculist., 1964, 197, N 11, p. 1091—1092.
24. Ciucci B. M., Marinosci F., Palombi R. Efetty sull'apporato cardiociccolatorio del propilenglicole orale, quale agente osmotico ippotonizzante oculare. — Boll. Oculist., 1969, 48, N 2, p. 105—117.
25. Galin M. A., Aizava F., McLean J. Urea as an osmotic ocular hypotensive agent in glaucoma. — Arch. Ophth., 1959, 62, N 3, p. 347—352.
26. Hill K. Ocular osmoterapy with mannitol. — Amer. J. Ophth., 1964, 58, N 1, p. 79.
27. Niemeyer G. R. The poliaethylene glycol. — J. Amer. Pharm. Assoc., pract., 1947, 8, N 1, p. 94—106.
28. Shaffer C. B., Critchfield F. N. The absorption and axcretion of the solid polyaelene glycols. — J. Amer. Pharm. Assoc., Sci., 1947, 36, N 5, p. 152—155.
29. Shaffer C. B., Critchfield F. N., Nair H. The absorption and excretion of a liquid polyaelene glycol. — J. Amer. Pharm. Assoc. Sci., 1950, 39, N 6, p. 340—344.
30. Spaeth G. L., Spaeth E. B., Spaeth P. G., Lucier A. C. Anaphylactic reaction to mannitol. — Arch. Ophth., 1967, 78, N 5, p. 583—584.
31. Stubbs J., Pennybacker G. Reduction of intraocular pressure with hypertonic urea. — Lancet, 1960, 7134, N 1, p. 1094—1097.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.09.79

УДК 57.043.616.728.2—832.9

Г. А. Бабийчук, Е. Я. Панков, В. А. Македонская,
С. В. Малышкина, Л. А. Зайченко

СОСТОЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Криохирургический метод получает все более широкое распространение в медицине, особенно в тех областях, где используется возможность получения локальных некротических изменений. В ортопедии криохирургический метод прежде всего был использован для удаления разного рода опухолей (гигантоклеточных опухолей, остеогенной саркомы) и опухолеподобных заболеваний (фиброзная дисплазия) [3—6]. В последние годы появились работы, связанные с использованием криовоздействия для создания костного блока между позвонками [1, 2].

Однако возможности более широкого использования низких температур в ортопедии ограничены из-за отсутствия фундаментальных данных об особенностях реакции опорных тканей на криовоздействие, в частности, по сравнительной характеристике криочувствительности клеточных элементов и межклеточного вещества, различных образований опорно-двигательного аппарата, которые имеют сложный тканевой состав (хрящевая, костная, плотная волокнистая, кроветворная ткани). В связи с этим основной целью настоящего исследования явилось изучение характера морфологических изменений в суставном хряще головки бедренной кости белых крыс после однократного криовоздействия.

Техника эксперимента. Тазобедренный сустав вскрывали оперативным путем. Головка бедренной кости вывихивалась в рану. Криовоздействие на суставной хрящ головки производили парожидкостной струей азота с помощью аппарата АСК-6 в течение 30 с с расстояния 30 мм. Рану зашивали наглухо. За животным велись клинические наблюдения, а на 7, 14, 21, 28 и 56 сут животных забивали путем быстрой декапитации. После выделения препараты фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, заключали в целлоидин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизон. Для оценки изменений во всех компонентах тазобедренного сустава готовили ги-

стотопографические срезы при идентичной ориентации материала на блоке.

Результаты клинических исследований показали, что в ближайшем послеоперационном периоде и на протяжении всех сроков наблюдений животные активно использовали прооперированную конечность, характеризовались такой же интенсивностью двигательной активности, как и у контрольных животных.

Сравнение макроскопической характеристики суставного хряща у подопытных и контрольных крыс показало, что на 7-е и 14-е сут суставной хрящ подопытных крыс имел белесоватый оттенок и некоторую шероховатость, а в остальные сроки почти у всех животных не отличался от контрольных. Исключение составляют 3 случая, когда произошел лизис на уровне шейки бедренной кости, возможно, в связи с недостаточной защитой этой области от паровоздушной струи азота.

При исследовании микроструктуры суставного хряща головки бедренной кости через неделю после криовоздействия установлено, что на всем его протяжении основное вещество с преимущественно слабо оксифильной окраской, а хондроциты только контурируются в капсулах. В краевых отделах суставной хрящ переходит в суставную капсулу с утолщенной стенкой за счет пролиферации фибробластов и диффузной лимфоидной инфильтрации. На протяжении всей капсулы обнаруживаются расширенные и заполненные кровью сосуды. В межбалочных пространствах субхондральной костной пластинки определяется увеличение количества остеобластов на поверхности костных балочек и клеточных элементов в межбалочных пространствах, окружающих расширенные и заполненные кровью сосуды. На остальном протяжении апифиза в межбалочных пространствах обнаруживается кроветворный костный мозг. Суставной хрящ вертлужной впадины с узкой поверхностной зоной неокрашивающихся хондроцитов.

На протяжении последующих сроков наблюдения объем некротических изменений не только не увеличивался, а даже сократился за счет прорастания фибробластов в краевые отделы суставного хряща. Основное вещество суставного хряща приобрело более выраженную оксифильную окраску, хондроциты не определялись в капсулах на протяжении всего криоизмененного хряща, однако связь суставного хряща с замыкательной костной пластинкой не нарушалась. Через 2 недели в базальных отделах хряща определялась узкая зона из базофильных хондробластов, отделявших криоизмененный хрящ от замыкательной пластинки. Расширение этой зоны обнаруживалось через 3, 4, 8 недель, однако и к последнему сроку она составляла не более 1/3 толщины суставного хряща. В суставной капсуле определялось уменьшение лимфоидной инфильтрации и количества фибробластов, увеличивалось количество коллагеновых волокон в глубоких слоях.

Таким образом, в период наблюдения от 2 до 8 недель суставной хрящ после криовоздействия не отторгался, а в краевых отделах обнаруживалось прорастание хрящевого вещества фибробластами. На границе суставного хряща и замыкательной пластинки наблюдалось формирование слоя новообразованного хряща.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что непосредственно в зоне воздействия парожидкостной струи азота, где происходит льдообразование, клеточные элементы хряща подвергаются некротическим изменениям, так как после естественного отогрева их структура не восстанавливается. Отмечается четкая граница между некротически измененными и сохранившимися участками и зонами хряща. Межклеточное вещество хрящевой ткани характеризуется только изменением тинкториальных свойств, поскольку при окраске гематоксилин-эозином имеет слабооксифильную окраску, а при окраске пикрофуксином слабофуксинофильную, однако эти изменения отчетливы

только на 7-е и 14-е сут и почти перестают выявляться в последующие сроки наблюдения. Несмотря на активную нагрузку согласно клиническим наблюдениям механические качества такого хряща не изменялись.

1. Ли Л. Н. Морфологические изменения межпозвоночных дисков в ранние сроки после криовоздействия. — Ортопедия, травматология и протезирование, 1978, № 8, с. 61—63.
2. Ли Л. Н., Ходорчук В. Я. О криодеструкции межпозвоночных дисков. — Ортопедия, травматология и протезирование, 1978, № 6, с. 76—78.
3. Beaupre A., Simmons E. H., Barrington T. W., Evans D. C. Experimental cryosurgery in the treatment of malignant diseases of bone and soft tissue. — J. Bone Joint Surg. B, 1969, 51, N 12, p. 388.
4. Marcover R. C., Lyden J. P. Giant-cell tumors treated by cryosurgery. A report of twenty five cases. — J. Bone Joint Surg. A, 1973, 55, N 8, p. 1633—1644.
5. Marcover R. C., Miller T. R. The treatment of primary and metastatic localized bone tumors by cryosurgery. A presentation of fifty one cases. — J. Bone Joint Surg. A, 1969, 51, N 5, p. 1029.
6. Ven A. Regling: Kryochirurgie für die orthopädic Möglichkeiten einer Kältdestruktion bei Schwer zu behandelnden Knochentumoren. — Beitr. Orthop., 1974, 21, 11/12, S. 716—724.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.10.79

КРИОГЕННАЯ ТЕХНИКА

УДК 57.043.615.47:615.832.9

М. И. Грошевой, С. В. Руденко, С. И. Ткаченко,
И. Г. Уфимцев, Р. К. Хайкин, А. С. Черепнев

СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ МНОГОПРОГРАММНОГО ЗАМОРАЖИВАТЕЛЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ ДЛЯ СТАНЦИЙ ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ

Требования к замораживателю для станций переливания крови. Метод низкотемпературной консервации находит широкое применение на станциях переливания крови. При соблюдении необходимых режимов замораживания он обеспечивает длительное хранение и высокую выживаемость деконсервированных клеток.

Применяющиеся для криоконсервирования биоматериалов достаточно сложные исследовательские универсальные замораживатели с большим набором программ охлаждения и сравнительно низкой степенью автоматизации управления их работой мало подходят для использования на станциях переливания крови. Требуется надежный и простой в эксплуатации специализированный замораживатель с ограниченным числом апробированных и утвержденных программ охлаждения. Основные требования к такому замораживателю, обоснованные в работах [2, 4, 5], заключаются в следующем.

Криоконсервация клеточных суспензий обеспечивается с лучшими результатами при двухэтапных линейных программах охлаждения с регулируемой длительностью плато кристаллизации. Характеристики программ (скорости охлаждения, время кристаллизации, точность выдерживания скоростей и др.) влияют на жизнеспособность деконсервированного материала и должны быть вполне определенными. Клетки, замороженные по неадекватной им программе, гибнут.

Повреждение клеток на I этапе охлаждения (до начала кристаллизации), вызываемое явлением температурного шока, определяется

скоростью изменения температуры. Механизм температурного шока, несмотря на наличие ряда гипотез, нельзя считать окончательно выясненным. Ни одна из гипотез не позволяет прогнозировать величину оптимальной скорости охлаждения для данного вида клеток и криопротектора. Экспериментальными исследованиями установлено, что повреждения клеток за счет температурного шока сводятся к минимуму при сравнительно низких скоростях охлаждения ($1-10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) [1, 3, 4]. Поэтому в замораживателе для станций переливания крови целесообразно выбрать из этого диапазона три скорости I этапа охлаждения: 1, 5 и $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для любой из реализуемых программ.

После охлаждения клеточной суспензии до определенной температуры, зависящей от ее физико-химического состава, начинается кристаллизация воды. В зависимости от продолжительности кристаллизации $\tau_{\text{кр}}$ изменяется кинетика обезвоживания клеток. При достаточной длительности плато кристаллизации клетки успевают обезводиться до такой степени, что внутриклеточный лед не образуется. При малых $\tau_{\text{кр}}$ в них остается много воды, замерзающей при дальнейшем охлаждении и повреждающей клеточные структуры. Слишком большое $\tau_{\text{кр}}$ (более 20 мин) приводит к чрезмерной потере воды и пространственному сближению клеточных структур, увеличению концентрации внутриклеточных электролитов и, в итоге, к повреждению клеток [4, 5].

Очевидно, существует некоторое оптимальное для каждого вида клеточных суспензий, типа и концентрации криофилантика время кристаллизации, определяемое экспериментальным путем. Поэтому в замораживателе должна быть предусмотрена возможность управления длительностью кристаллизации примерно от 3 до 20 мин. Выдерживание $\tau_{\text{кр}}$ на каждой программе должно осуществляться автоматически.

В процессе фазового перехода «вода — лед» клетки скапливаются в канальцах между растущими кристаллами льда и не повреждаются, пока размеры канальцев превосходят размеры клеток. Когда эти размеры становятся соизмеримыми, клетки начинают повреждаться. Именно в этот момент желательно нанести «холодовой удар», т. е. резко охладить суспензию до окончания кристаллизации, в результате чего в канальцах образуются мелкокристаллические формы и уменьшается их разрушительное воздействие на клетки. Возможность такого ударного холодового воздействия должна предусматриваться в схеме управления работой замораживателя.

На II этапе охлаждения (после окончания кристаллизации) продолжается обезвоживание клеток вплоть до эвтектических температур, при которых кристаллизуются гидраты солей. При этом на клетки губительно влияет гиперконцентрация внутриклеточного раствора, и II этап охлаждения желательно проводить с большой скоростью. Но быстрое охлаждение не обеспечивает достаточного обезвоживания клеток и приводит к кристаллизации внутриклеточной воды. Наиболее благоприятные результаты получаются при замораживании клеточных суспензий крови со средними ($10-30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) скоростями II этапа охлаждения [3]. В замораживателе для станций переливания крови целесообразно иметь три скорости II этапа: 10, 20 и $30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Начальная температура программ замораживания клеточных суспензий крови может быть выбрана 10°C , поскольку кровь для криоконсервации берется из холодильника с температурой около 4°C и в процессе подготовки к консервации ее температура значительно поднимается. Начальное охлаждение подготовленной крови до 10°C осуществляется в замораживателе на этапе «разгона», т. е. выхода системы на заданную программную скорость I этапа охлаждения.

Конечная температура программного замораживания должна быть ниже температур, при которых возможны рекристаллизационные процессы. Этому условию полностью отвечает конечная температура

—150°C. Биологические эффекты, обусловленные отклонением текущих скоростей охлаждения от заданных, в настоящее время мало изучены и не позволяют обосновать требования к точностным характеристикам программ охлаждения. Исходя из эмпирических данных и простоты технической реализации системы управления, можно считать достаточным, чтобы в установившемся режиме заданные скорости охлаждения не выходили за пределы: $1 \pm 0,25^\circ\text{C}/\text{мин}$, $5 \pm 1^\circ\text{C}/\text{мин}$, $10 \pm 2^\circ\text{C}/\text{мин}$, $20 \pm 3^\circ\text{C}/\text{мин}$, $30 \pm 5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Длительность переходного режима не должна превышать 30% длительности соответствующего этапа охлаждения.

В течение рабочего дня на станции переливания крови эффективно проводится 4 полных цикла замораживания длительностью по 1,5 ч. За 1,5 ч при существующей технологии забора и обработки донорской крови можно приготовить для криоконсервации не более 1000 см³ ядродержащих клеток крови (с криопротектором и стабилизатором). Этим обуславливается емкость камеры замораживания, равная 1000 см³. Емкость используемых контейнеров рассчитана на помещение в них обработанной крови (лейкомассы) 1 или 2 доноров и составляет соответственно 50 и 100 см³.

Эффективное использование замораживателя средним медицинским персоналом станции должно обеспечиваться высокой степенью автоматизации управления и простотой эксплуатации. В функции оператора входят выбор программы (из 9 возможных), включение в работу, наблюдение и выключение. При отказе автоматики замораживатель переводится на ручной режим управления.

Функциональная схема и закон управления системы автоматического управления работой замораживателя. В соответствии с изложенными требованиями в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработан и изготовлен многопрограммный замораживатель для станций переливания крови, автоматически выполняющий любую из девяти предусмотренных двухэтапных линейных программ с плато кристаллизации. Первый этап охлаждения осуществляется со скоростями 1, 5 или 10°C/мин в температурном диапазоне от 10°C до -4°C, второй этап — со скоростью 10, 20 и 30°C/мин в температурном диапазоне от -(4÷39)°C до -150°C. При -4°C включается автоматическое прохождение плато кристаллизации с заданным $\tau_{\text{кр}}$. Переключение на II этап охлаждения выполняется при достижении температурой биоматериала значения, заданного оператором в диапазоне -5÷-39°C.

В состав замораживателя входят камера замораживания, система программного управления процессом охлаждения и система снабжения хладагентом (сосуд Х-34 с жидким азотом и переливное устройство). Функциональная схема системы управления замораживателем приведена на рис. 1.

