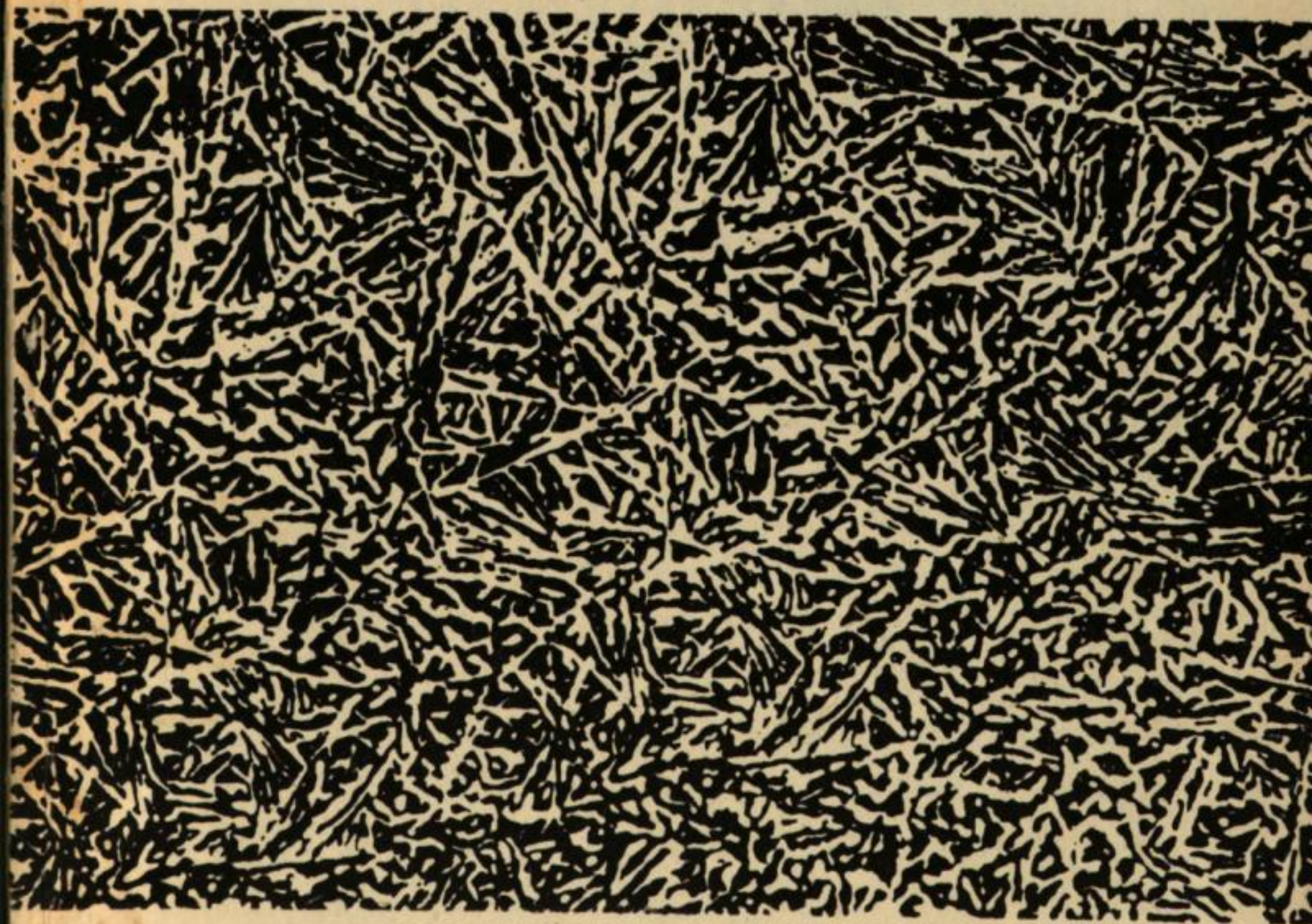


КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА



2

1 9 7 6

Матеріал, захищений авторським правом



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ВЫПУСК

2

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ—1976

57.04+61
K82

В сборнике изложены результаты экспериментально-теоретических исследований, посвященных механизмам криозащиты и криоповреждений биологических объектов различного уровня организации. Показана роль фазовых переходов и кристаллизационных эффектов низких температур при замораживании клеточных суспензий под защитой разных криопротекторов. Освещены морфологические и биохимические особенности повреждения субклеточных структур и клеток при замораживании. Описаны методы подготовки органов, тканей, бактерий, сывороток к гипотермическому и низкотемпературному замораживанию и длительному хранению.

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н. С. Пушкарь (отв. редактор), А. М. Белоус (зам. отв. редактора), М. И. Шраго (зам. отв. редактора), Г. С. Лобынцева (отв. секретарь), М. Г. Шенберг, Г. Н. Юрченко, В. И. Луговой, В. А. Моисеев, Е. Я. Панков, В. И. Мигасов

Редакция республиканских межведомственных сборников

Криобиология и криомедицина. Выпуск 2.

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

Редакторы В. И. Середа, Е. Т. Тальнова. Художественный редактор Р. И. Калыш. Оформление художника Р. Ф. Липатова. Технический редактор С. Г. Максимова. Корректоры Я. Н. Зубко, Л. Г. Бузиашвили.

Сдано в набор 18. XI 1975 г. Подписано к печати 23. III 1976 г. БФ 07339. Зак. № 3860. Изд. № 244. Тираж 1400. Бумага 1,70×108^{1/8}. Усл. печ. листов 9,1. Учетно-изд. листов 9,15. Цена 92 коп.

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

К $\frac{50500-212}{M221(04)-76}$ 371-76

© Издательство «Наукова думка», 1976 г.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА

*Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус, А. А. Цуцаева,
М. Г. Шенберг, Г. С. Лобынцева, В. И. Луговой*

Среди большого числа проблем криобиологии особое значение имеет метод глубокого охлаждения для длительного консервирования костного мозга и крови, хранение которых в жизнеспособном состоянии при положительных температурах ограничено в основном двумя неделями. Необходимость длительного хранения и создания запасов гемопоэтической ткани, потребность в больших количествах которой может возникнуть в любое время, связана с лечением больных с последствиями радиационных поражений, а также осложнениями, вызванными в процессе лучевой и химиотерапии.

Актуальность задачи создания значительного запаса костного мозга, который можно было бы хранить неограниченное время, не вызывает сомнений. Однако решение ее невозможно без глубоких исследований характера физико-химических процессов, протекающих в клетках костного мозга при замораживании-оттаивании, выяснения роли скоростей и условий замораживания и отогрева, влияния криопротекторов на структуры клетки и т. п. В настоящее время получены определенные результаты, которые позволили значительно продвинуть вперед проблему низкотемпературного консервирования костного мозга [6, 7, 12, 15, 20, 21, 24, 31, 32, 44, 52, 56, 57, 64].

Успехи, достигнутые по разработке оптимальных условий консервации костного мозга под защитой различных криопротекторов в эксперименте, привели к развитию и внедрению в практику способа лечения больных с депрессиями кроветворения консервированной миелоидной тканью [11, 23, 30, 50, 59]. Вместе с тем чрезвычайная сложность ряда вопросов в проблеме низкотемпературной консервации и трансплантации костного мозга, нерешенность некоторых ее узловых вопросов требуют продолжения совместных исследований медиков, физиков, химиков и биологов. Полученные ранее данные по разработке низкотемпературного консервирования костномозговых клеток оценивались после замораживания всей клеточной взвеси, которая содержит различные популяции клеток, по-разному реагирующих на низкотемпературное воздействие. Поэтому одним из центральных вопросов оставалась проблема выделения фракции стволовых клеток и разработка метода их низкотемпературного замораживания.

В отечественной и зарубежной литературе немало работ посвящено разработке и эксплуатации криогенного оборудования, позволившего эффективно замораживать значительные объемы костномозговой взвеси. Таким образом, за последнее время накопился значительный материал экспериментально-теоретического и прикладного характера, посвященный консервированию и трансплантации костного мозга, который нуждается в анализе и обобщении.

В ряде монографий и статей по трансплантации гемопоэтической ткани имеются главы, посвященные консервации костного мозга при положительных и низких температурах под защитой главным образом

глицерина [2, 4, 16, 19, 34, 35, 54, 55], ПВП [8, 10, 14], ПЭО [13, 21, 22] и некоторых других криопротекторов [14]; данные по эффективности криопротекторов освещены по-разному. Аналогичная ситуация сложилась и в отношении использования разных режимов замораживания и отогрева. Имеется также много нерешенных проблем, которые продолжают интенсивно разрабатываться [37, 44, 56, 65]. Все это явилось предпосылкой для более подробного изучения литературных данных по вопросу консервирования костного мозга под защитой других традиционных криопротекторов и сопоставления их с результатами собственных исследований.

КОНСЕРВАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПОД ЗАЩИТОЙ ГЛИЦЕРИНА

Метод низкотемпературного консервирования костного мозга получил развитие благодаря внедрению в практику криоконсервации биологических объектов такого эффективного защитного средства, как глицерин. Впервые низкотемпературное консервирование гемопозитической ткани в эксперименте под защитой глицерина было осуществлено в 1955 г. Барнесом и Лоутитом [42].

Применение глицерина для криоконсервации костного мозга является весьма эффективной мерой защиты этих клеток от криповреждений; глицерин позволяет снизить точку кристаллизации внутриклеточной жидкости и увеличить время пребывания клеток в критически опасной эвтектической температурной зоне без их повреждения.

В Центральном ордена Ленина институте переливания крови 100 мг взвеси костномозговых клеток замораживают в растворе ЦОЛИПК-3 в соотношении 1:1 с добавлением 10-, 15- и 40%-ного глицерина. После 30 мин экспозиции костномозговую смесь замораживают по двухэтапной программе (первый этап до -13° со скоростью 1° в 1 мин, второй — до -196° со скоростью 10° в 1 мин). Анализ термограмм замораживания такой смеси показывает, что в момент наступления переохлаждения и в течение последующего процесса кристаллизации на кривой замораживания возникает типичный температурный скачок в результате выделения скрытого теплообразования, за которым следует падение температуры. Начало и продолжительность периода кристаллизации зависят от концентрации глицерина в среде: чем выше концентрация, тем быстрее и при более низкой температуре происходит кристаллизация образца. Медленное замораживание костного мозга без глицерина вызывает кристаллизацию при температуре -3° , -7°C *, а в случае использования той или иной концентрации глицерина кристаллизация смещается в область более низких температур.

В последнее время, в связи с развитием метода низкотемпературной консервации костного мозга при умеренно низких температурах (-20° , -70°), стали широко использоваться различные типы электрохолодильников. Для выяснения физико-химических параметров замораживаемой взвеси в Центральном ордена Ленина институте переливания крови была проведена серия экспериментальных работ [27, 37].

Изучение скоростей охлаждения костного мозга мышей до температур порядка -20° , -40° , -70° под защитой 15%-ного глицерина показало, что в холодильных камерах замораживание проходит в три стадии: 1) охлаждение до момента кристаллизации; 2) кристаллизация (от -11° до -13°) с выделением скрытой теплоты плавления; 3) затвердевание суспензии. Эти стадии характеризуются различной скоростью охлаждения. При одноэтапном или двухэтапном замораживании на каждом из этапов охлаждение осуществляется с определенной ско-

* Дальше во всех статьях температура приведена в градусах Цельсия, кроме специально указанных случаев.

ростью, что по-разному влияет на жизнеспособность клеток. Использование одноэтапного замораживания костномозговой взвеси до умеренно низких температур, по данным подсчета ядросодержащих клеток, суправитального окрашивания и изучения колониеобразующей способности костного мозга, дает возможность сохранить разное количество жизнеспособных клеток. Наиболее высокий уровень жизнеспособности наблюдался после одноэтапного замораживания и хранения при температуре -40° .

Двухэтапное замораживание до -70° дает значительно лучший эффект, чем при всех других испытанных режимах консервирования. Указанный режим замораживания клеток костного мозга под защитой 15%-ного глицерина позволяет сохранять жизнеспособным костный мозг на протяжении не менее двух месяцев. Вместе с тем использование глицерина в качестве защитного соединения при низкотемпературной консервации клеток костного мозга показало, что глицерин не безвреден и вызывает определенные метаболические и структурные нарушения в клетках гемопоэтических тканей. Установлено, что чем выше концентрация глицерина в среде замораживания, тем больший процент клеток гибнет [32, 33, 67]. Считают, что глицерин оказывает сильное повреждающее действие на все виды клеток костного мозга, за исключением недифференцированных и малодифференцированных клеток, лимфоцитов и клеток эритропоэтического ряда. Быстрее всего наступают изменения в цитоплазме, а затем в ядре. Особенно выражены повреждения ультраструктуры гранулоцитов [28—30].

По характеру уязвимости субклеточные структуры костного мозга можно расположить следующим образом: цитоплазматическая сеть, мембраны лизосом и ядра, наружная мембрана клетки, гранулярные структуры, внутренние структуры ядра. Нарушение этих структур клеток под влиянием глицерина может привести к их гибели либо потере специфических свойств. Особый интерес представляют методические разработки по удалению глицерина из деконсервированных тканей и клеток.

В 1956 г. Словитер предложил удалять глицерин из размороженных клеток путем ступенчатого погружения их в ослабевающие растворы глицерина. В дальнейшем была установлена эффективность для этих целей 33,5—35%-ного раствора глюкозы и изотонических растворов Хэнкса, Тирода, Игла и др. Однако при отмывании «глицеринизированных» клеток этими и другими растворами погибает значительное число миелокариоцитов [53, 68, 70]. Поэтому большинство клиницистов считают, что глицеринизированные клетки костного мозга трансплантировать не только нежелательно, но и опасно, поскольку в кровяном русле они подвергаются массивному осмотическому лизису и вызывают сильные трансфузионные реакции [45, 46, 58].

Таким образом, приведенный экспериментальный материал хотя и свидетельствует о широком применении глицерина в качестве защитного соединения при замораживании костномозговых клеток, однако содержит убедительные данные о деструктивном действии глицерина на структуры клетки как при добавлении его, так и особенно — в процессе удаления из клетки. Однако механизмы последствий этого воздействия остаются во многом мало исследованными.

КОНСЕРВАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПОД ЗАЩИТОЙ ДМСО

Впервые диметилсульфоксид (ДМСО) в качестве консерванта использовали Лавлок и Бишоп для замораживания эритроцитов человека и быка [51]. В дальнейшем ДМСО был широко использован при замораживании разнообразных тканей, включая клетки крови и кост-

ного мозга [41, 43, 48, 57, 66], было установлено, что ДМСО быстро проникает через клеточные мембраны и метаболизируется клетками после их отогрева. Этот препарат не вызывает распада ДНК и других ядерных структур, что наблюдается в присутствии глицерина. Костный мозг мышей, сохраняемый в течение месяца при -79° под защитой ДМСО, оказывает защитное действие на летально (в дозе 1000 р) облученных животных.

После переливания животным консервированного костного мозга его клеточный состав приближался к норме к 12-му дню, а при переливании свежего костного мозга в той же дозе ($5 \cdot 10^6$ клеток) репулационные и морфологические свойства восстанавливались несколько раньше — на 6—7-й день.

При проверке криозащитного действия ДМСО на клетках тканевых культур, а также других объектах по данным метода фазово-контрастной микроскопии, взятого в качестве теста на жизнеспособность, доказано, что оптимальной концентрацией является 10%-ный раствор ДМСО; он обеспечивает выживаемость не меньше чем 50% клеток костного мозга. При использовании 7,5%-, 12,5%-ной либо других концентраций ДМСО жизнеспособность клеток в культуре ткани резко падала. Однако в последнее время ДМСО используют и в указанных концентрациях в зависимости от типа клеток и поставленной задачи исследования. Очевидно, диапазон этих концентраций ДМСО является оптимальным и проявляет максимальный криозащитный эффект.

Инкубация клеток костного мозга на протяжении 10 мин при 0° перед замораживанием вызывает достаточное проникновение ДМСО в клетки, что важно для сохранения их высокой жизнеспособности после деконсервации. Более длительная экспозиция костномозговых клеток с ДМСО снижает их жизнеспособность. Добавление в среду инкубации экзогенных белков в значительной мере угнетает токсическое действие ДМСО в костномозговой взвеси.

Считают, что клетки костного мозга различных животных избирательно чувствительны к действию ДМСО. Одни клетки менее, другие более устойчивы к действию этого соединения. Замораживание клеток костного мозга до -79° под защитой ДМСО и трехнедельное их хранение почти не влияет на их жизнеспособность. При длительных сроках хранения (60—75 дней) количество жизнеспособных клеток в некоторых случаях снижается на 13—20%. Имеются сообщения о том, что клетки костного мозга можно успешно замораживать и хранить при умеренно низких температурах (от 35 до 40°) под защитой 10%-ного ДМСО [44].

Согласно данным, полученным с помощью люминесцентной микроскопии и суправитальной окраски 1%-ным раствором эозина, хранение замороженного до -79° костного мозга на протяжении 7—180 дней дает довольно высокий выход числа жизнеспособных клеток.

В последнее время появляется все больше данных о том, что ДМСО оказывает токсическое действие на клетки костного мозга. Перед введением костномозговой взвеси, инкубированной с ДМСО, последний нужно отмывать, что вызывает осмотические изменения и разрушение структур клетки. В случаях, когда после размораживания костномозговой суспензии ДМСО не удаляли и переливали ее собакам, у 2 собак из 5 через 1—2 ч после переливания обнаружили повышенное количество билирубина в крови и у всех животных с первых по 10-е сутки — увеличенное количество ретикулоцитов [36]. При внутривенном введении ДМСО вместе с суспензией клеток в дозе 0,6 мл/кг веса препарат оказывал токсическое действие, он вызывал некробиотические изменения паренхиматозных органов, особенно печени. На 2—3-й неделе наблюдались нарушения лейко-эритроцитарного отношения и индексов созревания нейтрофилов и эритро-нормобластов, что свидетель-

стствует о гиперплазии красного ростка и ускорении созревания ядерных элементов красного ряда. Микроскопически к этому сроку обнаружено увеличение количества молодых элементов миелоидного и эритроидного ряда без существенных отклонений в мегакариоцитарном ростке.