Объектом управления является камера замораживания с загруженным биоматериалом, температура которого T_6 изменяется по заданному закону за счет изменения расхода парожидкостной смеси азота. Регулирование осуществляется автоматическим изменением эквивалентного проходного сечения ϕ регулирующего органа РО, в качестве которого используется электромагнитный клапан. Температура биоматериала T_6 и охлаждающей смеси в камере T_k измеряются с помощью измерительных схем И1 и И2 с датчиками сопротивления. Задающее устройство ЗУ1 задает линейную программу $T_{\text{пр}}$ изменения температуры биоматериала на I и II этапах и представляет собой интегратор, работающий либо в режиме интегрирования, либо в режиме запоминания. Задающее устройство ЗУ2 выдает постоянные сигналы $\delta T_{\text{пр}}$, обеспечивающие разгон системы при включении до скорости, близкой к скорости I этапа охлаждения (при $T_6 = 10^\circ\text{C}$) и регулирование длительности кристаллизации $\tau_{\text{кр}}$.

Устройства сравнения формируют сигналы рассогласований ΔT_1 и ΔT_2 , а коммутатор K выполняет коммутацию этих сигналов и получение результирующего сигнала управления ΔT_{Σ} по участкам программы, а также управляет работой запоминающих устройств. Усилитель $У$ усиливает сигналы управления до необходимой величины u_T , а ши-

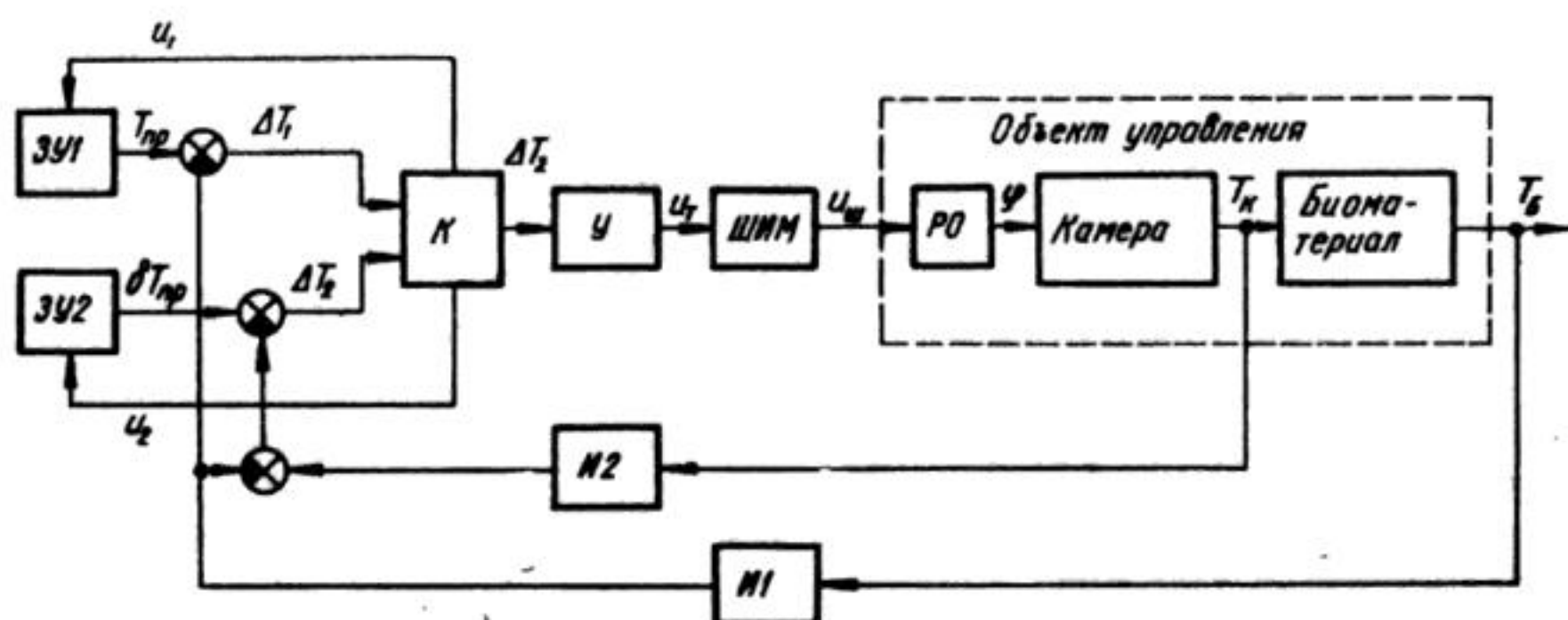


Рис. 1. Функциональная схема системы управления замораживателем клеточных суспензий для станций переливания крови.

отно-импульсный модулятор ШИМ преобразует их в импульсы $u_{ш}$, длительность которых τ пропорциональна u_T , а период повторения постоянен. Изменение сигнала управления ΔT_{Σ} при отклонении регулируемой величины от заданного значения вызывает изменение τ и эквивалентного проходного сечения φ клапана. Это ведет к изменению в нужном направлении расхода азота и управляемой величины системы.

На всех участках программы охлаждения автоматическая работа системы основана на принципе пропорционального управления по отклонению (рассогласованию) регулируемой величины от заданного значения. На рис. 2 показана программа цикла замораживания и дана временная диаграмма формирования сигналов управления по участкам программы.

На участках линейного охлаждения регулируемой величиной является температура T_6 , а управляющий сигнал ΔT_{Σ} равен сигналу рассогласования ΔT_1 между $T_{пр}$ и T_6 :

$$\Delta T_{\Sigma}(t) = \Delta T_1(t) = T_{пр}(t) - T_6(t). \quad (1)$$

На участках разгона и кристаллизации регулируемой величиной служит температурный градиент $(T_k - T_6)$ между охлаждаемой смесью в камере и биоматериалом в контейнере, а управляющий сигнал ΔT_{Σ} равен сигналу рассогласования ΔT_2 между $\delta T_{пр}$ и градиентом $(T_k - T_6)$:

$$\Delta T_{\Sigma}(t) = \Delta T_2(t) = \delta T_{пр}(t) - [T_k(t) - T_6(t)]. \quad (2)$$

На участке «холодового удара» используются оба сигнала рассогласования и управляющий сигнал будет

$$\Delta T_{\Sigma}(t) = \Delta T_1(t) + \Delta T_2(t). \quad (3)$$

Значения $T_{пр}(t)$ и $\delta T_{пр}(t)$ в (1) — (3) для каждой программы определяются данными скоростями охлаждения и длительностью кристаллизации. На участках охлаждения система работает как система программного управления изменением температуры, а на участках разгона и кристаллизации — как система стабилизации заданного температурного градиента.

Температурный градиент ($T_K - T_6$) определяет величину теплового потока из контейнера в камеру, а следовательно, и скорость охлаждения биоматериала. Это подтверждается экспериментально снятыми разгонными характеристиками камеры замораживания, которые являются решением уравнения

$$\frac{dT_6(t)}{dt} = \beta(T_6) [T_K(t - \tau_K) - T_6(t)], \quad (4)$$

где $\beta(T_6)$ — коэффициент пропорциональности, зависящий от температуры биоматериала; τ_K — запаздывание в передаче входных воздействий на камеру.

На участке охлаждения до начала кристаллизации $\beta(T_6) = \beta_1 = \text{const}$. Но датчик измеряет текущее $T_K(t)$, а не запаздывающее

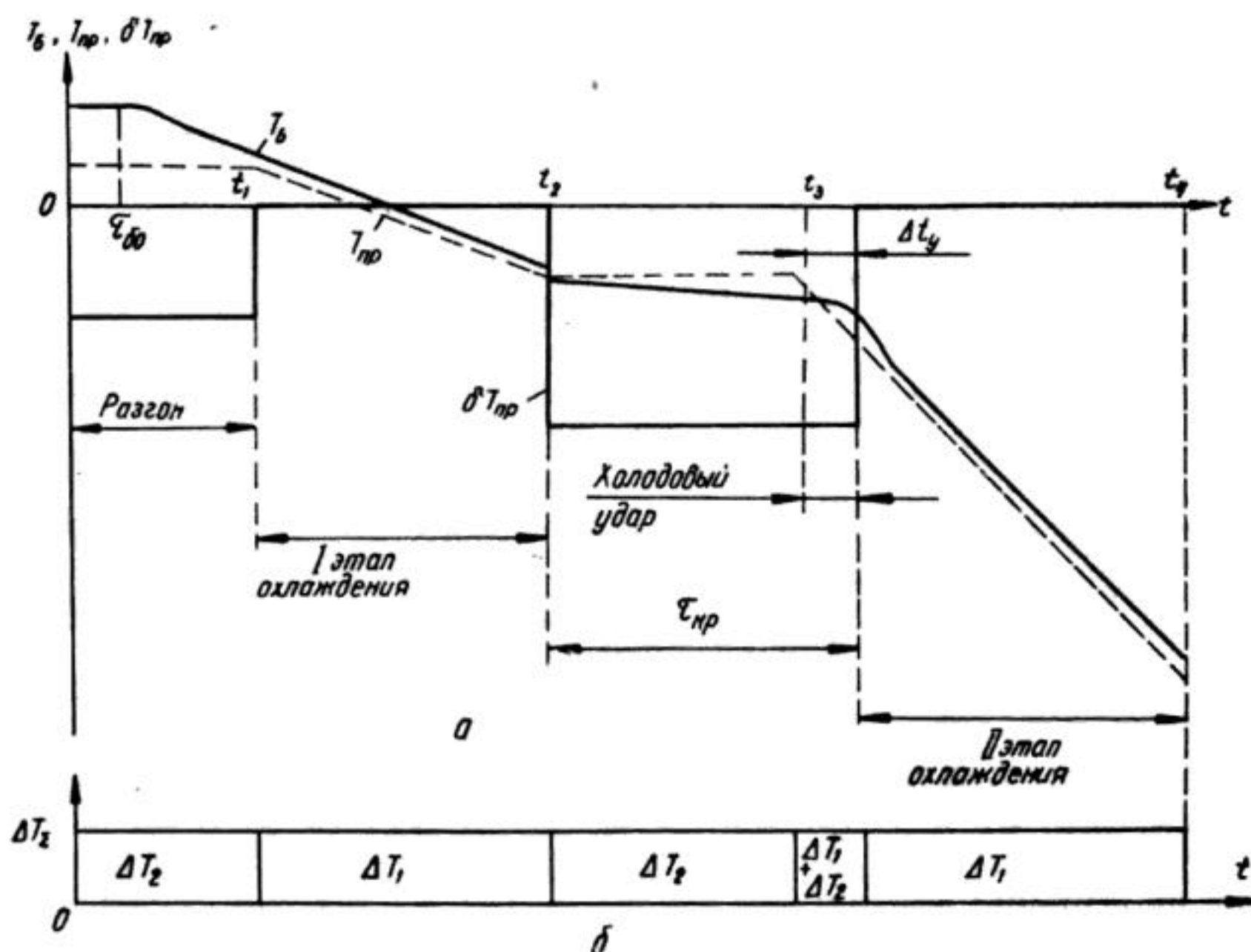


Рис. 2. К пояснению принципа работы системы:
а — программа цикла замораживания; б — диаграмма формирования сигнала управления.

$T_K(t - \tau_K)$ значение температуры. Поэтому измеряемый сигнал $[T_K(t) - T_6(t)]$ будет соответствовать скорости охлаждения с некоторой погрешностью, а рассогласование

$$\Delta T_2(t) = \delta T_{пр}(t) - [T_K(t) - T_6(t)], \quad (5)$$

где

$$\delta T_{пр}(t) = \frac{\dot{T}_{пр}}{\beta_1}, \quad (6)$$

является эквивалентом сигнала ошибки по скорости охлаждения биоматериала. Из этого следует, что на участке разгона система выходит на скорость, близкую к заданной скорости I этапа охлаждения и в дальнейшем стабилизирует ее до момента времени t_1 (температуры 10°C).

Сигнал $\Delta T_2(t)$ может быть использован и для стабилизации скорости на I этапе охлаждения, но коэффициент β_1 изменяет свое значение при вариации условий замораживания (объема и типа биоматериала, материала контейнеров и т. д.). Это требует изменения величины $\delta T_{пр}(t)$. На II этапе охлаждения использование для управления по скорости сигнала $\Delta T_2(t)$ принципиально невозможно, так как коэффициент $\beta_2(T_6)$ зависит от температуры. Поэтому на I и II этапах охлаждения более целесообразно программное управление температурой по сигналам $\Delta T_1(t)$.

Экспериментально найденная зависимость $\beta_2(T_6)$ аппроксимируется выражением

$$\beta_2(T_6) = 0,58 - 1,8 \cdot 10^{-2} T_6. \quad (7)$$

Клеточные суспензии крови представляют собой неоднородные среды и кристаллизуются в некоторой области температур $\Delta T_{кр}$. Температура биоматериала в течение $\tau_{кр}$ линейно уменьшается от некоторого начального значения $T_{кр.н}$:

$$T_6(t) = T_{кр.н} - \frac{\Delta T_{кр}}{\tau_{кр}} t. \quad (8)$$

Изменение $\tau_{кр}$ участка кристаллизации осуществляется за счет регулирования величины температурного градиента $(T_k - T_6)$, т. е. скорости отвода тепла, по рассогласованию

$$\Delta T_2(t) = \delta T_{пр.кр} - [T_k(t) - T_6(t)]. \quad (9)$$

Опорные сигналы $\delta T_{пр.кр}$, соответствующие заданному значению $\tau_{кр}$, определяются соотношением

$$\delta T_{пр.кр} = \frac{\lambda}{\tau_{кр}}, \quad (10)$$

где λ — постоянная величина, получаемая в результате обработки экспериментально снятых разгонных характеристик камеры.

Переход на управление по сигналу $\Delta T_2(t)$ на участке кристаллизации производится в момент времени $t_2 = \arg T_6(T_{кр.н}^*)$, когда температура биоматериала достигает значения $T_{кр.н}^* = -4^\circ\text{C}$, меньшего всех возможных температур фактического начала кристаллизации. Из-за этого на участке $(T_{кр.н}^* - T_{кр.н})$ будет наблюдаться переходный процесс изменения скорости охлаждения.

На участке холодного удара в течение времени Δt_y оказывается дополнительное холодное воздействие, сокращающее длительность кристаллизации и облегчающее выход системы на скорость II этапа охлаждения. Момент включения холодного удара t_3 определяется по достижению T_6 некоторого значения $T_{уд}$, находящегося внутри интервала температур кристаллизации, т. е.

$$t_3 = \arg T_6(T_{уд}), \quad (11)$$

где

$$T_{уд} = T_{кр.н} + \frac{2}{3} \Delta T_{кр}.$$

Для полного математического описания работы системы необходимо дополнить соотношения (1) — (4), (7) — (9) уравнениями элементов системы. Процессы в камере замораживания, если не учитывать начального запаздывания $\tau_{к0}$, вызываемого ее захолаживанием, и сместить начало отсчета времени, могут быть описаны уравнением

$$T_k(t) = T_k(0) - \int_0^t \alpha_\varphi(t) dt. \quad (12)$$

Величина $\alpha_\varphi(t)$ является некоторой функцией, имеющей смысл скорости изменения температуры. Определяется она при обработке семейства экспериментально снятых разгонных характеристик камеры $T_k(t)$ при различных $\varphi = \text{const}$.

Уравнение широтно-импульсного модулятора и схемы управления клапаном, если его эквивалентное проходное сечение φ за период повторения импульсов выразить в процентах, имеет вид

$$\varphi = 100\eta u_T + C, \quad (13)$$

где η — коэффициент передачи клапана со схемой управления; C — постоянная, зависящая от электрических свойств обмотки клапана, времени задержки при срабатывании и отпускании и периода повторения импульсов.

Выражение (13) справедливо для $u_{T \text{ пор}} < u_T < u_{T \text{ max}}$. При $u_T < u_{T \text{ пор}}$ $\varphi = 0$, а при $u_T > u_{T \text{ max}}$ $\varphi = \varphi_{\text{max}}$.

Остальные элементы системы являются безынерционными звеньями. Коэффициенты передачи коммутатора и устройств сравнения равны 1. Тогда усилитель и измерители температуры описываются уравнением

$$u_T = K_K K_U \Delta T_\Sigma = K \Delta T_\Sigma. \quad (14)$$

Здесь K_K — коэффициент передачи измерителей температуры; K_U — коэффициент усиления усилителя.

Цифровое моделирование уравнений (1) — (14) на машине М220 позволило уточнить значения основных параметров системы и показало хорошее качество и устойчивость процессов управления. Результаты моделирования использовались при разработке опытного образца многопрограммного замораживателя для станций переливания крови. Основные достоинства рассматриваемого замораживателя заключаются в следующем.

Использование для управления на участках разгона и кристаллизации сигнала рассогласования между заданным $\delta T_{\text{пр}}$ и текущим значением градиента ($T_k - T_6$) — принципиально новое техническое решение, позволившее сократить время выхода системы на установившуюся скорость I этапа охлаждения и управлять длительностью процесса кристаллизации. Введение холодного удара в конце кристаллизационного плато влияет на кинетику кристаллизации и способствует образованию неразрушающих клетки мелкокристаллических структур льда. Кроме того, за счет холодного удара облегчается вывод системы на большие скорости II этапа охлаждения.

Схема, конструкция и эксплуатация системы управления замораживателем значительно упростились, ожидается получение большей надежности его работы. Это достигнуто благодаря применению программного задающего устройства ЗУ1 в виде интегрирующего операционного усилителя вместо сложного традиционного блока на цифровых элементах с преобразователем код — аналог, и практически безынерционного электромагнитного клапана с достаточно линейной расходной характеристикой вместо вентиля с электродвигательным приводом, обладающего инерционностью и существенно нелинейной расходной характеристикой.

Экспериментальные исследования опытного образца замораживателя. При испытаниях опытного образца многопрограммного заморажива-

Этап охлаждения	Номер термограммы	Скорость охлаждения, °C/мин	Ошибка по скорости		Время регулирования		Заброс температуры		$R_{кр}$, кОм	$\tau_{кр}$, мин
			$\delta \dot{T}_6$, °C/мин	δT_6 ср, °C/мин	t_p , %	t_p ср, %	ΔT_6 , °C	ΔT_6 ср, °C		
I	4	1	0,00	0,11	12,30	16,40	0,80	1,7	3,30	5,82
	2	1	0,22		20,10		2,60		5,30	14,50
	1	5	0,10	0,20	1,00	9,40	0,50	0,48	2,20	4,00
	3	5	0,40		16,10		0,50		2,20	3,40
	7	5	0,50		16,30		0,80		4,50	7,45
	6	5	0,00		13,60		0,60		2,60	5,20
	5	5	0,00		0,00		0,00		3,8	6,10
	8	10	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,4	4,46
II	1	10	0,30	0,10	11,20	15,20	2,00	2,37	—	—
	3	10	0,10		12,40		1,50		—	—
	4	10	0,00		15,40		2,00		—	—
	2	10	0,00		22,00		4,00		—	—
	8	20	0,40	0,40	25,00	25,00	5,00	5,00	—	—
	7	30	1,00	1,50	47,00	48	11,00	11,00	—	—
	6	30	2,00		53,00		12,00		—	—
	5	30	1,50		47,00		10,00		—	—

теля для станций переливания крови экспериментальным путем определялись его основные технические характеристики и параметры. Для этого снимались термограммы процессов охлаждения имитатора биоматериала, близкого по своим теплофизическим свойствам к суспензиям ядродержащих клеток крови. В качестве имитатора биоматериала

использовался 10%-ный физиологический раствор ПЭО-400. Камера замораживания загружалась 7 контейнерами с общим объемом замораживаемого имитатора 500 см³. Термограммы записывались самописцем ЛКС4. Датчик температуры T_6 помещался в центре контрольного контейнера.

Основными параметрами, характеризующими качество управления выполнением программы, являются: ошибка $\delta \dot{T}_6$

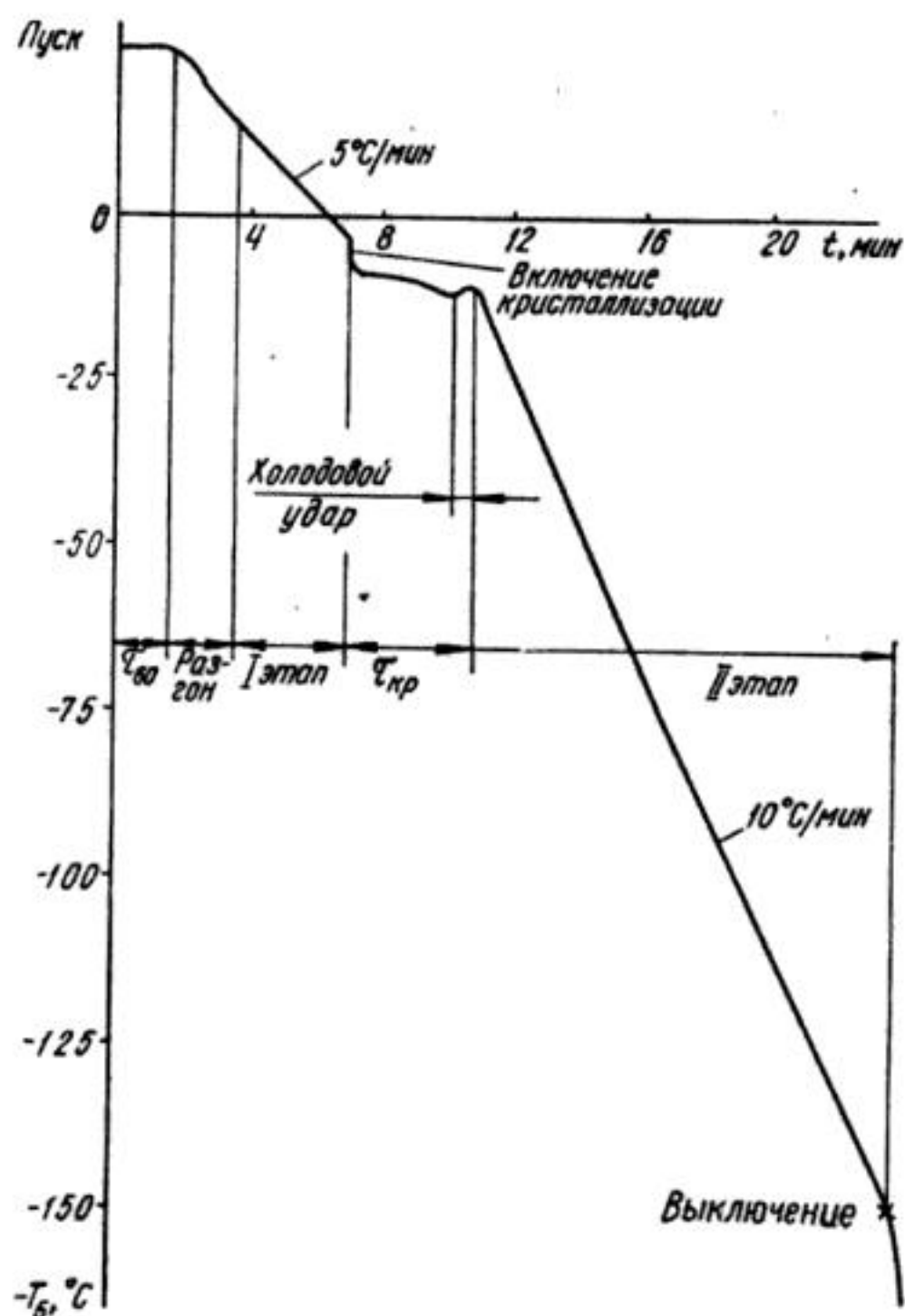


Рис. 3. Термограмма замораживания имитатора.

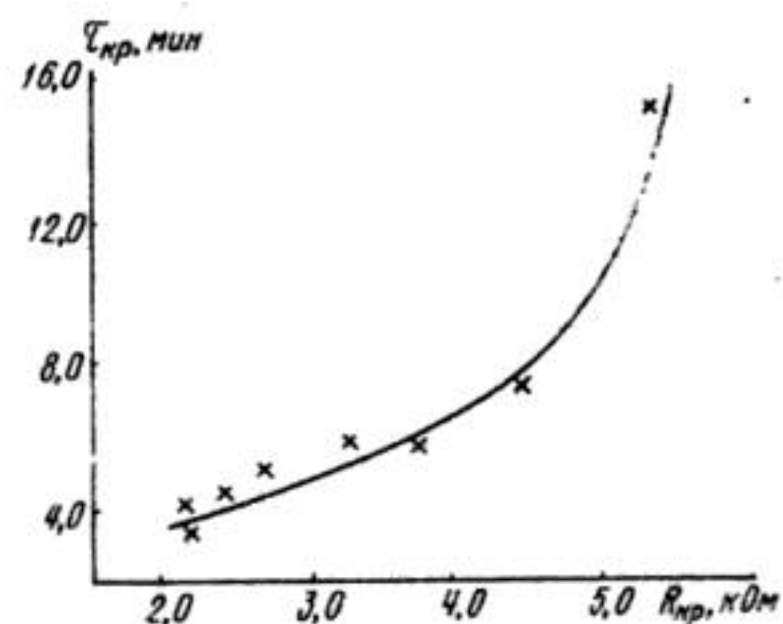


Рис. 4. Зависимость $\tau_{кр} = f(R_{кр})$.

выдерживания заданной скорости охлаждения в установившемся режиме; длительность t_p переходного режима (время регулирования); отклонение или заброс ΔT_6 температуры в переходном процессе. При обработке термограмм относительная величина t_p , выраженная в процентах, находилась делением времени от начала этапа до момента, когда скорость входит в предусмотренный требованиями коридор, на длительность этапа.

Результаты обработки термограмм 8 процессов замораживания по разным программам представлены в таблице. Там же приведены значения параметра $R_{кр}$ настройки схемы, определяющего длительность кристаллизации, и полученного по термограммам времени $\tau_{кр}$. На рисунке 3 показана одна из обработанных нами термограмм замораживания.

Из таблицы следует, что на всех скоростях охлаждения ошибки δT_6 существенно меньше допускаемых требованиями. Время регулирования t_p на скорости $30^\circ\text{C}/\text{мин}$ превышает допустимую норму из-за сокращения длительности процессов при неизменной инерционности камеры. Величина забросов ΔT_6 вполне приемлема. Зависимость $\tau_{кр}$ от $R_{кр}$, построенная по данным таблицы, показана на рис. 4.

Система снабжения замораживателя жидким азотом обеспечивает выполнение четырех циклов замораживания по любой из девяти имеющихся программ.

По своим техническим характеристикам замораживатель отвечает сформулированным в статье требованиям. Замораживание донорской лейкомассы с 10%-ным ПЭО-400 по программе: охлаждение со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ — выдержка на плато кристаллизации 5 мин — охлаждение со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$, показало высокую жизнеспособность клеток деконсервированной лейкомассы ($97 \pm 0,3\%$) и хорошую повторяемость результатов.

1. Консервирование костного мозга при ультранизких температурах с применением 15% глицерина: Методические рекомендации / Минздрав СССР. — М., 1973. — 48 с.
2. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки криобиологии. — Л.: Наука, 1972. — 288 с.
3. Полякова А. И. Изучение влияния низких температур (-196°C) и криопротектора ПЭО-400 на сохранность лейкоконцентрата и лимфоконцентрата периферической крови человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1975. — 21 с.
4. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 325 с.
5. Пушкарь Н. С., Лобынцева Г. С., Полякова А. И. и др. Разработка оптимальных режимов программного замораживания лейкоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, № 8, с. 8—13.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22.03.79

УДК 57.043

В. Ф. Криворотько

КРИОУРОЛОГИЧЕСКАЯ АППАРАТУРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Впервые криогенные методы лечения в урологии применялись в 1964 г., когда Жондер и соавторы [3] модернизировали аппарат Купера [12]. Нами первый опытный образец установки создан в сотрудничестве с Физико-техническим институтом АН УССР в 1968 г. Он состоял из криокатетера, сосуда Дьюара, системы управления и контроля.

Криокатетер (рис. 1) представлял собой зонд (1) с рукояткой (2), в которой по гибкому металлическому шлангу подавался жидкий азот под давлением $1,5 \text{ кг/см}^2$. По внутренней трубке зонда (3) жидкий азот подавался в теплообменную камеру (4), где он испарялся, а пары его отводились через среднюю трубку (5). Наружная трубка (6) обе-

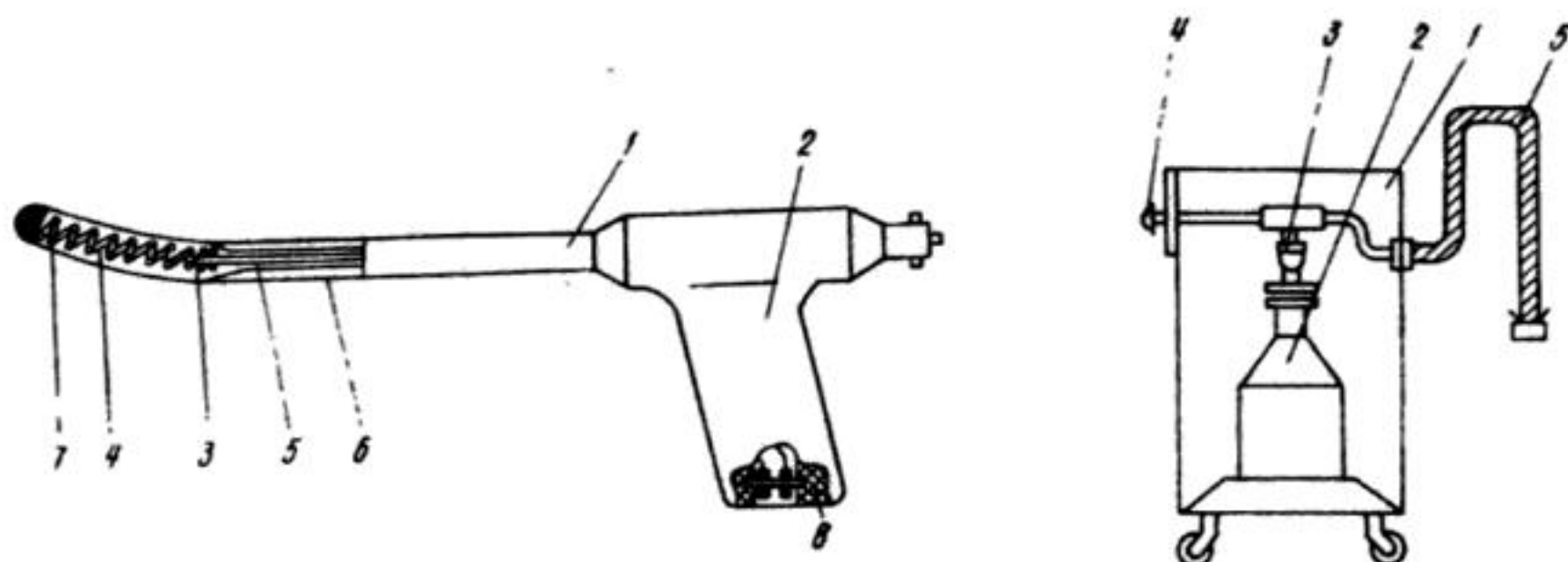


Рис. 1. Схематическое изображение криокатетера:

1 — зонд; 2 — рукоятка; 3 — внутренняя трубка зонда; 4 — теплообменная камера; 5 — средняя трубка; 6 — наружная трубка; 7 — электрический нагреватель; 8 — разъем электрической сети.

Рис. 2. Схема пульта управления криокатетера:

1 — корпус; 2 — сосуд Дьюара; 3 — переливное устройство жидкого азота; 4 — вентиль подачи жидкого азота; 5 — гибкий металлический шланг.