Токсичность ДМСО по сравнению с глицерином выявлена и в работах, где использовали культуру ткани [47]. Было показано быстрое нарастание дегенеративных процессов в клетках, инкубированных с 10%-ным ДМСО при $+20^{\circ}$ и $+37^{\circ}$. Число случаев хромосомных aberrаций (влияние субтелоцентрических и телоцентрических хромосом) в клетках тканевых культур после инкубирования с 10%-ным ДМСО в течение 150 мин повышалось до 38% (при 12% в контроле), а при использовании глицерина — до 46% [69].

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о довольно высоких криозащитных свойствах ДМСО в отношении клеток костного мозга, однако значительная токсичность этого соединения требует особой осторожности при использовании его в качестве защитного вещества в процессе разработки методов низкотемпературной консервации биологических объектов.

КОНСЕРВАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПОД ЗАЩИТОЙ ПВП

В 1961 г. в качестве защитного соединения при замораживании клеток костного мозга был предложен поливинилпирролидон (ПВП) с молекулярным весом 30 000—40 000 в 10%-ной концентрации [60].

На основании многочисленных опытов было сделано заключение, что ПВП как криопротектор может воздействовать на клетку как эндо-, так и экзоцеллюлярно.

Внеклеточный механизм криопротекции ПВП реализуется за счет адсорбции и разбавления в среде электролитов, а также путем обратимого воздействия на проницаемость наружных плазматических мембран клеток. В результате этого может предотвращаться возникновение внутриклеточного образования льда и увеличиваться период переохлаждения клеток.

Левиттом в опытах на корнях растений было показано, что ПВП частично проникает в клетки [49]. Считают также, что ПВП может частично растворяться в липидах мембран, изменять их проницаемость и проникать внутрь клетки. Предполагается, что путем пиноцитоза внутрь клетки проникает обычно не более 0,2% меченого ПВП [62, 63].

Наиболее эффективными соединениями ПВП являются полимеры с молекулярным весом от 10 000 до 30 000, которые сохраняют до 30% клеток живыми при охлаждении их до -5° . При использовании ПВП более высоких молекулярных весов жизнеспособность клеток костного мозга снижается почти вдвое [67]. Изучение различных концентраций ПВП показало, что наибольшее защитное действие проявляет 10%-ная концентрация препарата.

Поскольку ПВП не токсичен, удалять его из среды замораживания после деконсервации клеток не нужно. Однако 10%-ный раствор ПВП в опытах Персидского [61, 62] обеспечивал сохранение жизнеспособности клеток лишь в 30% случаев, в то время как 10%-ный ДМСО — в 50%.

Имеется немало сообщений об эффективности ПВП при низкотемпературном консервировании посмертного костного мозга. В среды, содержащие ПВП среднего и низкого молекулярного веса, добавляют глюкозу, гомологичную сыворотку крови либо альбумин, раствор Хэнкса, антибиотики, гепарин, сахара. При замораживании костномозговой суспензии в 8,5%-ном водном растворе ПВП сохраняется 56% живых клеток, а при добавлении к раствору гомологичной сыворотки и глюкозы — до 63%.

На основании этих данных был сделан вывод, что водные либо солевые растворы ПВП в недостаточной мере защищают клетки от повреждающего действия низких температур. Поэтому оптимальный выход жизнеспособных клеток размороженной суспензии можно, очевидно, получить в случае использования комплекса экстра- и интрацеллюлярных криопротекторов, в состав которых входят ПВП, глюкоза, гомологичная сыворотка и т. п. При использовании такого комбинированного раствора рекомендуется трехэтапное замораживание (первый этап со скоростью 1° в 1 мин до -20° , второй — 10° в 1 мин до -80° , третий — $300-400^\circ$ в 1 мин до -196°). В консервированном таким образом костном мозге на протяжении 5 лет сохранялось 80—85% структурно неизмененных клеток [9]. Клинические наблюдения после трансфузии такого костного мозга больным по соответствующим показаниям свидетельствуют также о том, что аутотрансплантация размороженного костного мозга переносится больными без осложнений. В дальнейшем более тщательные исследования механизма действия ПВП показали, что сохранение жизнеспособности клеток костного мозга, замороженных под защитой низкомолекулярного ПВП, зависит от условий и времени выдержки клеток с этим криопротектором перед охлаждением. Установлено, что после хранения материала при $+2^\circ$, $+4^\circ$ число жизнеспособных клеток к 7—8-м суткам постепенно снижается до $87 \pm \pm 2,6\%$. При этом сегментоядерные и палочкоядерные нейтрофилы, миелоциты и метамиелоциты сохраняются до 13—14-го дня консервирования, а лимфоциты и эритробласты — до 23-го. Хорошие результаты получены также при низкотемпературной консервации (-196°) посмертного костного мозга с помощью 10%-ного ПВП по методу двухэтапного замораживания (сохраняется $87 \pm 1,3\%$ клеток) [3].

Сохранность клеток костного мозга человека под защитой ПВП может быть улучшена при комбинированном использовании различных сложных сред, которые потенцируют действие криопротектора и тем самым повышают выход количества жизнеспособных клеток.

В костном мозге, консервированном с помощью защитных сред, содержащих 15%-ный раствор глицерина и 8,5%-ный раствор ПВП, сохраняется до 20—23% стволовых клеток. Комбинация ПВП с 3%-ным альбумином повышает выход жизнеспособных стволовых клеток до 64%. На основании полученных данных среду, содержащую ПВП и альбумин, рекомендуют для широкого практического применения [1].

Консервация клеток костного мозга при умеренно низких температурах под защитой ПВП в комбинации с различными средами также дает неплохие результаты. Так, при замораживании костного мозга человека до -40° в среде, содержащей 15%-ный ПВП, глюкозу и сыворотку крови, сохраняется в течение 3—4 месяцев 77—73% миелоидных элементов [5].

Обзор данных по криоконсервации костного мозга под защитой ПВП показывает, что при использовании определенных оптимальных скоростей замораживания и концентраций это полимерное соединение, очевидно, может явиться весьма эффективным криопротектором. Вместе с тем необходимо отметить, что ПВП оказывает несколько менее выраженный защитный эффект, чем, например, ДМСО и глицерин. Причины этого остаются неясными, поскольку механизм действия ПВП на мембранные структуры клеток еще мало исследован.

КОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПОД ЗАЩИТОЙ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА

В 1957 г. в Харькове для защиты клеток костного мозга при низкотемпературном консервировании было предложено криофилактическое соединение отечественного производства — полиэтиленоксид

(ПЭО) — продукт полимеризации окиси этилена. Как показали исследования, ПЭО с молекулярным весом 4000 эффективен при защите эритроцитов в процессе консервации методом быстрого замораживания, а ПЭО с молекулярным весом 400 — при консервации ядерных клеток крови и костного мозга [21, 24].

Установлено, что полиэтиленоксиды, вводимые внутрь животным и людям, даже в значительных количествах не оказывают токсического эффекта.

Рентгенографические исследования показали, что концентрация ПЭО оказывает существенное влияние на процессы кристаллизации как водных его растворов, так и проб костного мозга, суспендированных с ПЭО на среде ЦОЛИПК-5. ПЭО-400 по сравнению с глицерином способствует образованию более мелких кристаллических структур в окружающей клетку среде. Это, очевидно, связано с тем, что ПЭО слабо проникает в клетки и локализуется в основном в межклеточной жидкости, обволакивая наружную мембрану клетки.

При замораживании костного мозга по двухэтапной программе (на первом этапе — 1° в 1 мин до -15° и на втором этапе — 400° в 1 мин до -196°) под защитой различных концентраций ПЭО-400: 15%-ная концентрация полиэтиленоксида способствует лучшему сохранению морфологической целостности клеток [22].

Существенное влияние на клетки оказывает и период эквilibрации их в растворе криопротектора перед замораживанием.

Проведенные исследования свидетельствуют, что 15—30-минутная экспозиция миелокариоцитов с ПЭО-400 перед замораживанием является наиболее оптимальной и может быть использована при подготовке клеток костного мозга к консервированию.

Разработанный метод двухэтапного замораживания клеток костного мозга под защитой 15%-ного ПЭО-400 обеспечивал выживаемость в среднем $90 \pm 10\%$ клеточных элементов, сохранение их репуляционных свойств и не уступал результатам замораживания-оттаивания под защитой глицерина [18]. При изучении таких цитохимических показателей, как содержание гликогена, ДНК, РНК, липидов и пероксидазы показано, что добавление к взвеси клеток 15%-ного раствора ПЭО-400 приводит к незначительным изменениям среднего гистохимического коэффициента. При глубоком охлаждении до -196° и оттаивании количество гликогена в клетках снижается незначительно (до 20%), что согласуется с результатами исследований жизнеспособности клеток с применением эозиновой пробы, гранулярного красителя и люминесцентной микроскопии.