спечивала вакуумную изоляцию хладопроводов. В теплообменной камере (активная рабочая часть) криокатетера был встроен электрический нагреватель (7), позволяющий после проведения замораживания легко и быстро извлечь криокатетер из замороженной ткани, разъем электрической сети (8).

Пульт управления (рис. 2), обеспечивающий подачу жидкого азота в криокатетер, состоял из корпуса (1), куда помещался сосуд Дьюара (2), переливное устройство жидкого азота (3) и вентиль подачи жидкого азота (4), а также гибкого металлического шланга (5). Органы управления располагались на панели (рис. 3) в верхней части корпуса.

Изменение температуры при замораживании и оттаивании ткани опухоли предстательной железы и парапростатической клетчатки осуществлялось с помощью погруженных в них медь-константановых термодпар, вмонтированных в инъекционные иглы. В качестве регистрирующего прибора использовали потенциометр самопишущий автоматический (ПС-1), шкала которого была проградуирована в пределах от 40 до -200°C . Калибровка потенциометра производилась с помощью опорного высокостабилизированного источника питания (ИПС). В основу принципа измерения температур положен компенсационный метод измерения напряжения. Упрощенная электрическая схема измерения температуры представляла собой мост, в диагональ которого включены датчики (медь-константановые термопары). Принципиальная схема измерения температуры представлена на рис. 4.

Данные технического описания прибора и инструкция по его эксплуатации разработаны Физико-техническим институтом низких температур АН УССР. Указанная установка апробирована в эксперименте, при этом использовались соответствующие криокатетеры малого диаметра с укороченной теплообменной камерой, и применена в клинику 9 больных.

Модельные опыты, результаты экспериментальных исследований и клинических наблюдений показали, что установка обладает недостаточной хладопроизводительностью. Для иллюстрации приводим данные

одного из модельных опытов. Теплообменная камера криокатетера погружалась в медный цилиндр, диаметром 10 см, содержащий 120 мл физиологического раствора с температурой 20°C. Контролирующие термодатчики размещались на расстоянии соответственно 0,3; 1 и 2 см от поверхности теплообменной камеры. После включения подачи азота

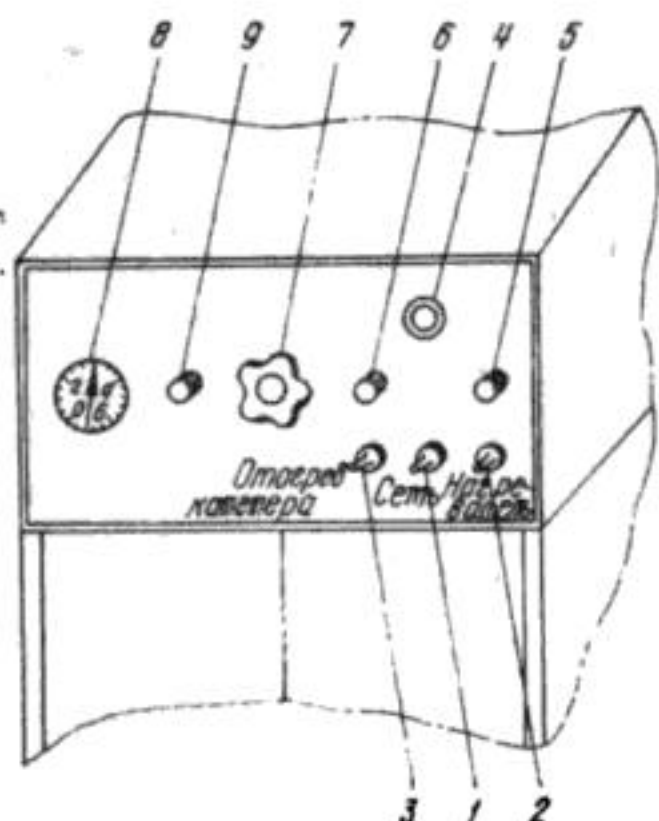


Рис. 3. Панель управления:

1 — включение сети; 2 — включение электронагревателя сосуда Дьюара; 3 — включение отогрева катетера; 4 — лампочка сигнализации работы; 5 — гнездо для термодатчиков; 6 — гнездо для термодатчиков; 7 — предохранительный клапан сброса давления; 8 — манометр измерения уровня давления в системе; 9 — гнездо для термодатчиков.

пленной непосредственно возле криокатетера (на расстоянии 0,3 см) достигала температуры 0°C (см. таблицу).

Представленные в таблице данные, характеризующие градиент температуры вокруг криокатетера, свидетельствуют, что отвод тепла протекает сравнительно медленно. Данные литературы того времени [3] рекомендовали экспозицию замораживания в течение 5—8 мин. Созданный образец криокатетера обеспечивал понижение температуры до —120°C лишь вблизи своей поверхности. На расстояние в 1—2 см в течение этого времени холод практически не распространялся, и лишь спустя 10—12 мин температура ледяного пара вокруг криокатетера в радиусе 2 см достигала соответственно —45 и —50°C. Поэтому в клинике мы были вынуждены использовать более длительные экспозиции, что вызывало ряд отрицательных последствий (восходящий флеботромбоз, тромбоэмболии и т. д.).

Тщательный анализ причин недостаточной холодопроизводительности криокатетера с привлечением дополнительных экспериментальных исследований, математических расчетов и данных литературы позволил установить основные причины указанных недостатков. Оказалось, что конструктивные особенности теплообменной камеры и значительная тепловая нагрузка от живой ткани приводят к пленочному кипению азота в теплообменнике. Указанный факт, описанный как сфероидальное состояние жидкого азота или состояние его пленочного кипения, лежит в основе нарушения интенсивного теплообмена между хладагентом и окружающей средой. Кроме того, расположение вентиля подачи азота непосредственно у сосуда Дьюара обуславливало одновременное

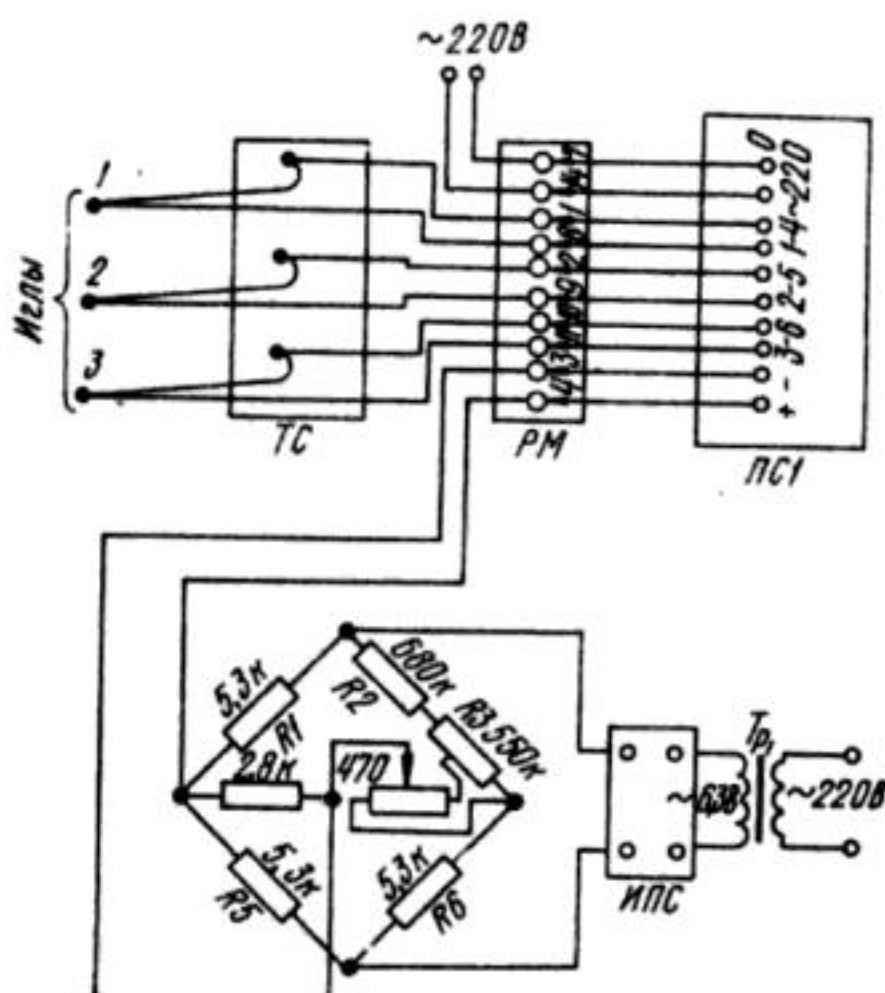


Рис. 4. Принципиальная схема измерения температуры.

требовался определенный период времени на охлаждение магистрали и активной рабочей части криокатетера. Изучение холодопроизводительности криокатетера начинали с момента, когда температура термодатчиков, укреп-

Динамика снижения температуры

Термопара	Поминутное снижение						
	0	1	2*	3	4	5	6
I	0	7	-25	-44	-54	-68	-100
II	18	16	11	8	8	6	0
III	20	19	19	19	17	17	17

- * Выброс паров азота из катетера сменился жидким азотом.
 ** Подача азота прекратилась.
 *** Включение подогрева.

охлаждение подающей магистрали и криокатетера, что резко увеличивало период снижения температуры в теплообменной камере до азотной температуры. При этом учитывалось, что в условиях живого организма, когда объект замораживания постоянно обогревался за счет кровотока (и тем активнее, чем он лучше васкуляризируется), замораживание в короткие сроки до низких температур может быть обеспечено лишь при использовании установки наиболее высокой холодопроизводительностью.

В целях разработки аппарата повышенной холодопроизводительности были использованы технические приемы, направленные на ликвидацию или резкое ограничение пленочного кипения жидкого азота. Созданная в соответствии с этими требованиями урологическая криогенная установка АКВ-1 отличалась конструкцией активной рабочей части криокатетера, в которой для обеспечения устранения пленочного кипения жидкого азота полость отводящего хладопровода в зоне активной рабочей части катетера заполнена посеребренной медной проволокой 0,02 мм, имеющей тепловой контакт с приводящим хладопроводом и с внутренней поверхностью теплообменной камеры.

Модельные опыты и экспериментальные исследования, проведенные совместно с сотрудниками Физико-технического института низких температур АН УССР, выявили, что холодопроизводительность модернизированного криокатетера в 1,5—2 раза превышает аналогичный параметр криокатетера первого образца и соответствует таковой криокатетеру установки СЕ-4 (США).

Одновременно с этим изменена система подачи азота таким образом, что конструкция позволяла проводить предварительное охлаждение гибкого металлического шланга. Вследствие этого при включении в магистраль криокатетера охлаждение его активной рабочей части происходило значительно быстрее, практически одновременно с включением криокатетера начиналось замораживание ткани опухоли, прилежащей к активной рабочей части. Исключался период медленного охлаждения окружающих катетер опухолевых тканей во время охлаждения шланга магистрали и криокатетера, наблюдаемый в первом образце криогенной установки. Последний факт имел важное значение в клинике, поскольку длительный период холодового воздействия на опухоль в условиях незначительной отрицательной температуры активной рабочей части криокатетера неблагоприятно сказывался на реологических свойствах оттекающей от опухоли крови.

1. Cooper J. S. Cryogenic surgery of the basal ganglia. — JAMA, 1962, 181, N 7, p. 600—604.
2. Cooper J. S. Cryogenic surgery (A new method of destruction or extirpation of benign or malignant tissue). — N. Engl. J. Med., 1963, 268, N 14, p. 743—749.
3. Gonder M. J., Soanes W. A., Smith V. Experimental prostate cryosurgery. — Invest. Urol., 1964, 1, N 6, p. 610—619.

Украинский институт
 усовершенствования врачей
 МЗ СССР

Поступила в редколлегию
 18.09.79

температуры, °C							
7	8**	9	10	11	12	13	14***
-118	-124	-124	-124	-124	-124	-113	-76
-13	-20	-37	-41	-54	-54	-54	-55
-2	-6	-18	-29	-39	-46	-49	-49

УДК 57.043.536.421.4

М. Л. Печеный

К ВОПРОСУ О ТЕПЛООБМЕНЕ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В КОНТЕЙНЕРАХ

В настоящее время считается доказанным, что для достижения максимальной сохранности биологических объектов в процессе их низкотемпературного консервирования необходимо осуществлять замораживание объектов в некотором оптимальном режиме с заданной степенью точности. Однако на практике при замораживании и отогреве биообъектов в контейнерах, особенно на стадии промерзания, температурное поле биообъекта характеризуется значительной неравномерностью вследствие тепловой инерции и термического сопротивления слоя биоматериала. В связи с этим невозможно добиться идентичности выполнения режимов замораживания для частей биообъекта, расположенных в центральной и периферийной зонах контейнера. Снижение температурной неравномерности с помощью уменьшения слоя биообъекта нельзя признать целесообразным, поскольку это ведет к увеличению размеров контейнеров.

Из указанного следует, что для повышения качества выполнения режимов и сохранности биообъектов в процессе замораживания необходим подбор контейнеров для каждой группы сходных режимов, что предполагает теоретическое и экспериментальное исследование процессов теплообмена внутри контейнера. Теоретически тепловые процессы, происходящие при замораживании биообъекта, относятся к классу задач типа Стефана. Большинство работ [2, 3, 7, 9], опубликованных в этой области, относятся к изучению более простого случая — теплообмену с фазовыми переходами в полубесконечных телах. Работы, описывающие теплообмен с фазовыми переходами в ограниченных телах [1, 4—6, 10], как правило, в связи со ставящейся задачей, основываются на ряде упрощений и не учитывают существенное влияние таких факторов, как нестационарность внешних условий, изменение объема вещества при кристаллизации и т. д., что придает им приближенный характер.

В настоящей статье рассматривается процесс замораживания жидкого биопродукта в тонкостенном плоском контейнере, толщина которого значительно меньше прочих его линей-

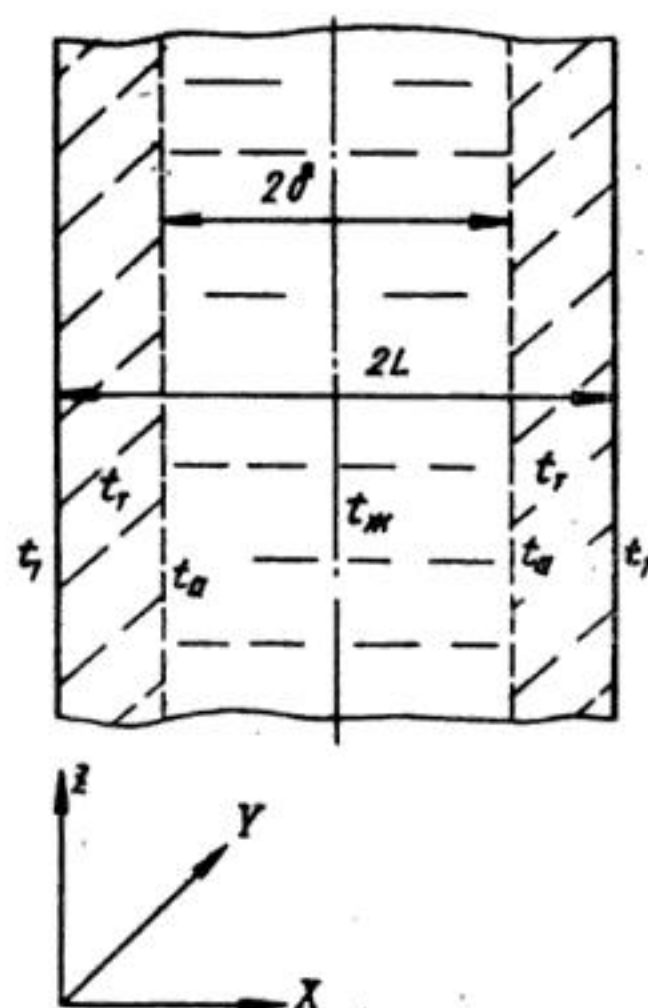


Рис. 1. Расчетная схема контейнера.

ных размеров (рис. 1), равномерно охлаждаемом с обеих сторон. При этом приняты следующие допущения: среда считается однородной; фронт кристаллизации является плоским и параллельным стенкам контейнера; вследствие малости толщины контейнера естественная конвекция в жидкой фазе отсутствует; градиент температур существует только вдоль оси X по толщине контейнера.

В начальный момент времени ($\tau=0$) контейнер имеет постоянную температуру t_0 , превышающую температуру фазового перехода $t_0 > t_{\text{ф}}$. Температура на границе контейнера t_1 является функцией времени $t_1 = t_1(\tau)$. При $\tau=0$ $t_1 = t_0$.

Рассмотрим процесс охлаждения области жидкости ($-\delta \leq X \leq \delta$). Дифференциальное уравнение теплопроводности для этой области имеет вид:

$$a_{\text{ж}} \frac{\partial^2 t_{\text{ж}}}{\partial X^2} = \frac{Dt_{\text{ж}}}{d\tau}. \quad (1)$$

При краевых условиях

$$\tau=0; \quad 2\delta=L; \quad t=t_0; \quad t_1=t_0; \quad (2)$$

$$\tau>0; \quad X=\pm\delta; \quad t=t_a(\tau); \quad (3)$$

$$\delta = \begin{cases} \tau < \tau_0; \quad \delta = L; \\ \tau \geq \tau_0; \quad \delta = \delta(\tau). \end{cases} \quad t_a = \begin{cases} \tau < \tau_0; \quad t_a = t_1(\tau); \\ \tau \geq \tau_0; \quad t_a = t_{\text{ф}}; \end{cases} \quad (4)$$

где τ_0 — время начала образования ледяной корки. τ_0 определяется из условий $t_1(\tau_0) = t_{\text{ф}}$. (5)

На подвижной границе фронт кристаллизации — условие Стефана:

$$X=\pm\delta; \quad \lambda_{\text{ж}} \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial X} - \lambda_{\text{т}} \frac{\partial t_{\text{т}}}{\partial X} = \rho_{\text{т}} r \frac{d\delta}{d\tau}. \quad (6)$$

Представим полную производную $Dt_{\text{ж}}/d\tau$ в виде суммы локальной и конвективной составляющих:

$$\frac{Dt_{\text{ж}}}{d\tau} = \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial \tau} + v_x \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial X} + v_y \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial Y} + v_z \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial Z}, \quad (7)$$

где v_x, v_y, v_z — скорости вынужденной конвекции, вызванной изменением объема вещества при замерзании.

Согласно предположению об отсутствии градиента температур вдоль осей Y и Z одномерная постановка задачи

$$v_y \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial Y} = v_z \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial Z} = 0.$$

Для определения составляющей скорости v_x рассмотрим процесс течения жидкости в плоском вертикальном контейнере, открытом сверху. Система уравнений гидродинамики, включающая уравнение неразрывности (8), уравнение импульсов (9) и уравнение интегрального баланса расхода (10) имеет вид

$$\frac{\partial \rho}{\partial \tau} + \text{div}(\rho \vec{v}) = 0; \quad (8)$$

$$\vec{F} - 1/\rho \text{ grad } P = d\vec{V}/d\tau; \quad (9)$$

$$\int_0^{\delta} v_x dX = \frac{\rho_{\text{ж}} - \rho_{\text{т}}}{\rho_{\text{ж}}} \frac{d\delta}{d\tau} Z. \quad (10)$$

При краевом условии на границе раздела фаз

$$v_x \Big|_{X=\delta} = \frac{\rho_{\text{ж}} - \rho_{\text{т}}}{\rho_{\text{ж}}} \frac{d\delta}{d\tau}. \quad (11)$$

Решение приведенной системы уравнений методом потенциальных течений приводит к линейному закону распределения составляющей скорости v_x по сечению непромерзшего слоя:

$$v_x = \frac{\rho_{\text{ж}} - \rho_{\text{т}}}{\rho_{\text{ж}}} \frac{d\delta}{d\tau} \frac{X}{\delta}. \quad (12)$$

С учетом решения (12) исходное уравнение (1) примет вид

$$a_{\text{ж}} \frac{\partial^2 t_{\text{ж}}}{\partial X^2} - \frac{\rho_{\text{ж}} - \rho_{\text{т}}}{\rho_{\text{ж}}} \frac{d\delta}{d\tau} \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial X} \frac{X}{\delta} = \frac{\partial t_{\text{ж}}}{\partial \tau}. \quad (1')$$

Произведем замену переменных

$$\eta = \frac{X}{\delta}; \quad Fo = \int_0^{\tau} \frac{a_{\text{ж}}}{\delta^2} d\tau; \quad \bar{t} = t_{\text{ж}} - t_a. \quad (1a)$$

Тогда окончательно уравнение теплопроводности запишется следующим образом:

$$\frac{\partial^2 \bar{t}}{\partial \eta^2} - \frac{\rho_{\text{ж}} - \rho_{\text{т}}}{\rho_{\text{ж}}} \frac{X}{\delta} \frac{d\delta}{d\tau} \frac{\partial \bar{t}}{\partial \eta} = \frac{\partial \bar{t}}{\partial \tau} + \frac{\partial t_a}{\partial \tau}. \quad (1'')$$

В случае $\tau < \tau_0$ до начала кристаллизации

$$\frac{\partial^2 \bar{t}}{\partial \eta^2} = \frac{\partial \bar{t}}{\partial Fo} + \frac{\partial t_a}{\partial Fo}. \quad (1''')$$

Точное решение уравнения (1''') имеет вид при граничных условиях (2) — (4):

$$t_{\text{ж}} = t_a + \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \cos \frac{\pi n}{2} \frac{X}{\delta} \left[\int_0^{Fo} \frac{\partial t_a}{\partial Fo} e^{\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo} dFo \right] e^{-\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo}. \quad (13)$$

С высокой степенью точности решение уравнения (1'') можно представить в следующем виде:

$$t_{\text{ж}} = t_a + \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \left(\frac{\delta}{L}\right)^{(-1)^n \frac{\rho_{\text{т}}}{\rho_{\text{ж}}}} \cos \frac{\pi n}{2} \frac{X}{\delta} \left[\int_0^{Fo} \frac{\partial t_a}{\partial Fo} \times \right. \\ \left. \times \left(\frac{\delta}{L}\right)^{-(-1)^n \frac{\rho_{\text{т}}}{\rho_{\text{ж}}}} e^{\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo} dFo \right] e^{-\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo}. \quad (13')$$

С учетом условия (4) решения (13) и (13') можно объединить в одно:

$$t_{\text{ж}} = t_a + \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} F_{\delta} \cos \frac{\pi n}{2} \frac{X}{\delta} \left[\int_0^{Fo} \frac{\partial t_a}{\partial Fo} F_{\delta}^{-1} e^{-\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo} dFo \right] \times$$

$$\times e^{-\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo} \quad (14)$$

где

$$F_{\delta} = \left(\frac{\delta}{L} \right) (-1)^n \frac{\rho_{\tau}}{\rho_{\text{ж}}} \sigma_0;$$

$$\sigma_0 = \begin{cases} 1 & \text{при } Fo \geq Fo_0; \\ 0 & \text{при } Fo < Fo_0; \end{cases} \quad (14a)$$

$$Fo_0 = \int_0^{\tau_0} \frac{a_{\text{ж}}}{\delta^2} dFo.$$

Таким образом, получено решение, позволяющее рассчитывать распределение температур в жидкой фазе как до начала кристаллизации, так и в процессе нее.

Рассмотрим процесс охлаждения и роста слоя льда

$$\delta \leq |X| \leq L; \tau \geq \tau_0.$$

Дифференциальное уравнение теплопроводности для данной области имеет вид

$$a_{\tau} \frac{\partial^2 t_{\tau}}{\partial X^2} = \frac{\partial t_{\tau}}{\partial \tau}; \quad (15)$$

при краевых условиях

$$\tau = \tau_0; t = t_a = t_1(\tau); \delta = L; \quad (2')$$

$$\tau > \tau_0; X = \pm \delta; t = t_a(\tau); \quad (3')$$

$$X = \pm L; t = t_1(\tau).$$

Решение уравнения (15) следующее:

$$t_{\tau} = t_a + (t_1 - t_a) \frac{X - \delta}{L - \delta} + \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin \pi n \frac{X - \delta}{L - \delta} \times$$

$$\times \left[\int_0^{Fo} \left(\frac{\partial t_1}{\partial Fo_{\tau}} - \frac{\partial t_a}{\partial Fo_{\tau}} \right) e^{(\pi n)^2 Fo_{\tau}} dFo_{\tau} \right] e^{-(\pi n)^2 Fo_{\tau}} +$$

$$+ \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1 - (-1)^n}{n} \sin \pi n \frac{X - \delta}{L - \delta} \times e^{-(\pi n)^2 Fo_{\tau}} \left[\int_0^{Fo_{\tau}} \frac{\partial t_a}{\partial Fo_{\tau}} e^{(\pi n)^2 Fo_{\tau}} \times \right.$$

$$\times dFo_{\tau} \left. \right]; \quad (16)$$

$$Fo_{\tau} = \int_{\tau_0}^{\tau} \frac{a_{\tau}}{(L-\delta)^2} d\tau. \quad (16a)$$

Подставляя выражения (14) и (16) в условие (6), получаем интегродифференциальное характеристическое уравнение для определения функции $\delta(\tau_0)$

$$\begin{aligned} & \lambda_{\text{ж}} \left\{ -\frac{2}{\delta} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1-(-1)^n}{2} F_{\delta} \left[\int_0^{Fo_{\text{ж}}} \frac{\partial t_a}{\partial Fo_{\text{ж}}} F_{\delta}^{-1} e^{-\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo_{\text{ж}}} dFo_{\text{ж}} \right] \times \right. \\ & \times e^{\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo_{\text{ж}}} \left. \right\} - \lambda_{\tau} \left\{ \frac{t_1 - t_a}{L-\delta} + \frac{2}{L-\delta} \sum_{h=1}^{\infty} \left[(-1)^n \int_0^{Fo_{\tau}} \frac{\partial(t_1 - t_a)}{\partial Fo_{\tau}} e^{-(\pi n)^2 Fo_{\tau}} \times \right. \right. \\ & \times dFo_{\tau} - (1-(-1)^n) \int_0^{Fo_{\tau}} \frac{\partial t_a}{\partial Fo_{\tau}} e^{-(\pi n)^2 Fo_{\tau}} dFo_{\tau} \left. \right] e^{-(\pi n)^2 Fo_{\tau}} \left. \right\} = \\ & = \rho_{\tau} r \frac{d\delta}{d\tau} = \rho_{\tau} r \frac{d\delta}{dFo_{\text{ж}}} \frac{a_{\text{ж}}}{\delta^2}. \quad (17) \end{aligned}$$

Если фазовый переход происходит при постоянной температуре $t_a = t_{\phi} = \text{const}$, выражение (17) упрощается:

$$\begin{aligned} & \lambda_{\text{ж}} \left\{ -\frac{2}{\delta} \sum_{n=1}^{\infty} F_{\delta} \left[\int_0^{\tau_0} \frac{\partial t_1}{\partial \tau} e^{\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 \frac{a}{L^2} \tau} d\tau \right] e^{-\left(\frac{\pi n}{2}\right)^2 Fo_{\text{ж}}} \right\} - \\ & - \lambda_{\tau} \left\{ \frac{t_1 - t_{\phi}}{L-\delta} + \frac{2}{L-\delta} \sum_{n=1}^{\infty} \left[(-1)^n \int_{\tau_0}^{\tau_0 \tau} \frac{\partial t_1}{\partial Fo_{\tau}} e^{(\pi n)^2 Fo_{\tau}} dFo_{\tau} \right] \times \right. \\ & \times e^{-(\pi n)^2 Fo_{\tau}} \left. \right\} = \rho_{\tau} r \frac{d\delta}{d\tau}. \quad (17') \end{aligned}$$

Таким образом, получена система уравнений (14), (16), (17) или (17'), которые с учетом соотношений (1a), (14a) и (16a) описывают процесс охлаждения жидкого биопродукта в плоском контейнере при прямой при заданных $t_1(\tau)$ и обратной при заданном законе $\delta(\tau)$ постановке задачи. Несмотря на то, что в аналитическом виде указанная система не решается, ее численная реализация не представляет трудностей.

Из выражений (13) и (16) следует, что тепловой поток через стенку контейнера $q_{\text{к}}$ равен

$$q_{\text{к}} = \frac{2\lambda_{\text{ж}}}{L} \sum_{h=1}^{\infty} (-1)^n \left[\int_0^{Fo} \frac{\partial t_1}{\partial Fo} e^{\left(\pi \frac{2n-1}{2}\right)^2 Fo} dFo \right] e^{-\left[\frac{\pi}{2}(2n-1)\right]^2 Fo} \quad (18a)$$

до начала кристаллизации

$$q_{\text{к}} = \lambda_{\tau} \frac{t_a - t_1}{L-\delta} - \frac{2\lambda_{\tau}}{L-\delta} \sum_{h=1}^{\infty} \left[\int_0^{Fo} \frac{\partial t_1}{\partial Fo_{\tau}} e^{(\pi n)^2 Fo_{\tau}} dFo_{\tau} \right] e^{-(\pi n)^2 Fo_{\tau}} \quad (18б)$$

на этапе кристаллизации и охлаждения твердой фазы.

Зависимости (18а) и (18б) при заданном законе изменения $\delta(\tau)$ или температуры в центре контейнера целесообразно использовать в качестве одного из граничных условий при рассмотрении сопряженной задачи теплообмена в случае замораживания контейнера с биообъектом в камере криозамораживателя.