Проведенные параллельно цитохимические исследования дыхательной функции клеток донорского костного мозга, полученного на растворе ЦОЛИПК-3, показали, что активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и диафораз в разных видах миелокариоцитов неодинакова. В бластных клетках, миелоцитах и тромбоцитах ферменты можно расположить по убывающей активности в следующем порядке: НАД-диафораза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа. На основании сравнительного изучения цитохимических и морфологических показателей миелокариоцитов, подвергшихся низкотемпературной консервации при -196° , отмечена наиболее высокая защитная способность у ПЭО-400. Глицерин, ДМСО и ПЭО-100 дали в этих условиях худшие, близкие между собой результаты [17].

Механизм влияния ПЭО-400 на активность изучаемых ферментов представляется недостаточно ясным. Можно предположить, что криопротектор либо оказывает влияние на факторы клеточной среды, которые обеспечивают максимальную активность энзимов (например, изменение рН, осмотического давления и др.), либо он комплексируется с

энзимом, дегидратирует его и, таким образом, нарушает специфическую активность.

После удаления ПЭО-400 из среды активность ферментов в клетках восстанавливается. Следовательно, угнетающее действие криофилактика в отношении дыхания и активности изученных энзимов связано с так называемым псевдотоксическим эффектом, носящим обратимый характер; он отмечен и для ряда криофилактиков — глицерина, ДМСО и др. [39].

Ауторадиографические исследования миелокариоцитов до и после замораживания под защитой 15%-ного ПЭО-400 показали, что низкотемпературное консервирование по двухэтапной программе несколько

Т а б л и ц а 1

**Влияние различных сроков низкотемпературной консервации
на жизнеспособность (1, %) и интенсивность потребления кислорода
(2, мкл/ч) клетками костного мозга**

Вариант	Сроки хранения, дни							
	1		30		60		90	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Нативный костный мозг	99	730						
Замороженный в присутствии								
ПЭО—100	$\frac{95}{74}$	$\frac{505}{451}$	71	396	63	350	63	338
ПЭО—400	$\frac{98}{83}$	$\frac{680}{644}$	79	642	77	642	75	641
ПЭО—4000	$\frac{98}{79}$	$\frac{609}{598}$	78	579	77	576	73	208
ДМСО	$\frac{89}{59}$	$\frac{475}{302}$	49	262	36	236	32	208

П р и м е ч а н и е. В числителе — до, в знаменателе — после размораживания.

снижает интенсивность включения H^3 -тимидина в деконсервированные клетки либо уменьшает количество клеток, находящихся в это время в S-периоде [40].

Изучение дыхательной активности клеток костного мозга [18] показало, что клетки нативного донорского костного мозга, суспендированные в консерванте ЦОЛИПК-3 с жизнеспособностью 99%, после добавления костномозговой взвеси ПЭО-400 или ПЭО-4000 потребляют кислород в пределах 609 и 680 мкл/ч, что лишь на 10—15% ниже исходной величины. Менее благоприятные результаты получены после инкубирования клеток с ПЭО-100 и ДМСО (соответственно 505 и 475 мкл; табл. 1).

Изучение динамики дыхания и жизнеспособности клеток костного мозга доноров и онкологических больных, который хранился в жидком азоте под защитой ПЭО-400 в течение 3 лет, показало, что столь длительное хранение гемопоэтической ткани существенно не снижает изучаемые показатели по сравнению с данными, полученными сразу же после замораживания-оттаивания.

Исследование активности цитоплазматических ферментов в среде суспендирования показало, что экзоцеллюлярная среда трупного костного мозга, в отличие от донорского, характеризуется большей частотой обнаружения цитоплазматических ферментов (гексокиназы, фосфоорилазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактат-дегидрогеназы) и повы-

шением уровня активности некоторых из них после низкотемпературного консервирования под защитой ПЭО-400. Из всех изученных в среде суспендирования ферментов обнаруживается наибольшая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы.

Результаты этих исследований свидетельствуют, что замораживание-оттаивание клеток костного мозга вызывает выход в экстрацеллюлярную среду многих ферментов, вследствие частичного или полного повреждения внутриклеточных структур и повышения проницаемости наружной клеточной мембраны. Исследование ферментов в экстрацеллюлярной среде и изучение дыхания наряду с морфологическими и цитохимическими тестами может быть использовано как дополнительный показатель структурно-функциональной полноценности биологического материала, подвергнутого низкотемпературной консервации.

Несмотря на ряд установленных фактов, некоторые стороны молекулярного механизма действия ПЭО-400 остаются невыясненными. Это соединение — достаточно эффективный криопротектор при криоконсервации клеток костного мозга — может быть рекомендовано для широкого практического применения.

Представленный в настоящей работе фактический материал, касающийся проблем консервирования гемопозитической ткани, свидетельствует о значительных успехах, достигнутых в усовершенствовании методов замораживания костного мозга и хранения его при низких температурах. Наиболее широкие исследования проведены по разработке низкотемпературного консервирования клеток костного мозга под защитой традиционного криопротектора — глицерина.

Вместе с тем многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что существующие методы длительного консервирования костного мозга под защитой глицерина позволяют сохранять лишь около 50% стволовых клеток, ответственных за приживание гемопозитической ткани. Половина клеток гибнет при подготовке, в процессе замораживания и после оттаивания. Поэтому проблема выделения и замораживания фракции стволовых клеток костного мозга остается актуальной.

Для решения указанных выше вопросов необходимо совершенствовать методы фракционирования костномозговой взвеси для выделения стволовых клеток с целью разработки индивидуального режима их замораживания и отогрева.

Неясными остаются также наиболее целесообразные сроки хранения замороженных клеток костного мозга при разных температурах под защитой глицерина. Задача осложняется еще и тем, что глицерин необходимо удалять из деконсервированных клеток перед их трансплантацией. Эта манипуляция сама по себе снижает количество активных клеток в размороженной суспензии, что приводит практически к низкому качеству трансплантата. Удаление глицерина из отогретых клеток представляет собой довольно трудоемкий длительный и, главное, подчас неэффективный процесс. Не меньшее значение для успешной реализации метода низкотемпературного консервирования миелоидной ткани имеют исследования и в области скоростей замораживания. Как известно, основной задачей является выработка так называемого оптимального режима (скорости) замораживания, который способствует максимальной выживаемости клеток. Сложность решения этой проблемы заключается в том, что оптимальный режим охлаждения миелоидной ткани является функцией многих переменных, он зависит от состава клеточной популяции, природы и концентрации ингредиентов среды, характера физико-химического взаимодействия между молекулами криопротектора, воды и компонентов клетки. Однако все эти процессы сложных взаимодействий, протекающие в основном на молекулярном уровне, остаются мало исследованными, а в некоторых случаях — неизвестными. Между тем выяснение этих и других механизмов взаимо-

действий может явиться основополагающим при разработке наиболее оптимальных режимов замораживания.

Эксперименты по криоконсервации миеелокариоцитов под защитой ДМСО свидетельствуют, что этот криофилактит обладает достаточно выраженными криопротекторными свойствами по отношению к миеелоидной ткани. Выявленная в последнее время высокая токсичность ДМСО снижает возможность применения его при низкотемпературной консервации костного мозга. Возможно, ДМСО будет использован в виде добавки к сложным криозащитным смесям, используемым для замораживания миеелоидной ткани.

Следует думать, что наиболее перспективным является использование непроникающих криопротекторов типа ПЭО и некоторых других, которые взаимодействуют в основном с наружной мембраной клеток и способствуют связыванию воды и гиперконцентрированных внеклеточных веществ, чем собственно и объясняется их защитное действие, особенно в зоне эвтектических температур.

Анализируя полученный материал, можно отметить, что использование экстрацеллюлярных протекторов дает довольно высокий выход жизнеспособных клеток при оценке их по морфологическим тестам. Однако в механизме защитного действия этих соединений остается еще много неясного. В этом плане весьма целесообразными следует признать биофизические, биохимические и электронно-микроскопические исследования, направленные на выяснение характера тонких взаимодействий органических и неорганических компонентов среды с полимерами, уточнение механизмов их взаимодействия с биомембранами и каталитическими белками, структурами белоксинтезирующего аппарата клеток с целью установления обратимости выявленных нарушений. Перспективными следует признать исследования криозащитного действия полиэтиленоксидов различных молекулярных весов при низкотемпературном консервировании клеток крови и костного мозга с целью применения в клинике.