На основании изложенного метода произведен расчет процесса замораживания воды в контейнере с толщиной замораживаемого слоя

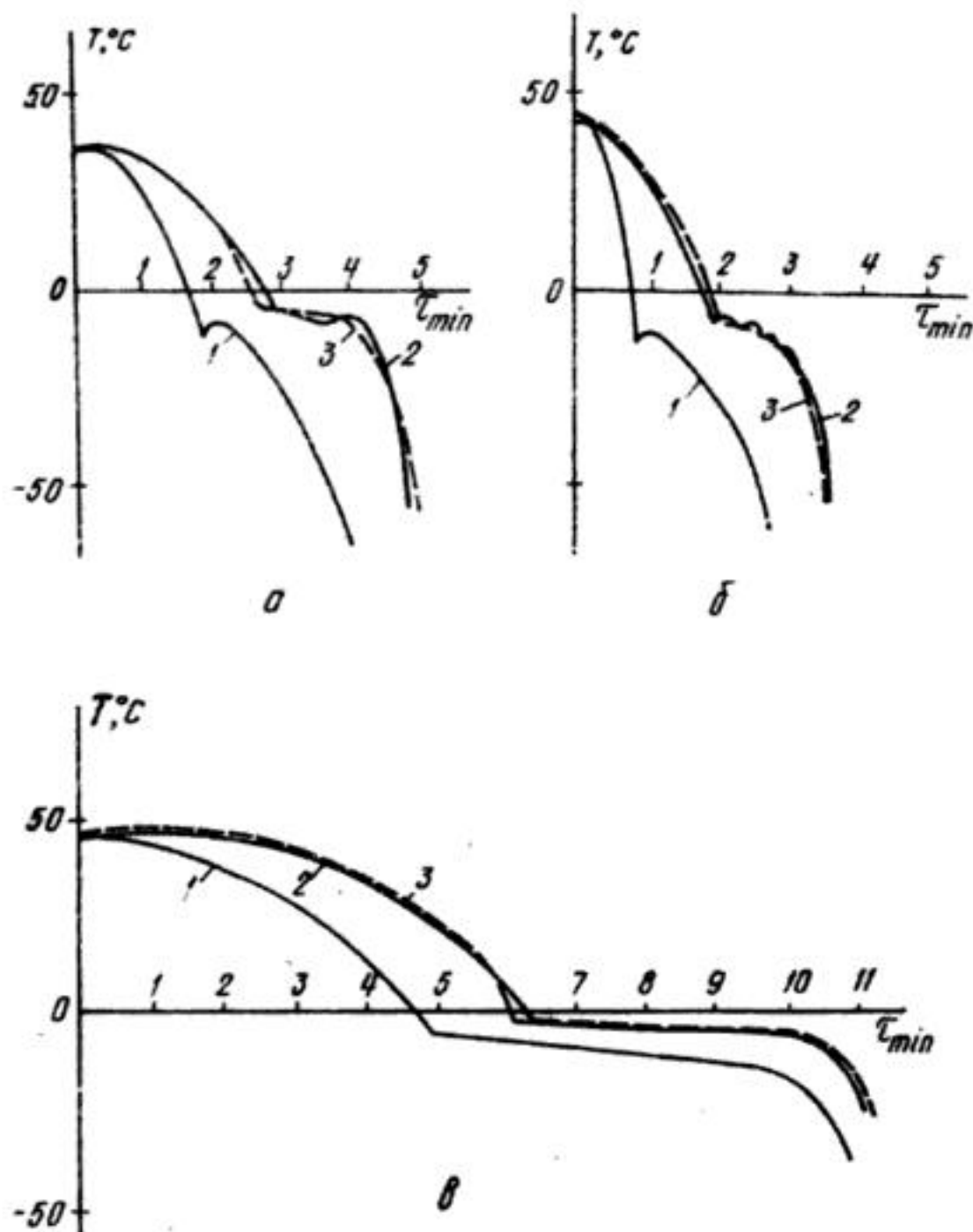


Рис. 2. Изменение во времени температур в центральной и периферийной областях контейнера при замораживании бидистиллированной воды для трех различных скоростей охлаждения:

- 1 — температура в периферийном слое (эксперимент);
- 2 — температура в центральном слое (эксперимент);
- 3 — температура в центральном слое (расчетные данные);
- а — средняя скорость охлаждения 25 град/мин;
- б — средняя скорость охлаждения 40 град/мин; в — средняя скорость охлаждения 5 град/мин.

тически по идентичным режимам, сдвинутым во времени. Это свидетельствует о существовании взаимосвязи между толщиной биообъекта, скоростью процесса и точностью воспроизведения режима замораживания, из чего следует необходимость и возможность подбора контейнера для каждой группы сходных режимов.

Принятые обозначения; $a_t, a_{ж}$ — коэффициенты температуропроводности твердой и жидкой фаз; $\lambda_t, \lambda_{ж}$ — коэффициенты теплопроводности твердой и жидкой фаз; $\rho_t, \rho_{ж}$ — плотности твердой и жидкой фаз; $t_t(X), t_{ж}(X)$ — распределение температур в твердой и жидкой фазах; τ — время; t_1, t_a, t_f — температуры соответственно на границе контейнера, на границе раздела фаз, фазового перехода; L, δ — полутолщины контейнера и слоя жидкой фазы; q_k — тепловой поток через стенку контейнера.

1. Бражников А. М. Аналитические методы исследования процессов термической обработки мясопродуктов. — М.: Пищ. пром-сть, 1974. — 354 с.

2. Вургафт И. А. Теплоотдача при плавлении льда в контакте с нагретой поверхностью. — Холодил. техника и технология, 1973, № 16, с. 44—49.
3. Гудмэн Т. Р. Интеграл теплового баланса: Дальнейшее рассмотрение и уточнение. — Теплопередача, 1961, № 1, с. 107—112.
4. Житомирский И. С., Подольский А. Г., Кагна А. А. Метод расчета температурного поля при замораживании биопродукта в тонком плоском контейнере. — В кн.: Механизмы криповреждений и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 26—30.
5. Иодко Э. А. Аналитические методы расчета температурных полей в телах простейшей формы с подвижными границами. — Инж.-физ. журн., 1964, 7, № 11, с. 94—97.
6. Карташов Э. М., Любов Б. Я. Аналитические методы решения краевых задач уравнения теплопроводности в области с движущимися границами. — Изв. АН СССР. Энергетика и транспорт, 1974, № 6, с. 83—117.
7. Лыков А. В. Теория теплопроводности. — М.: Высш. школа, 1967. — 600 с.
8. Рубинштейн Л. И. Проблема Стефана. — Рига: Звайгзне, 1967. — 312 с.
9. Федосеев В. Ф. Некоторые закономерности льдообразования на полубесконечном теле. — В кн.: Теплообменные процессы и аппараты химических производств. М., 1976, с. 48—53.
10. Чижов Г. Б. Теплофизические процессы в холодильной технологии пищевых продуктов. — М.: Пищ. пром-сть, 1979. — 271 с.
11. Чоу С, Сандерлэнд Д. Задачи теплопроводности с плавлением или застыванием. — Теплопередача, 1969, № 3, с. 144—150.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.09.79

СОДЕРЖАНИЕ

Теоретическая и экспериментальная криобиология

Моисеев В. А., Морозова Т. Ф., Масленникова Е. В. Спектрофотометрическое исследование структурных переходов миозина, подвергнутого замораживанию до температур кристаллизации	3
Моисеев В. А., Розанова Е. Д., Тарасенко Е. И. Влияние замораживания-оттаивания на функциональные характеристики цитохрома С и цитохромоксидазы	4
Луговой В. И., Золочевская Л. И. Активность НАД-зависимой малатдегидрогеназы после различных режимов замораживания-оттаивания митохондрий печени крыс	7
Белова Л. М., Лобынцева Г. С., Чуб Н. Н. Гистологические изменения в нервных ганглиях моллюсков под действием охлаждения до -9°C	9
Ткаченко С. И., Кошевой Н. Д., Черепнев В. А. К вопросу автоматизации выбора планов дробного факторного эксперимента	12
Лобынцева Г. С., Тимошенко Ю. П. Влияние скорости отогрева на выживаемость клеток крови	15
Пушкарь Н. С., Вишневский В. И., Гордиенко О. И. Влияние ультразвуковых колебаний на замораживание эритроцитов человека	19
Мартыненко А. А., Луговой В. И. Влияние ПЭО-1500 и низких температур на изотоническую резистентность эритроцитов человека	22
Скорняков Б. А., Вишневский В. И., Стусь Л. К., Обозная Э. И., Гордиенко О. И. Влияние постоянного магнитного поля на некоторые свойства эритроцитов при низкотемпературном консервировании	24
Попов Н. Н., Бражников А. М., Щербина Б. В., Карпычев С. В., Гарбуз В. И., Воскобойникова Т. Н., Дроздова О. А. Описание процесса микрофльтрации суспензии миелокариоцитов	30
Иткин Ю. А., Исерович П. Г., Кром И. Д. Исследование устойчивости плоской границы раздела фаз в ходе сублимационной сушки	32

Криоконсервирование биологических объектов

Лубяный В. Г., Бредихина Л. П., Шраго М. И. Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов	34
Новиков А. Н., Гордеева Т. Ф., Черкашина А. В. Влияние условий ввода криопротектора ПЭО-1500 на сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании	40
Петров М. М., Кушко О. В., Юхимук Л. Н. Криозащитные свойства оксипропилированного глицерина и влияние на них некоторых добавок экстра- и интрацеллюлярного действия	43
Гучок В. М., Зборовская Э. А. О токсичности α -пропиленгликоля	46
Гучок В. М. О токсичности глицерина и оксипропилированного глицерина с молекулярной массой 1412 для крыс и мышей в постнатальном онтогенезе	49

Криомедицина

Баранов А. Е., Мхеидзе Д. М., Селидовкин Г. Д., Шерешков С. И., Пяткин Е. К., Белянчикова Н. И. Восстановление миелопоэза аутологичными криоконсервированными лейкоцитами при бластном кризе хронического миелолейкоза	54
Морозов И. А., Кононов Ю. В., Вакуленко С. А. Трансфузии эритроцитов костномозговой взвеси, консервированных при плюсовых и ультранизких температурах	59
Морозов И. А., Кононов Ю. В., Зайцев В. П. Опыт рационализаторской работы в банке крови и костного мозга	60
Эпштейн В. Г., Точилова Р. В. Метод определения времени промерзания слизистой оболочки полости рта на заданную глубину	62
Юрченко С. Д., Катурова Г. Ф., Левченко Н. Д. Криотерапия гемангиом полости рта и приротовой области	64

<i>Сандожирский Б. П., Журихина Л. Ф., Исаев Ю. И.</i> Общая протеолитическая активность крови после температурных воздействий на кожу в эксперименте	66
<i>Криворотько В. Ф.</i> Клиническая оценка криохирургического метода лечения опухолей предстательной железы	69
<i>Бездетко П. А.</i> Экспериментальное исследование влияния полиэтиленоксида-1500 на внутриглазное давление	75
<i>Бабийчук Г. А., Панков Е. Я., Македонская В. А., Малышкина С. В., Зайченко Л. А.</i> Состояние структурных компонентов суставного хряща после криовоздействия в эксперименте	79

Криогенная техника

<i>Грошевой М. И., Руденко С. В., Ткаченко С. И., Уфимцев И. Г., Хайкин Р. К., Черепнев А. С.</i> Система управления многопрограммного замораживателя клеточных суспензий для станций переливания крови	81
<i>Криворотько В. Ф.</i> Криоурологическая аппаратура для лечения опухолей предстательной железы	89
<i>Печеный М. Л.</i> К вопросу о теплообмене при замораживании биологических объектов в контейнерах	93

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

Выпуск 8

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

Редакторы *Е. Т. Тальнова, А. Н. Шадрина*. Художественный редактор *И. Т. Лагутин*.
Технические редакторы *В. И. Самборук, В. А. Краснова*. Корректоры *Е. А. Дубарь, В. Н. Семенюк*.

Информ. бланк № 4006.

Сдано в набор 19.09.80. Подп. в печ. 12.03.81. БФ 01538. Формат 70×108/16. Бумага типогр. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. кр. л. 10,33. Усл. печ. л. 9,8. Уч. изд. л. 9,89. Тираж 1000 экз. Заказ 3743.
Цена 1 руб. 50 коп.

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

Областная книжная типография Львовского областного управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 290000. Львов, Стефаника, 11.

УДК 57.043:547.96:535.243

Спектрофотометрическое исследование структурных переходов миозина, подвергнутого замораживанию до температур кристаллизации / Моисеев В. А., Морозова Т. Ф., Масленникова Е. В. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 3—4.

Изучалось влияние процесса медленного охлаждения — кристаллизация — отогрев на структурное состояние мышечного фибриллярного белка миозина методами спектрофотометрии. Доказано, что кристаллизация растворов и последующее медленное оттаивание миозина приводит к изменению некоторых конформационных параметров белка.

Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:577.15

Влияние замораживания-оттаивания на функциональные характеристики цитохрома С и цитохромоксидазы / Моисеев В. А., Розанова Е. Д., Тарасенко Е. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 4—6.

Представлены результаты исследования по влиянию замораживания-оттаивания на функциональные характеристики фермента цитохромоксидазы и белка — цитохрома С. Показано изменение константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции окисления восстановленного цитохрома С при различных режимах замораживания (соответственно 1,15 и 100°/мин) протеннов. При замораживании цитохромоксидазы со скоростью 1°/мин изменений кинетических параметров не наблюдалось. Результаты исследования подтверждают ранее высказанное предположение о зависимости степени низкотемпературного повреждения белков от скорости охлаждения.

Табл. 3. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043:577.37.1

Активность НАД-зависимой малатдегидрогеназы после различных режимов замораживания-оттаивания митохондрий печени крыс / Луговой В. И., Золочевская Л. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 7—8.

Исследовалась активность НАД-зависимой малатдегидрогеназы после различных режимов замораживания-оттаивания митохондрий печени крыс (быстрого замораживания — быстрого оттаивания, быстрого замораживания — медленного оттаивания и медленного замораживания — быстрого оттаивания). Обнаружено, что все исследованные режимы замораживания-оттаивания митохондрий вызывали достоверное повышение активности НАД-МДГ. Установлено, что медленное замораживание митохондрий оказывало более выраженное влияние на изменение активности фермента по сравнению с быстрым режимом замораживания.

Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043

Гистологические изменения в нервных ганглиях моллюсков под действием охлаждения до —9°С / Белова Л. М., Лобынцева Г. С., Чуб Н. Н. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 9—12.

Изучено влияние охлаждения до умеренных температур на нервные клетки моллюска *Eobania verticulata*. Показано, что охлаждение животных до —9°С после предварительной выдержки при +2,5°С вызывает меньшие деструктивные изменения в нервных клетках, чем быстрое охлаждение от +25 до —9°С.

Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.62—506.72

К вопросу автоматизации выбора планов дробного факторного эксперимента / Ткаченко С. И., Кошевой Н. Д., Черепнев В. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 12—15.

Разработан ряд утверждений, положенных в основу алгоритма выбора оптимального плана дробного факторного эксперимента. Созданы алгоритмы и программы, реализующие процесс автоматического выбора на основе априорной информации плана дробного эксперимента, устраивающего исследователя, и синтеза его на ЭВМ. Применение разработанных программ позволит не привлекать для проведения экспериментов операторов с высокой степенью квалификации.

Ил. 1. Библиогр.: 3 назв.

УДК 57.043

Влияние скорости отогрева на выживаемость клеток крови / Лобынцева Г. С., Тимошенко Ю. П. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 15—18.

Приведены данные о влиянии скоростей нагрева на выживаемость клеток крови, замороженных с различной концентрацией криопротектора. Установлено, что для лейкоцитов, замороженных медленно с 10%-ным ПЭО-400, наибольшие повреждения наблюдаются в интервале температур от -40 до 0°C . Эритроциты, замороженные погружением в азот с 10%-ным ПЭО-1500, разрушались при отогреве с малой скоростью при температурах от -80 до -60°C и от -40 до 0°C . При увеличении концентрации криопротектора до 20% повреждения возникали только в интервале температур от -40 до 0°C .

Ил. 1. Библиогр.: 21 назв.

УДК 57.043:534—8:612.1:082

Влияние ультразвуковых колебаний на замораживание эритроцитов человека / Пушкарь Н. С., Вишневский В. И., Гордиенко О. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 19—21.

Изучали влияние ультразвуковой обработки эритроцитов в период экспозиции с криопротектором на исход последующего низкотемпературного консервирования. Показано положительное влияние ультразвуковых волн с частотой 880 кГц. Получены зависимости степени повреждения деконсервированных эритроцитов от интенсивности ультразвука.

Ил. 2. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043.577:576

Влияние ПЭО-1500 и низких температур на изоосмотическую резистентность эритроцитов человека / Мартыненко А. А., Луговой В. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 22—24.

Приводятся экспериментальные данные о структурной устойчивости криоконсервированных в 20%-ном растворе ПЭО-1500 эритроцитов после деконсервации и экспозиции клеток в изоосмотических солевых и несолевых растворах. Рассматриваются биохимические показатели дестабилизирующего действия полимерных полиэтиленоксидов на плазматические мембраны.

Табл. 1. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043.621.3.029

Влияние постоянного магнитного поля на некоторые свойства эритроцитов при низкотемпературном консервировании / Скорняков Б. А., Вишневский В. И., Стусь Л. К., Обозная Э. И., Гордиенко О. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 24—30.

Изучалось влияние постоянного магнитного поля (ПМП) на всех этапах подготовки к низкотемпературному консервированию, а также в процессе консервирования эритроцитов.

Показано, что действие ПМП напряженностью (Н) 2000 э в течение 15—90 мин достоверно проявляется главным образом на внутриклеточном уровне, что выражается, в частности, в улучшении сохранности реакционно-способных SH-групп эритроцитов при глубоком охлаждении. При этом макроскопические характеристики эритроцитов, такие как целостность клеток, их осмотическая резистентность и внеклеточная концентрация ионов K^+ могут претерпевать достоверные изменения, как положительные, так и отрицательные.

Ил. 5. Табл. 1. Библиогр.: 25 назв.

УДК 57.043:576.3.08

Описание процесса микрофльтрации суспензии миелокариоцитов / Попов Н. Н., Бражников А. М., Щербина Б. В., Карпычев С. В., Гарбуз В. И., Воскобойникова Т. Н., Дроздова О. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 30—31.

С учетом ряда допущений описывается начальная стадия процесса микрофльтрации. Приводятся экспериментальные данные зависимости общего объема суспензии, прошедшей через фильтр, от времени фильтрации, которые соответствуют предлагаемой формуле.

Ил. 1.

УДК 57.043.536.2

Исследование устойчивости плоской границы раздела фаз в ходе сублимационной сушки / Иткин Ю. А., Исерович П. Г., Кром И. Д. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 32—34.

Для управления процессом сублимационной сушки необходимо знать динамику развития границы раздела фаз лед — пар. Полученные данные свидетельствуют, что плоская граница раздела неустойчива по отношению к бесконечно малому синусоидальному возмущению при скорости сублимации порядка $V \sim 10^{-3}$ см/с. Иначе говоря, случайно возникшие углубления будут развиваться, фронт будет разрыхляться и образуется зона сублимации. Следовательно, увеличивается поверхность сублимации и возрастает перепад температур между разными точками образца. Этот факт необходимо принимать во внимание при разработке программ сублимационной сушки и при выборе метода управления процессом.

Ил. 1. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043:541.64:612.111

Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов / Лубяный В. Г., Бредихина Л. П., Шраго М. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 34—40.

Представлены результаты отбора активных криопротекторов из гомологического ряда продуктов оксигилирования трехатомного спирта глицерина (ОЭГ). Установлено, что наиболее выраженным криозащитным действием в отношении эритроцитов обладают ОЭГ со степенью замещения $n=20-30$ в концентрации 20—40%. Добавление к криозащитным растворам ОЭГ изотонической концентрации хлористого натрия улучшает сохранность деконсервированных клеток.

Табл. 5. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043:(612.111:615.014.41)

Влияние условий ввода криопротектора ПЭО-1500 на сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании / Новиков А. Н., Гордеева Т. Ф., Черкашина А. В. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 40—42.

Изложены результаты экспериментального изучения влияния условий ввода криопротекторов ПЭО-1500 (скорость ввода раствора криопротектора, интенсивность перемешивания, температура) в суспензию эритроцитов на их сохранность после размораживания. В постановке эксперимента и при обработке полученных данных применен метод многофакторного эксперимента. Установлено наличие значительного отрицательного влияния повышения скорости ввода криопротектора ПЭО-1500 на сохранность эритроцитов. Повышение температуры в пределах 0—20°C, особенно при больших скоростях ввода, снижает отрицательные последствия ввода криопротектора.

Ил. 1. Табл. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043

Криозащитные свойства оксигилированного глицерина и влияние на них некоторых добавок экстра- и интрацеллюлярного действия / Петров М. М., Кушко О. В., Юхимук Л. Н. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 43—46.

Целью данного исследования было изыскание на основе использования ОЭГ (синтезированного в Харьковском институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР) ограждающего раствора для эритроцитов, не требующего отмывания. Определена оптимальная концентрация ОЭГ в криозащитном растворе, изучено влияние на криозащитные свойства растворов ОЭГ включение в них маннита, ПВП, глюкозы и лактозы. Установлено, что лучшими криопротекторными свойствами обладают 20 и 30% растворы ОЭГ в сочетании с маннитом, добавленным в 2,5—7% концентрации (концентрация исходная). Указанные растворы по ограждающей эффективности значительно превосходят принятые в службе крови нашей страны криоконсерванты ЦОЛИПК-114 и № 1-ПВП и приближаются к разрабатываемому криопротектору, не требующему отмывания.

Табл. 2. Библиогр.: 13 назв.

УДК 57.043:615.9

О токсичности α -пропиленгликоля / Гучок В. М., Зборовская Э. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 46—49.

В острых опытах на половозрелых беспородных мышах и крысах обоего пола установлено, что ДЛ-50 α -пропиленгликоля отечественного изготовления для мышей при подкожном введении составила 17,37 (12,83÷21,91) г/кг, при введении через рот — 20,3 (17,9÷22,7) г/кг и для крыс при внутривенном введении — 13,1 (11,56÷14,64) г/кг массы. В хроническом эксперименте на крысах показано, что введение α -пропиленгликоля в течение 3 мес. через рот в дозе 3,28 г/кг массы не нарушает общего состояния и динамики веса животных, состава периферической крови, сердечно-сосудистой деятельности, функции почек и не изменяет микроскопической структуры внутренних органов животных.

Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.615.9

О токсичности глицерина и оксиэтилированного глицерина с молекулярной массой 1412 для крыс и мышей в постнатальном онтогенезе / Гучок В. М. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 49—53.

Установлено, что белые крысы и мыши в раннем постнатальном онтогенезе по сравнению со взрослыми животными в 2,58—1,31 раза более резистентны к глицерину и в 2,84—1,56 раза — к оксиэтилированному глицерину.

Степень и направленность изменений токсичности веществ существенно различаются между собой и зависят от их химической структуры и этапов постнатального развития животных. Токсичность глицерина для крыс и мышей с возрастом постепенно повышается и задолго до развития половозрелости достигает уровня взрослых животных. Динамика токсичности оксиэтилированного глицерина отличается большей длительностью повышенной резистентности животных, неравномерностью и разнонаправленностью изменений.

Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043

Восстановление миелопоза аутологичными криоконсервированными лейкоцитами при бластном кризе хронического миелолейкоза / Баранов А. Е., Мхеидзе Д. М., Селидовкин Г. Д., Шерешков С. И., Пяткин Е. К., Белянчикова Н. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 54—58.

Больной с бластным кризом хронического миелолейкоза проведена ауотрансплантация криоконсервированных лейкоцитов. Лейкомасса хранилась в течение трех лет при температуре —196°C (криопротектор 10%-ный ДМСО). Динамика лейкоцитарных кривых доказывает восстановление гемопоэза из стволовых клеток или клеток — предшественников гемопоэза.

Ил. 2. Библиогр.: 22 назв.

УДК 57.043:615.387.014.41

Трансфузии эритроцитов костномозговой взвеси, консервированных при плюсовых и ультранизких температурах / Морозов И. А., Кононов Ю. В., Вакуленко С. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 59—60.

Представлены результаты трансфузий эритроцитов донорской костномозговой взвеси, консервированных при плюсовых и ультранизких температурах, 100 гематологическим больным. Показана их биологическая полноценность и терапевтический эффект при лечении анемий различной патологии. Рекомендуются применять эритроциты костномозговой взвеси по тем же показаниям, что и эритроциты крови.

Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043:615.387.014.41

Опыт рационализаторской работы в банке крови и костного мозга / Морозов И. А., Кононов Ю. В., Зайцев В. П. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 60—61.

Представлен опыт организации рационализаторской работы в банке крови и костного мозга. Комплекс мероприятий по увеличению заготовки костного мозга и крови, а также механизация трудоемких процессов позволили значительно перевыполнить плановые задания по низкотемпературному консервированию биологических объектов и обеспечить лечебные учреждения области достаточным количеством гемотканей.

УДК 617—089:615.832.97/8

Метод определения времени промерзания слизистой оболочки полости рта на заданную глубину / Эпштейн В. Г., Точиловская Р. В. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 62—63.

Предложен метод определения важной теплофизической характеристики замораживаемой слизистой оболочки полости рта — времени промерзания на заданную глубину. Время промерзания устанавливали по резкому изменению электропроводности замерзающей ткани. Метод может применяться при криодеструкции тканей на малую глубину (1—3 мм), когда измерение температуры не может быть проведено корректно.

Ил. 1. Библиогр.: 1 назв.

УДК 616.314.18—002—071—092.4

Криотерапия гемангиом полости рта и приротовой области / Юрченко С. Д., Катурова Г. Ф., Левченко Н. Д. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 64—65.

У 50 больных с сосудистыми новообразованиями полости рта и приротовой области проведено лечение локальным криовоздействием капиллярной парожидкостной струи азота. У 35 больных результаты проследжены в течение одного года. У 24 из них — полный терапевтический эффект, у 10 — значительное улучшение, у одного больного лечение оказалось малоэффективным. Криовоздействие больные переносят легко, заживление происходит без образования рубца.

Библиогр.: 11 назв.

УДК 612.1:616.5—001.17:615.832.9

Общая протеолитическая активность крови после температурных воздействий на кожу в эксперименте / Сандомирский Б. П., Журихина Л. Ф., Исаев Ю. И. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 66—68.

В экспериментах на крысах Вистар изучена динамика общей протеолитической активности крови после ожога, криовоздействия и их сочетания. Результаты исследования показали сходный характер изменения протеолитической активности при тепловом и холодном воздействиях и качественное различие при их сочетании, что можно объяснить изменением сосудисто-тканевой циркуляции под влиянием охлаждения ожоговой поверхности.

Табл. 1. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043:616.65—006.832.9—089

Клиническая оценка криохирургического метода лечения опухолей предстательной железы / Криворотько В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 69—75.

Излагаются результаты динамического клинического наблюдения за ранним послеоперационным периодом и периодом ранней и поздней секвестрации участков опухоли у 19 больных. Установлено, что использование криокатетеров низкой холодопроизводительности у 9 больных вызывают осложнения типа флеботромбоза и тромбоэмболии после криодеструкции. Криовоздействие на опухоли предстательной железы у 10 больных с помощью устройства Линде SE-4 и стандартным криокатетером PR-4, характеризовалось отсутствием развития флеботромбозов, хотя процесс отторжения происходил довольно медленно и сопровождался гнойно-септическими осложнениями местного характера.

Табл. 1. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:617.7:547.422.426.1

Экспериментальное исследование влияния полиэтиленоксида-1500 на внутриглазное давление / Бездетко П. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 75—79.

Изучено влияние полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 на внутриглазное давление в эксперименте. Установлено, что полиэтиленоксид аналогично глицерину, мочеvine, манниту резко снижает внутриглазное давление. При внутривенном введении 20%-ного раствора в дозе 1,0—2,0 г/кг массы животного внутриглазное давление снижается уже через 30 мин и к 5-му ч отмечается тенденция к возвращению к исходному уровню. При пероральном введении 50%-ного раствора в дозе 1,5—2,0 г/кг офтальмотонус снижается до максимума через 90 мин и его действие длится более 5 ч. На основании полученных данных автор высказывает мнение о возможности применения полиэтиленоксида-1500 в клинической офтальмологии в качестве дегидранта.

Ил. 2. Табл. 4. Библиогр.: 31 назв.

УДК 57.043.616.728.2—832.9

Состояние структурных компонентов суставного хряща после криовоздействия в эксперименте / Бабичук Г. А., Панков Е. Я., Македонская В. А., Малышкина С. В., Зайченко Л. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 79—81.

В экспериментах на крысах Вистар изучено изменение суставного хряща головки бедренной кости после криовоздействия. Отмечено, что на протяжении сроков наблюдения суставной хрящ после воздействия холодом не отторгался, а в краевых отделах обнаружилось прорастание хрящевого вещества фибробластами.

Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043.615.47:615.832.9

Система управления многопрограммного замораживателя клеточных суспензий для станций переливания крови / Грошевой М. И., Руденко С. В., Ткаченко С. И., Уфимцев И. Г., Хайкин Р. К., Черепнев А. С. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 81—89.

Рассмотрена система автоматического управления выполнением двухэтапных линейных программ замораживания биоматериала с регулируемой длительностью процесса кристаллизации. Обосновываются требования к замораживателю и способ формирования сигнала управления, описывается функциональная схема системы и дается сравнительная оценка ее достоинств. Приводятся данные экспериментальных исследований, характеризующие качество выполнения программ замораживания и сохранность деконсервированной лейкомассы.

Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043

Криоурологическая аппаратура для лечения опухолей предстательной железы / Криворотко В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 89—92.

Изложены данные о принципиальном устройстве криогенной системы для криовоздействия на опухоли предстательной железы. Система состоит из резервуара хладагента и магистрали подачи хладагентов в криокатетер.

Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 3 назв.

УДК 57.043:536.421.4

К вопросу о теплообмене при замораживании биологических объектов в контейнерах / Печеный М. Л. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 93—99.

Изложена методика расчета процесса охлаждения жидкого биообъекта в плоском контейнере на основании аналитического решения одномерной нелинейной нестационарной задачи теплопроводности. Приведены результаты сравнения расчета по изложенной методике с экспериментальными данными по замораживанию бидистиллированной воды в плоском контейнере с толщиной замораживаемого слоя 8 мл.

Ил. 2. Библиогр.: 11 назв.

UDC 57.043:547.96:535.243

Spectrophotometric Investigation of Structural Transitions of Myosin Subjected to Freezing up to Crystallization Temperatures. Moiseev V. A., Morozova T. F., Maslennikova E. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 8, p. 3—4.

Spectrophotometric methods were employed to study the structural state of fibrillar muscle protein, myosin, affected by slow cooling-crystallization-defrosting. Myosin solution crystallization followed by a slow thawing results in variation of certain conformational protein parameters.

Refs: 5 titles.

UDC 57.043:577.15

Effect of Freezing and Thawing on Functional Characteristics of Cytochrome C and Cytochrome Oxidase. Moiseev V. A., Rozanova E. D., Tarasenko E. I. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 8, p. 4—6.

The paper presents the results of studies on freezing and thawing effect on functional characteristics of the enzyme-cytochrome oxidase (CCO) and the protein-cytochrome C (CCC). Changes in Michaelis' constant and in the maximum reaction rate of the reduced CCC oxidation are shown for various conditions of protein freezing (1°/min, 15°/min, 100°/min). No changes were observed in the kinetic parameter during the CCO freezing at a rate of 1°/min. The results obtained confirm the assumption of the dependence of the degree of low-temperature protein destruction on cooling rate.

3 tables. Refs: 8 titles.

UDC 57.043:577.37.1

NAD-Dependent Malate Dehydrogenase Activity after Different Schedules of Freezing and Thawing of Rat Liver Mitochondria. Lugovoy V. I., Zolochetskaya L. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 7—8.

The paper deals with studies on the activity of NAD-dependent malate dehydrogenase after different schedules of freezing and thawing of rat liver mitochondria (fast freezing and fast thawing). All the mitochondria freezing-thawing schedules studied are found to cause a significant rise in NAD-MDH activity. Slow mitochondria freezing is stated to have a more pronounced effect on the enzyme activity change, as compared with the fast freezing schedule.

1 table. Refs: 8 titles.

UDC 57.043

Histological Changes in Mollusk Nervous Ganglia Under Cooling Down to -9°C . Belova L. M., Lobyntseva G. S., Chub N. N. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 9—12.

The effect of cooling down to moderate temperatures on nervous cells is studied for *Eobania verticulata*. Cooling of the animals to -9°C after a preliminary exposure to $+2.5^{\circ}\text{C}$ is shown to cause less destructive changes in nervous cells than fast cooling from $+25$ to -9°C .

Refs: 8 titles.

UDC 57.043.62 506.72

On the Problem of Automatic Choice of Fractional Factor Experiment Plans. Tkachenko S. I., Koshevoy N. D., Cherepnev V. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 12—15.

A number of assertions assumed as an algorithm basis are elaborated for automatic choice of optimum plan of a fractional factor experiment. Algorithms and programmes are compiled to realize the process of automatic choice of the fractional experiment plan convenient for the researcher on the basis of apriori information and its computer-aided synthesis. The application of the developed programmes will allow experiments to be conducted without resorting to highly qualified operators.