Изучение жизнеспособности и специфических свойств деконсервированных миеелокариоцитов является следующей важнейшей задачей криобиологии. Разнообразие процессов, происходящих в живой клетке после ее деконсервации, не может быть изучено с помощью какого-то одного лабораторного метода. В настоящее время, очевидно, следует признать оправданным дальнейшее расширение комплекса методов для тестирования отогретых клеток костного мозга (в том числе радиоизотопных, биофизических и др.), которые позволят разносторонне оценить структурно-функциональное состояние клеток и выделить важнейшие критерии, по которым с большой достоверностью можно будет судить об уровне их жизнеспособности. Необходима дальнейшая разработка методов определения репуляционных свойств родоначальных клеток деконсервированного костного мозга.

В настоящее время лаборатории располагают, по сути, лишь одним способом отогрева размороженных миеелокариоцитов — отогревом на водяной бане. Другие методы оттаивания, с применением СВЧ-излучений, высоких давлений, магнитных полей еще очень мало разработаны. Существенной проблемой низкотемпературного хранения клеток костного мозга является консервирование с применением экономически выгодных средств, таких как электрохолодильники, дающих температуры порядка -20° , -80° .

Эффективно и своевременно лечить больных с депрессией кроветворения консервированным костным мозгом можно лишь при наличии достаточного запаса соответствующего материала, т. е. банков замороженного костного мозга. Обеспечение банков высококачественной миеелоидной тканью и в достаточном объеме может быть реализовано с помощью современного криогенного оборудования, позволяющего замо-

раживать одновременно значительные объемы костного мозга. Уже существует достаточно большое количество мощных и многопрограммных криогенных установок для замораживания миелокариоцитов, но использование их весьма ограничено из-за отсутствия серийного производства указанных установок. Следует признать перспективным выпуск малогабаритных замораживателей с более экономичным принципом работы.

Таким образом, совокупность полученных экспериментальных и клинических данных по криоконсервации и трансплантации костного мозга позволяет наметить общие перспективы развития данной проблемы.

Во-первых, это развитие фундаментальных исследований, направленных на изучение влияния разных скоростей замораживания, отогрева, а также действия криопротекторов на молекулярную структуру и свойства биомембран, физико-химические свойства биомакромолекул и их взаимодействие с защитными и стабилизирующими соединениями. Эти исследования имеют особое значение при работе со стволовыми клетками костного мозга, структурно-функциональные особенности которых изучены недостаточно.

Во-вторых, необходимо создать более эффективные консервирующие растворы, обеспечивающие высокую сохранность гемопоэтических клеток замороженного и размороженного костного мозга. Большое внимание должно быть уделено изучению новых криофилактических веществ экстра- и интрацеллюлярного действия и отработке режимов замораживания с этими растворами, обеспечивающих высокую жизнеспособность миелокариоцитов.

В-третьих, особое внимание должно быть уделено изысканию оптимальных режимов замораживания и созданию аппаратуры, позволяющей воспроизводить необходимый режим замораживания. Важное значение представляет разработка и усовершенствование малогабаритных аппаратов для программного замораживания клеток костного мозга и создание контейнеров из полимерных (фторопласта, полиэтилена высокого давления) и других материалов, предназначенных для длительного консервирования клеток.

В-четвертых, необходимо продолжить поиски новых достоверных методов интегрального исследования жизнеспособности клеток консервированного костного мозга человека.

В-пятых, актуальным является дальнейшее изучение в клинике и эксперименте результатов приживления трансплантированных миелокариоцитов, консервированных при ультранизких температурах.

Решение поставленных выше теоретических и практических вопросов позволит, можно думать, в недалеком будущем более полно решить проблему консервирования и пересадки размороженного костного мозга в клинических условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Б р а т у с ь Г. Г. Морфологические и функциональные особенности клеток костного мозга, консервированного при ультранизких температурах. Автореф. канд. дис. Киев, 1972.
2. Б у т о м о Н. В. Трансплантация костного мозга при лучевых поражениях. Л., «Медицина», 1970.
3. Г л у х е н ь к а я Т. Г. Консервация трупного костного мозга глубоким замораживанием. Автореф. канд. дис. Киев, 1971.
4. Д е г т я р е в а И. И. Механизм действия трансплантации костного мозга облученным животным. Киев, «Здоров'я», 1973, 99.
5. И о ф ф е А. Л. Некоторые вопросы консервирования костного мозга и его клинического применения. Автореф. канд. дис. Ташкент, 1973.
6. К и с е л е в А. Е. Некоторые вопросы консервирования и организации банков костного мозга. — Пробл. гематол., 1969, 14, 5, 3.
7. Л а в р и к С. С. Заготовка, консервирование и хранение костного мозга человека при ультранизких температурах. — В кн.: Гематол. и перелив. крови, 2. Киев, 1966. 159.

8. Лаврик С. С. Консервирование костного мозга глубоким замораживанием. Автореф. докт. дис. Киев, 1966.
9. Лаврик С. С. Трансплантация костного мозга, консервированного с помощью поливинилпирролидона глубоким замораживанием в жидком азоте (-196°). — В кн.: Труды XII съезда хирургов УССР (19—21 ноября, 1970 г.). Киев, 1971, 235.
10. Лаврик С. С. Длительное хранение костного мозга человека, консервированного с применением поливинилпирролидона при -196° . — В кн.: Труды XII Междунар. конгресса по перелив. крови (17—23 августа 1969 г.). М., 1972, 495.
11. Лаврик С. С., Глухенькая Т. Г. Транспортировка консервированного донорского и посмертного костного мозга на большие расстояния. — Пробл. гематол., 1974, 2, 58.
12. Лаврик С. С., Глухенькая Т. Г., Когут Г. И., Карабанова Л. Л., Афанасьева Е. Ю., Коротя Т. А. Опыт девятилетнего хранения при -196° консервированного костного мозга. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. (Материалы симпозиума). Киев, «Наукова думка», 1974, 150.
13. Медведев П. М., Фисанович Т. И. К исследованию хладозащитного действия полиэтиленоксида (ПЭО-400) на клетки костного мозга трупов. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Материалы 6-й Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Рига, 1972, 505.
14. Медведев П. М., Фисанович Т. И., Кропачев В. А., Трухманова Л. Б., Алферова Л. В. Применение сополимеров винилпирролидона с кротоновой кислотой в качестве криопротектора клеток костного мозга трупов. — Пробл. гематол., 1972, 3, 34.
15. Медведев П. М., Фисанович Т. И. О травматизации клеток крови и костного мозга в процессе глубокого охлаждения. — Цитология, 1973, 2, 129.
16. Михайлов В. Г. Консервирование костного мозга (при положительных и низких температурах) и применение его в клинике. Автореф. докт. дис. Ташкент, 1969.
17. Обозная Э. И., Шенберг М. Г., Пушкарь Н. С. О связи тканевого и внутриклеточного метаболизма костного мозга человека до и после низкотемпературной консервации. — В кн.: Современ. пробл. биохимии дыхания и клиника (Материалы II Всесоюз. конф. Иваново, 17—22 мая 1971 г.), 1. Иваново, 1972, 327.
18. Обозная Э. И. Изучение дыхательной функции костного мозга и крови в процессе низкотемпературной консервации (-196°). Автореф. канд. дис. Харьков, 1973.
19. Останкова Л. В. Оценка жизнеспособности костного мозга при консервации (-196°) под защитой полиэтиленоксида. Автореф. канд. дис. Харьков, 1972.
20. Пампутис Н. П., Майер В. В., Сведенцов Е. П. Модификация метода консервации костного мозга с использованием низкомолекулярного поливинола и альбуминага. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Материалы симпозиума, Харьков, 1974 г. Киев, «Наукова думка», 1974, 122.
21. Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Глузман М. Х., Дашевская В. И., Иткин Ю. А. Глубокое охлаждение как метод консервирования костного мозга. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Материалы 4-й Всесоюз. конф. Минск, 1966, 517.
22. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (-196°) костного мозга и его использование в клинических целях. Автореф. докт. дис. Харьков, 1968.
23. Пушкарь Н. С., Веркин Б. И., Даценко Б. М., Иткин Ю. А., Козырев В. Ф. Программное замораживание до -196° под защитой полиэтиленоксида как метод консервации костного мозга человека. — В кн.: Труды XII Междунар. конгресса по перелив. крови. М., «Медицина», 1972, 496.
24. Пушкарь Н. С., Шенберг М. Г., Наконечный А. А., Симонова Л. И., Цуцаева А. А., Обозная Э. И., Дроздова О. А., Останкова Л. В., Бодня В. М., Карева Л. В., Михайличенко З. П., Гайсенюк Л. А. Ограждающее действие полиэтиленоксида на клетки при глубоком замораживании. — Пробл. гематол., 1972, 3, 30.
25. Пхрикийн Ж. А. О возможности заготовки и консервирования посмертного костного мозга. Автореф. канд. дис. Ереван, 1965.
26. Рахматуллаев А. Р. Сравнительная оценка жизнеспособности консервированного костного мозга методом культуры тканей. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Материалы 6-й Всесоюз. конф. Минск, 1966, 519.
27. Суханова Л. И., Данилина Л. А., Федотенков А. Г., Шишкина И. Д. Влияние консервирующих сред на колониеобразующую способность клеток костного мозга. — Пробл. гематол., 1972, 9, 51.
28. Суханова Л. И. Консервирование костного мозга при низких температурах (-40 , -70°) (экспериментально-клинические исследования). Автореф. канд. дис. М., 1974.
29. Терентьева Э. И., Киселев А. Е., Федотенков А. Г. Электронно-микроскопическое изучение клеток костного мозга в процессе замораживания. — Пробл. гематол., 1968, 13, 2, 12.
30. Терентьева Э. И., Киселев А. Е., Федотенков А. Г. Влияние глубокого холода (-196°) на субмикроскопическое строение клеток. — Пробл. гематол., 1968, 8, 5, 3.