1 fig. Refs: 3 titles.

UDC 57.043

Effect of Defrosting Rate on Blood Cell Survival. Lobyntseva G. S., Timoshenko Yu. P. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 15—18.

The paper presents data on heating rate effect on survival of blood cells frozen at various cryoprotectant concentrations. The greatest damage is observed in a $-40-0^{\circ}\text{C}$ temperature range for leukocytes frozen slowly with 10% PEO-400. Erythrocytes frozen by plunging into nitrogen with 10% PEO-1500 were destroyed while slow-rate defrosting with temperature ranges of $-80-60^{\circ}\text{C}$ and $-40-0^{\circ}\text{C}$. When the cryoprotectant concentration was increased to 20%, the blood cells were damaged only in the $-40-0^{\circ}\text{C}$ range.

2 figs. Refs: 21 titles.

UDC 57:536.48.047:534—8:612.1:082

Effect of Ultrasonic Vibrations on Human Erythrocyte Freezing. Pushkar N. S., Vishnevsky V. I., Gordienko O. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 19—21.

The result of subsequent low-temperature preservation was studied as affected by ultrasonic erythrocyte treatment in the period of exposure with the cryoprotectant. The supersonic 880 kHz wave effect is shown to be positive. Destruction rate versus supersonic intensity dependences are obtained for deconserved erythrocytes.

2 figs. Refs: 14 titles.

UDC 57.043.577:576

PEO-1500 and Low-Temperature Effect on Isoosmotic Human Erythrocyte Resistance. Martynenko A. A., Lugovoy V. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 22—24.

Experimental data on structural stability after the cell deconservation and exposure in isoosmotic saline and nonsaline solutions are presented for erythrocytes cryopreserved in the 20% PEO-1500 solution. Biochemical parameters are considered with regard for the polymer polyethylene oxides destabilizing action on plasma membranes.

1 table. Refs: 10 titles.

UDC 57.043621.3029

Effect of Constant Magnetic Field on Certain Erythrocyte Properties Under Low-Temperature Preservation. Skornyakov B. A., Vishnevsky V. I., Stus L. K., Oboznaya E. I., Gordienko O. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 24—30.

The paper deals with the effect of constant magnetic field (CMF) at all stages of preparation to the low-temperature preservation of erythrocytes and in the process of their preservation as well. The H-2000 Oe CMF action for 15-90 min is shown to be significant chiefly at the intracellular level, which is manifested in improved preservation of reactive SH-groups of erythrocytes under copious cooling. Such macroscopic characteristics of erythrocytes as cell integrity, cell osmotic resistance and extracellular concentration of ions K^+ can undergo significant alterations for the better or for the worse.

1 fig. 1 table. Refs: 25 titles.

UDC 57.043:576.3.08

Description of the Process of Myelocaryocyte Suspension Microfiltration. Popov N. N., Brazhnikov A. M., Shcherbina B. V., Karpychev S. V., Garbuz V. I., Voskoboinikova T. N., Drozdova O. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 30—31.

Based on some assumptions, a dependence is presented for the cell suspension expenditure through the filter. The experimental data are in qualitative agreement with the cell suspension expenditure dependence. Reasons are indicated for bone marrow cell traumatism under microfiltration.

1 fig.

UDC 536.2.

Studies in Plane Interface Stability in the Process of Sublimation drying. Itkin Yu. A., Iselovich P. G., Krom I. D. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 32—34.

To control the sublimation drying process it is necessary to know the dynamics of the ice-vapour interface development. The plane interface is shown to be unstable to an infinitely small sinusoidal perturbation at a sublimation rate of $V \approx 10^{-3}$ cm/s order. In other words, randomly appeared hollows will be developing, the front will be loosened and a sublimation zone will be formed. Consequently, the sublimation surface increases and the temperature drop between different points of the sample grows. This fact should be taken into account while developing sublimation drying programmes and choosing the process control method.

1 fig. Refs: 6 titles.

UDC 57.043:541.64:612.111

The Cryoprotectant Activity of GOE Oligomers in Low-Temperature Erythrocyte Preservation. Lubyany V. G., Bredikhina L. P., Shrago M. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 34—40.

The paper presents the results of active cryoprotectant selection from the homologous series of triatomic glycerol alcohol oxyethylation products (GOE). The 20-40% GOE with $n=20-30$ substitution degree is stated to possess the most pronounced cryoprotective action relative to erythrocytes. Addition of sodium chloride in isotonic concentration to cryoprotective GOE solutions improves the preservation of deconserved cells.

5 tables. Refs: 10 titles.

UDC 57.043:(612.111:615.014.41)

The Influence of Cryoprotectant PEO-1500 Introduction Conditions on Erythrocyte Preservation in Low-Temperature Preservation. Novikov A. N., Gordeeva T. F., Cherkashina A. V. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 40—42.

Data are presented on experimental studies in the defrosted erythrocyte preservation affected by conditions of the cryoprotectant PEO-1500 introduction into the erythrocyte suspension (cryoprotectant solution introduction rate, mixing intensity, temperature).

The multifactor experiment method is applied to experimentation and data processing. A rise in the PEO-1500 cryoprotectant introduction rate is established to have a significant negative effect on the preservation of erythrocytes.

Temperature rise in a 0-20°C range, at high introduction rates particularly, decreases the negative aftereffects of the cryoprotectant introduction.

1 fig. 2 tables. Refs: 6 titles.

UDC 57.043

Cryoprotective Properties of Oxyethylated Glycerol and Effect on Them of Certain Additives of Extra- and Intracellular Action. Petrov M. M., Fushko O. V., Yakymchuk L. N. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 43—46.

The objective of the present research was to find a protective solution for erythrocytes requiring no washing by employing GOE (synthesized in the Kharkov Institute of Problems in Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian SSR Academy of Sciences). The optimum GOE concentration in the cryoprotective solution is determined. Studies are made in the effect of mannitol, PVP, glucose and lactose addition on the cryoprotective properties of the GOE solutions. The best cryoprotective properties are found in the 20 and 30% GOE solutions in combination with mannitol of 2.5-7% concentration (initial concentration). Judging by their protective efficiency, the solutions in question appreciably exceed the cryoconservants TSOLIPK-11₄ and NI-PVP employed by the country's blood service and are close to the cryoprotectant under development which requires no washing.

2 tables. Refs: 13 titles.

UDC 57.043:615.9

On α -Propylene Glycol Toxicity. Guchok V. M., Zborovskaya E. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 46—49.

Acute experiments with puberal mongrel mice and rats of both sexes made it possible to state that LD₅₀ of home-made α -propylene glycol for mice is 17.37 (12.83÷21.91) g/kg for subcutaneous injection, 20.3 (17.9÷22.7) g/kg for peroral administration and for rats it is 13.1 (11.56÷14.64) g/kg of mass for intravenous injection. The chronic experiment with rats shows that α -propylene glycol administered per os for three months in a dose of 3.28 g/kg of mass does not disturb the general condition and dynamics of the animal weight, the composition of peripheral blood, cardiovascular activity, the kidney function and does not change the microscopic structure of the animal viscera.

2 tables. Refs: 8 titles.

UDC 57.043.615.9

On Toxicity of Glycerol and Oxyethylated Glycerol with 1412 Molecular Weight to Rats and Mice in Postnatal Ontogenesis. Guchok V. M. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 49—53.

The resistance of albino rats and mice in early postnatal ontogenesis depending on the age is stated to be 2.58-1.31 times as high to glycerol and 2.84-1.56 times as high to oxyethylated glycerol than that of adult animals.

The degree and direction of changes in the substance toxicity are essentially different and determined by the substance chemical structure and stages of postnatal development of animals. Glycerol toxicity for rats and mice grows gradually with their age and reaches the adult animal level long before their puberty. The oxyethylated glycerol toxicity dynamics is featured by a longer period of higher resistance of the animals, by nonuniformity and different directions of changes.

2 figs, 2 tables. Refs: 11 titles.

UDC 57.043

Restoration of Myelopoiesis by Autologous Cryopreserved Leukocytes Under Blast Crisis of Chronic Myeloleukemia. Baranov A. E., Mkhedze D. M., Selidovkin G. D., Shereshkov S. I., Pyatkin E. K., Belyanchikova N. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 54—58.

A female patient with blast crisis of chronic myeloleukemia was subjected to auto transplantation of cryopreserved leukocytes. The leukomass was kept at -196°C for three years (10% DMSO cryoprotectant). The dynamics of leukocytic curves proves the restoration of hemopoiesis from stem cells or hemopoiesis precursors cells.

2 figs. Refs: 22 titles.

UDC 57.043

Transfusion of Bone Marrow Suspension Erythrocytes Preserved at Positive and Ultralow Temperatures. Morozov I. A., Kononov Yu. V., Vakulenko S. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 59—60.

Donor marrow suspension erythrocytes preserved at positive and ultralow temperatures were transfused to 100 hematologous patients. The results obtained show their full biological value and therapeutic effect in treating anemia of various etiology.

Bone marrow suspension erythrocytes are recommended for application in the same cases as blood erythrocytes.

Refs: 4 titles.

UDC 57.043

An experience of Improved Preservation of Blood and Bone Marrow in the Bank. Morozov I. A., Kononov Yu. V., Zaitsev V. P. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 60—61.

The authors share their experience in organizing an improved preservation of blood and bone marrow in the bank. A number of measures aimed at increasing the bone marrow and blood store, as well as mechanization of labour-consuming processes permitted the planned task in low-temperature preservation of the biological systems to be considerably overfulfilled and medical institutions to be provided with a sufficient amount of homotissues.

UDC 617—089:615.832.97/.98

A Procedure for Determining Time of Mouth Mucosa Freezing to a Desired Depth. Epshteis V. G., Tochilovskaya R. V. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, iss. 8, p. 62—63.

A new procedure is suggested for determining a significant thermophysical parameter of the mouth mucosa subjected to freezing — time of its freezing to a desired depth. Freezing time is determined by a sharp change in electric conductivity of the tissue getting frozen. The procedure may be applied to tissue cryodestruction to a small depth (1-3 mm) when the temperature cannot be measured correctly.

1 fig. Refs: 1 title.

UDC 616.314.18—002—071—092.4

Cryotherapy of Hemangiomas in Oral Cavity and Perioral Area. Yurchenko S. D., Katurova G. F., Levchenko N. D. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 64—65.

50 patients with vascular neoplasms in the oral cavity and perioral area were treated by local cryoeffect of capillary vapour-liquid nitrogen jet. 35 patients were under examination for one year. In 24 of them a full therapeutic effect was observed, in 10 — a considerable improvement, and for one patient the treatment turned low-efficient. As for the cryoeffect, patients endure it quite easily, no catrux is formed while healing.

Refs: 11 titles.

UDS 612.1:616.5—001.17:615.832.9

Total Proteolytic Blood Activity After Temperature Influence on Skin in the Experiment. Sandomirsky B. P., Zhurikhina L. F., Isaev Yu. I. — *Kriobiologia i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 66—68.

The Wistar rats were experimented to study the dynamics of the total proteolytic blood activity after burn, cryoeffect and their combination.

The results showed a similar character of changes in the proteolytic activity under thermal and cooling effects and a qualitative distinction in their combination, which may be accounted for by changes in tissue-vascular circulation affected by the burn surface cooling.

1 table. Refs: 11 titles.

UDC 57.043

Clinical Estimate of Cryosurgical Method for Treating Prostate Tumours. Krivorotko V. F. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 69—75.

Here are the results of dynamic clinical observation of the early postoperational period and that of early and late sequestration of tumoural sites in 19 patients. The utilization of low-efficient cryocatheters is stated to induce in 9 patients complications of phlebothrombosis and thrombembolism type after cryodestruction.

The cryoeffect on prostate tumours in 10 patients produced by the Linde CE-4 device and standard PR-4 cryocatheter did not cause the development of phlebothrombosis although the rejection process proceeded rather slowly and was accompanied by pyo-septic complications of local character.

1 table. Refs: 9 titles.

UDC 57:536.48.047:615

Experimental Studies in the Effect of Polyethylene Oxide-1500 on Intraocular Pressure. Bezdetko P. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 8, p. 75—79.

An experimental study is made in the effect of polyethylene oxide with molecular mass equal to 1500 on the intraocular pressure. Polyethylene oxide, like glycerol, urea, mannitol, is stated to sharply reduce the intraocular pressure. The intravenous injection of a 20% PEO solution dosed 1.0-2.0 g/kg of animal weight reduces the intraocular pressure right 30 min after and nearly 5 hours later it tends to recover its initial value. The peroral injection of a 50% solution dosed 1.5-2.0 g/kg reduces ophtalmotension to maximum 90 min after, and its effect lasts over 5 hours. Basing on the data obtained the author considers it possible to employ polyethylene oxide-1500 as a dehydrant in clinical ophthalmology.

2 figs. 4 tables. Refs: 31 titles.

UDC 57.043.616.728.2—832.9

The State of Structural Components of Articular Cartilage After Cryoeffect in the Experiment. Babiychuk G. A., Pankov E. Ya., Makedonskaya V. A., Malyshkina S. V., Zaichenko L. A. « Kriobiologiya i kriomeditcina, 1981, iss. 8, p. 79—81.

Wistar-line rats were experimentally studied for changes in the articular cartilage of the femur head after cryoeffect.

The articular cartilage during the observation is marked not to be rejected after cryoeffect, but the cartilaginous substance is noticed to be germinated by fibroblasts in marginal sites.

Refs: 6 titles.

UDC 615.47:615.832.9

Control System of Multiprogrammed Freezer of Cellular Suspensions for Blood Transfusion Stations. Groshevoy M. I., Rudenko S. V., Tkachenko S. I., Ufimtsev I. G., Khaikin R. K., Cherepnev A. S. — Kriobiologiya i kriomeditcina, 1981, iss. 8, p. 81—89.

The paper is concerned with an automatic control system for the fulfilment of two-step linear programmes of freezing biomaterial with time-controlled crystallization process. The freezer requirements and the procedure of control signal formation are substantiated, the functional diagram of the system is described, and a comparative estimate of its advantages is made. Experimental data qualifying the fulfilment of freezing programmes and preservation of deconserved leukomass is presented.

4 figs. 1 table. Refs: 5 titles.

UDC 57.043

Cryourologic Apparatus to Treat Prostate Tumours. Krivorotko V. F. — Kriobiologiya i kriomeditcina, 1981, iss. 8, p. 89—92.

Data on the block diagram of a cryogenic system for producing cryoeffect on prostate tumours are presented. The system consists of a cooling agent reservoir and a line of cooling agent supply to the cryocatheter.

4 figs. Refs: 3 titles.

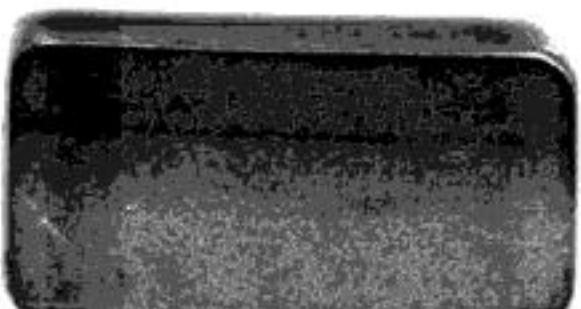
UDC 57.043:536.421.4

On Problem of Heat Exchange While Freezing in Containers Biological Objects. Pecheny M. L. — Kriobiologiya i kriomeditcina, 1981, iss. 8, p. 93—99.

A calculating procedure is presented for the process of cooling in the plate-type container a biological object. The procedure is based on analytical solution of a unidimensional nonlinear nonstationary heat conduction problem.

The results of calculation following the procedure of concern and the experimental data on freezing bidistilled water in a plate-type container with the frozen layer 8 mm thick are compared.

1 fig. Refs: 11 titles.



1 руб. 50 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»

Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 1-112.