31. Файнштейн Ф. Э., Богоявленская М. П., Орлов Г. П., Суханов Ю. С., Неменова Н. М., Федотенков А. Г., Зотиков Е. А., Шишкина И. Д., Родина Р. И., Уринсон Р. Н. Влияние трансплантаций костного мозга, консервированного при -196° , на кроветворение больных с депрессией гемопоэза. — Пробл. гематол., 1969, 14, 5, 7.
32. Федотенков А. Г., Данилова Л. А., Дишкант И. П. Новый метод заготовки трупного костного мозга, предназначенного для трансплантации. — Пробл. гематол., 1963, 8, 2, 28.
33. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Левицкая Л. А. Замораживание костного мозга для консервирования его при низких температурах. — Пробл. гематол., 1966, 11, 2, 45.
34. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Данилова Л. А., Змиевская К. М., Воронцова Е. И., Герасимова М. А. Консервирование костного мозга при низких температурах для его клинического применения. — Пробл. гематол., 1966, 11, 2, 45.
35. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Данилова Л. А., Змиевская К. М., Воронцова Е. И., Герасимова М. А. Консервирование костного мозга при положительных температурах. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Материалы 6-й Всесоюз. конф. М., 1966, 541.
36. Федотенков А. Г. Консервирование костного мозга для клинических целей. Автореф. докт. дис. М., 1967.
37. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Игнашева Л. П., Курбанова Е. Н. Оттаивание замороженного костного мозга и отмывание его от глицерина перед трансплантацией. — Пробл. гематол., 1969, 14, 3, 48.
38. Федоров Н. И., Байдаев А. Б. К вопросу о консервировании костного мозга при умеренно низких температурах. — В кн.: Вопросы теоретической и клинической медицины, вып. 3. Нальчик, 1973, 142.
39. Шенберг М. Г. Некоторые стороны механизма действия полиэтиленоксида. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974, 37.
40. Шенберг М. Г., Маркова О. П., Обозная Э. И., Козлова В. Ф., Морозов И. А., Лакиза Б. С. Посмертный костный мозг до и после низкотемпературной консервации. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974, 131.
41. Ashwood-Smith M. J. Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethylsulfoxide. — Nature, 1961, 190, 1204.
42. Barnes D. W. H., Loutit J. F. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. — J. Nat. Cancer Inst., 1955, 15, 901.
43. Cavins J. A., Kasakura A. S., Thomas E. D., Ferrebee J. B. Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at low temperature in dimethylsulfoxide. — Blood, 1962, 20, 730.
44. Farrant J., McOann L. E., Knight S. C. Possible mechanisms of protection against freezing and thawing damage by subzero temperatures. — Abstr. 11th annual meeting Soc. for cryobiology. London, 1974, 37.
45. Ferrebee J. W., Billen D., Urso I. M., Thomas E. D., Congdon C. C. Preservation of radiation recovery factor in frozen marrow. — Blood, 1957, 12, 1096.
46. Ferrebee J. W., Atkins L., Lochte H. L., McFarland R. B., Jones A. R., Dammin G. J., Thomas E. D. The collection storage and preparation of viable cadaver marrow for intravenous use. — Blood, 1959, 14, 140.
47. Hroch V. S. Effect of DMSO and glycerol on cells of tissue cultures: cytological observation. Suppl. Collection Sci. Works Faculty of Medicine Charles University, Hradec Kralove, 14, 1971, 194.
48. Huggins C. E. Preservation of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide. — Transfusion, 1963, 3, 483.
49. Levitt J. A. Sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. — J. Theor. Biol., 1962, 3, 355.
50. Lorenz E., Uphoff D. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. — J. Nat. Cancer Inst., 1951, 12, 197.
51. Lovelock J. E., Bishop M. W. H. Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethylsulfoxide. — Nature, 1959, 183, 1394.
52. Luyet G. I., Gehenio P. M. Life and death at low temperatures. — Missouri, Normandy, 1940.
53. Mannick J., Lochte H. L., Thomas E. D., Ferrebee T. W. In vitro and in vivo assessment of the viability of dog marrow after storage. — Blood, 1960, 15, 157.
54. Mathé G., Amiel J. L., Schwarzenberg L., Choay I. Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphatic serum. — Brit. Med. J., 1970, 1702, 131.
55. Mathé G., Schwarzenberg L., Amiel J. L. Bone marrow. — In: Transplantation. Ed. J. S. Najarian, a. R. L. Simmons München, 1972, 588.
56. Mazur P., Leibo E. P. Dissection of freezing injury. — Cryobiology, 1971, 8, 382.

57. Meryman H. T. Review of biological freezing. — In: Cryobiology. Ed. H. T. Meryman. London—New York, 1966, 1.
58. Newton K. A. Total thoracic supervoltage irradiation followed by the intravenous infusion of stored autogenous bone marrow. — Brit. Med. J., 1959, 5121, 531.
59. Pegg D. E., Kemp M. H. Collection, storage and administration of autologous human bone marrow. — Lancet, 1960, 2, 1426.
60. Persidsky M. D., Richards V. Mode of protection with polyvinylpyrrolidone in freezing of bone marrow. — Nature, 1962, 196, 585.
61. Persidsky M. D., Richards V. Optimal conditions and comparative effectiveness of dimethylsulfoxide and polyvinylpyrrolidone in preservation of bone marrow. — Nature, 1963, 197, 1010.
62. Persidsky M. D., Richards V. Radiation protection of mice with bone marrow and spleen preserved at low temperature using polyvinylpyrrolidone. — Blood, 1964, 23, 337.
63. Persidsky M. D., Richards V., Leef J. Cryopreservation of bone marrow with low molecular weight polyvinylpyrrolidone. — Cryobiology, 1965, 2, 74.
64. Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. — Nature, 1949, 164, 666.
65. Pribor D. B. PVP contrasted with Dextran and a multifactor theory of cryoprotection. — Cryobiology, 1974, 11, 60.
66. Pyle J. W., Boyer H. T. Factors influencing the poststorage viability of human bone marrow. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 114, 686.
67. Richards V., Persidsky M. D. Investigation on low-temperature conservation of marrow. — Surgery, 1961, 50, 289.
68. Smith W. W., Brecher G., Stohlman F. Toxicity of tritiated thymidine to bone marrow transplants. — Radiat. Res., 1962, 16, 201.
69. Srb V., Hroch V. Effect of DMSO and glycerol on chromosomes of tissue culture cells. — Suppl. to Collection Sci. Works Faculty of medicine. Charles University, Hradec Kralove, 14, 1971, 200.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

К АНАЛИЗУ ОБЩИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА БИОЛОГИЧЕСКИЙ ОБЪЕКТ

Е. Я. Панков, В. А. Друзь

Одной из существенных задач криобиологии является установление общих закономерностей действия низких температур на биологический объект. Представляет интерес анализ действия низких температур на биологический объект, исходя из моделируемых взаимоотношений такого объекта и среды с выделением в ней действующего фактора (низких температур).

Для анализа этих отношений важным является рассмотрение биологического объекта как системы, имеющей особенности происхождения и развития.

Одной из теорий происхождения биологических систем является возникновение их в среде из первичных элементов на основе принципа самоорганизации при определенных условиях. Согласно этой точке зрения, первичные элементы биологической системы в виде различной сложности молекулярных соединений сосуществовали в условиях неоднородной среды и действия различных факторов. На пути строгих доказательств последовательности изменений, которые привели к возникновению и развитию биологической системы, имеются определенные трудности. Используя математическое моделирование и вводя некоторые ограничения, можно попытаться более строго определить основные закономерности возникновения и развития структурной и функциональной организации биологической системы. Вместе с тем такой подход позволяет найти оптимальное решение проблемы живая-неживая система.

Исходя из основного представления о имеющейся тесной связи между элементом и средой его существования, нами был прослежен

характер их взаимоотношений при условиях самовоспроизведения однородного элемента в ограниченной однородной среде.

В этих условиях возникновение каждого нового элемента приводит к усложнению среды на определенную величину. Так как каждое новое состояние имеет качественную характеристику и ее количественное выражение, то этот процесс можно представить в векторном пространстве, где исходное состояние системы выражено вектором A_1 (рис. 1). По отношению к нему появляющийся новый элемент вносит постоянное изменение B_1 . Новое исходное состояние можно представить как сумму этих векторов A_2 . Повторяя этот процесс многократно, приходим к тому, что между вектором исходного состояния и вектором, отражаю-

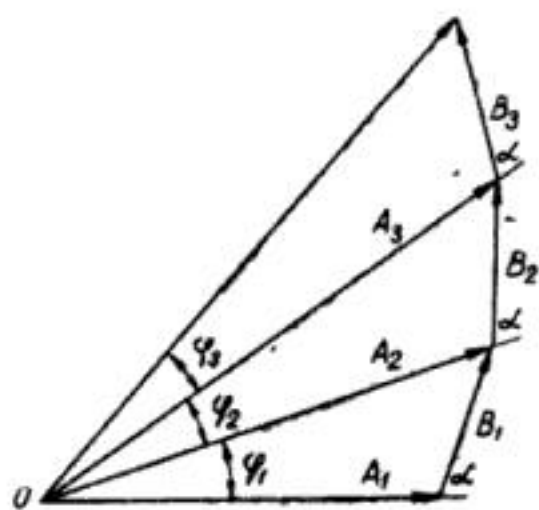


Рис. 1. Графическое изображение процесса взаимоотношения элемент-среда.

A_1 — вектор качества первичного элемента; $B_{1,2,3}$ — вектор нового элемента среды; $A_{2,3}$ — вектор нового качества после появления элемента B_1 ; α — постоянный угол отклонения вектора качества элемента B по отношению к исходному состоянию A_1 ; ϕ — угол отклонения системы отсчета при появлении нового элемента.

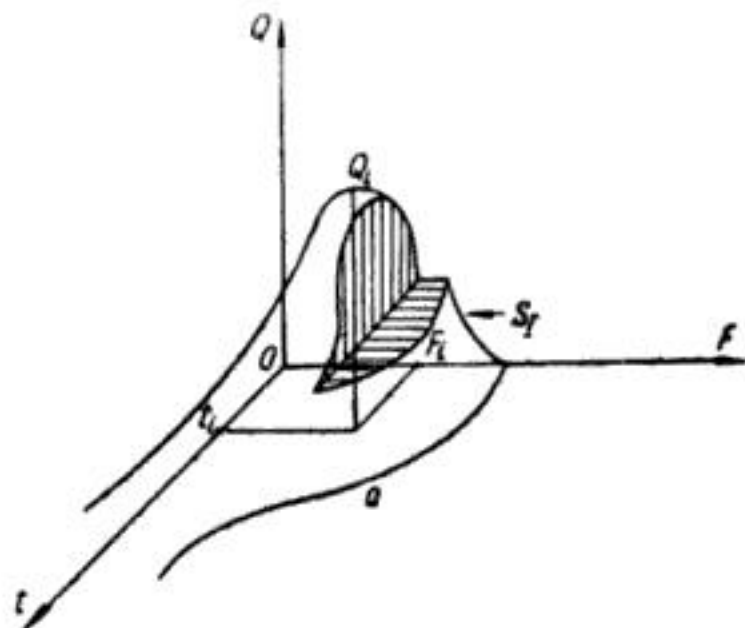


Рис. 2. Графическое выражение реакции системы (Q) в зависимости от силы (F) и времени (t) действия фактора:

a — огибающая кривая поверхности, Q_i — максимальная реакция при силе F_i и времени t_i ; S_1 — суммарная поверхность.

щим появление нового элемента, сохраняется постоянный угол α . При этом вектор нового исходного состояния отклоняется от предыдущего на некоторый угол ϕ_i , где $i = 1, 2, 3$ и т. д. В результате многократ-

ного повторения этого процесса будет получена ломаная, обладающая следующими свойствами. Каждый вектор A пересекается с гранью ломаной под постоянным углом α . В предельном переходе получается аналитическое выражение логарифмической спирали $A = Bk\phi$, где $k = \tan \alpha$.

Исходя из того, что процесс самоорганизации идет по логарифмической спирали, анализ отношений элементов при их количественном накоплении в однородной ограниченной среде и возникающих при этом качественных преобразований позволяет установить характер количественного распределения элементов, участвующих в соответствующих качественных преобразованиях. При протекании процесса самоорганизации в однородной среде это распределение описывается законом нормального распределения. На возможность именно такого характера распределения указано в ряде работ.

Отмеченные закономерности развития самопроизводящегося элемента в однородной среде по логарифмической спирали и характер распределения этих элементов по закону нормального распределения оказываются применимыми для анализа функциональных свойств биологических систем разной степени организации.

На основании отмеченных закономерностей можно утверждать, что при действии какого-либо фактора, например температуры среды, на связанную функциональную систему реакция отдельных элементов ее окажется неравнозначной.

В силу того, что каждая элементарная автономная единица, входящая в рассматриваемую связанную функциональную систему, может находиться только в одном из двух взаимоисключаемых состояний положительной или отрицательной реакции, в каждый конкретный момент общая реакция функциональной системы на действие некоторого агента среды складывается из положительно или отрицательно отреагировавших элементов и представляет их алгебраическую сумму. Аналогичным образом может быть рассмотрена реакция системы при учете величины реакции системы (Q), силы действующего агента (F) и времени его действия (t) (рис. 2).

В результате взаимодействия трех указанных переменных образуется поверхность (S_1), отражающая характер их связи. Данная поверхность описывает реакцию системы на действие некоторого фактора среды, являющегося в ней единственным. При изменении природы выбранного фактора общая картина поверхности остается прежней. Следовательно, для соответствующих состояний функциональной системы (Q) всегда определимы параметры факторов (F, t), вызывающие это состояние.

В случае, если фактором F является температура, а Q — интегральный показатель, отражающий жизнеспособность данного биологического объекта, в зависимости от времени действия этого фактора можно определить оптимальное состояние ($Q_{\max}$) жизнеспособности. При изменении величины фактора F и при постоянном t можно определить момент полного падения жизнеспособности. Теоретически этот момент совпадает с началом отсчета, однако для каждого биологического объекта он занимает определенное место.

Изменяя условия среды биологического объекта и снова определяя положение состояния ($Q_{\max}$), можно установить значение этих условий для жизнеспособности данного объекта. Сопоставление величин состояния системы по $Q_{\max}$ для разных факторов дает возможность соизмерить биологическую активность этих факторов; следовательно, существует возможность определения коэффициентов активности относительно некоторого стандартного фактора.

Характерная особенность поверхности S_1 , представленной на рис. 2, заключается в ограниченности ее в плоскости сила-длительность (кривая a , в плоскости Fot). Поэтому, какой бы малой не была величина действия фактора среды при определенной длительности его непрерывного влияния на систему, элементарные единицы переходят от положительной реакции к отрицательной и в конечном счете гибнут.

Представленные на этом этапе исследования данные об общих закономерностях реакции биологического объекта чаще всего отражают существование его *in vitro* без обновления среды, так как поверхность S_1 отражает закономерности реакций биологической системы в случае непрерывного функционирования однородного элемента в однородной среде без учета восстановления потенциальных возможностей элемента. Рассмотрение взаимоотношений элемента и среды при других условиях явится предметом дальнейших исследований.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ЭФФЕКТЫ КОМПЛЕКСИРОВАНИЯ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДОВ С «БИОМЕТАЛЛАМИ»

О. А. Нардид, В. А. Мусеев, В. В. Лемешко

В связи со значимостью в настоящее время проблемы устойчивости тканей и органов к низким температурам очень важно выяснить, какие физико-химические процессы приводят к повреждению биоструктуры при ее низкотемпературной консервации. Одним из факторов, повреждающих мембрану клетки при замораживании, является повышение концентрации электролитов. Необходимо выяснить защитную роль полиэтиленоксида (ПЭО), применяемого в качестве криопротектора от гиперконцентрации электролитов. Известно, что Cu^{2+} влияет на проницаемость глицерина в эритроциты человека [1]. По-видимому, немаловажную роль как в процессе проникновения глицерина в эритроцит, так и в процессе криозащиты от гиперконцентраций электролитов полиэтиленоксидом играет комплексообразование катионов металла с глицерином, этиленгликолем и другими органическими растворителями, применяемыми в качестве криопротекторов.

Нами исследованы возможности образования комплексов ПЭО с биологически важными катионами-«биометаллами», по определению К. Б. Яцимирского [2], такими, как Fe^{2+} и Mn^{2+} . На примере ингибирования дыхания полиэтиленоксидом НАД-Н-дегидрогеназного звена дыхательной цепи субмитохондриальных частиц строится предположение об образовании комплексов ПЭО с негемовым железом НАД-Н-дегидрогеназного участка дыхательной цепи.

На возможность образования комплексов с ионами металлов веществ, используемых в качестве криопротекторов, указывалось в ряде работ [3, 4]. Мы исследовали комплексы ПЭО-ион металла методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Этот метод достаточно чувствительный, так как при изменении ближайшего окружения иона с незаполненной $3d$ -оболочкой изменяются такие параметры спинового гамильтониана, как фактор спектроскопического расщепления $g_{\text{эф}}$, константы тонкой структуры b_n^m и константы сверхтонкой структуры (СТС) A, B, C .

Необходимые для приготовления соли и ПЭО высушивали до постоянного веса нагреванием до 110° .

При образовании комплексов Fe^{2+} с ПЭО в водном растворе образовывался осадок в виде мелких кристаллов, которые и исследовали на ЭПР-спектрометре при температуре жидкого гелия ($T=4,2^\circ\text{K}$). Необходимость исследования при таких низких температурах вызвана тем, что у иона Fe^{2+} на незаполненной $3d$ -оболочке находится четкое количество (6) электронов, поэтому время спин-решеточной релаксации очень мало. В спектре ЭПР наблюдалась широкая одиночная линия с $g \approx 2,5$ гс. В чисто водном растворе FeCl_2 сигнала обнаружить не удалось.

Нами исследованы зависимости интенсивности спектров поглощения от концентрации ПЭО в водных растворах Mn^{2+} . На рис. 1 показана зависимость интегральной интенсивности от концентрации ПЭО-600. При концентрациях ПЭО, близких к эвтектическим, концентрация парамагнитных ионов, не вступивших во взаимодействие с молекулами ПЭО, уменьшалась приблизительно в 5 раз. Остальные ионы образуют комплексы с ПЭО и не вносят вклада в интенсивность спектра.

При замораживании биологических объектов в определенной температурной зоне концентрация криопротектора достигает эвтектической. Как видно из рис. 1, при этом криопротектор может связать до 80% ионов металлов, находящихся в водном растворе. В связи с этим нам представляется, что один из механизмов криозащитного действия

криопротекторов — способность образовывать комплексы с анионами и катионами.

Биологическое действие ПЭО изучали по влиянию его на перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий. При этом было показано, что 10%-ный ПЭО-400 не оказывает влияния на сукцинатоксидазную активность митохондрий печени крысы ($61,3 \pm 2,7$ в контроле и $59,6 \pm \pm 3,7$ в опыте) *, но существенно ингибирует α -кетоглутаратоксидазную активность ($34,8 \pm 4,1$ в контроле и $20,6 \pm 1,7$ в опыте, $p < 0,01$).

Последнее может являться результатом ингибирования самого α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса либо НАД-Н-дегидрогеназного звена дыхательной цепи. Влияние ПЭО-400

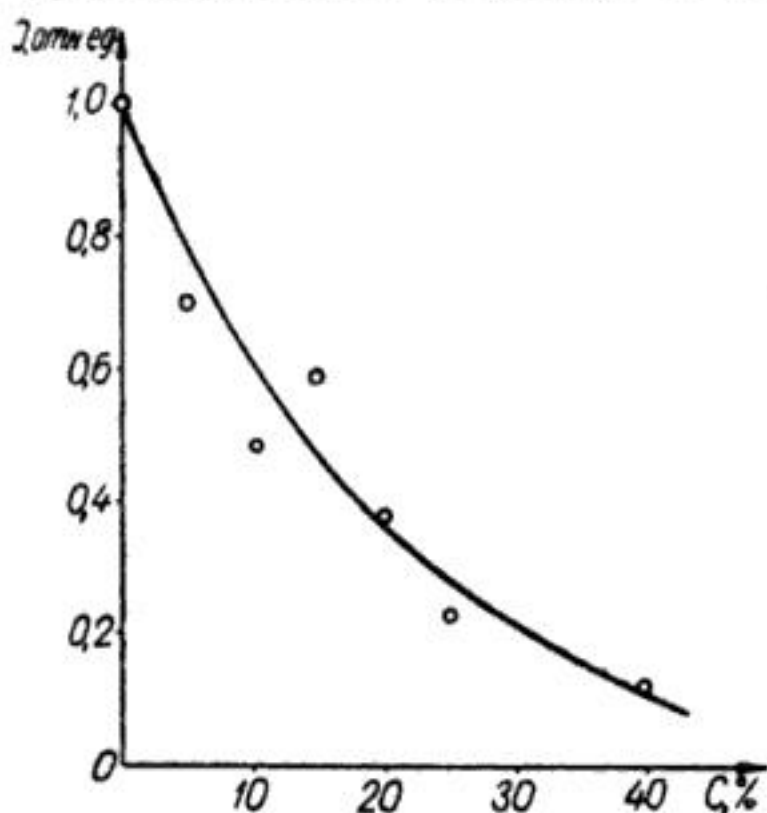


Рис. 1. Зависимость интегральной интенсивности линий поглощения (в относительных единицах) от концентрации ПЭО-600 в воднополиэтиленоксидном растворе $MnCl_2$. Концентрация $MnCl_2$ во всех случаях поддерживалась 0,01 М.

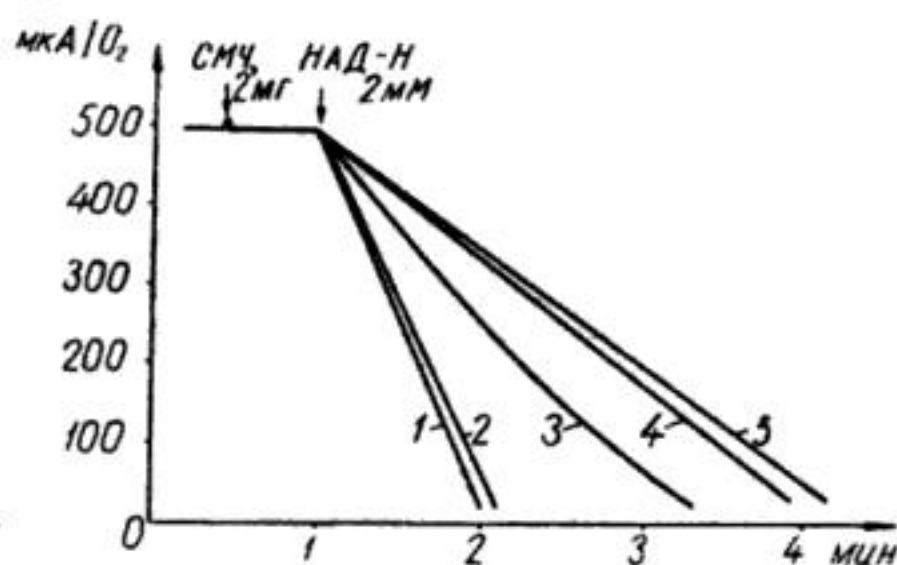


Рис. 2. Влияние криопротекторов на НАД-Н-оксидазную активность субмитохондриальных частиц (СМЧ):

1 — контроль; 2 — глицерин; 3 — ПЭО-100; 4 — ПЭО-300; 5 — ПЭО-400.

на НАД-Н-дегидрогеназный комплекс цепи было изучено на субмитохондриальных частицах (СМЧ), полученных после ультразвуковой обработки митохондрий сердца быка. У СМЧ НАД-Н-дегидрогеназный комплекс локализован на наружной поверхности мембраны, в результате чего угнетение НАД-Н-оксидазной активности не лимитируется проницаемостью экзогенного НАД-Н и ПЭО-400 через мембрану.

На рис. 2 показано влияние ПЭО-400 (5), ПЭО-300 (4), ПЭО-100 (3) и глицерина (2) в 15%-ной концентрации на НАД-Н-оксидазную активность СМЧ (1 — контроль). ПЭО-400 и ПЭО-300 в значительной степени угнетают окисление НАД-Н. Глицерин же не оказывает влияния на этот процесс.

В работе [5] показано, что вещества, образующие комплексы с ионами двухвалентных металлов, ингибируют активность НАД-Н-дегидрогеназного комплекса. Нам удалось выявить, что ПЭО-400 и ПЭО-300 также способны связывать двухвалентные ионы металлов. Следовательно, можно полагать, что ингибирующее действие ПЭО-400 и ПЭО-300 вызвано связыванием негемового железа, входящего в состав НАД-Н-дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леви А., Сикевич Ф. Структура и функции клетки. М., «Мир», 1971, 505.
2. Яцимирский К. Б. Бионеорганическая химия и ее перспективы. — Вестник АН СССР, 1974, 7, 34.

* Активность выражена в наноатомах кислорода на 1 мг белка в 1 мин.

3. Burlamacchi L., Romanelli M. Electron spin relaxation of transitive metals $3d^5$ -ions in mixed water-glycerol solutions. — J. Chem. Phys., 1971, 55, 2, 979.
4. Knetsch O., Groenvald W. L. — Complexes of ethylene glycol with some metal (II) sulfates and nitrates. — Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas, 1973, 92, 7, 855.
5. Kichir S. K., Brodie A. F. Oxidative Phosphorylation in fractionated Bacterial Systems. — J. Biol. Chem., 1967, 242, 197.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

УСЛОВИЯ РОСТА КРИСТАЛЛОВ В РАСТВОРЕ. I. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Ю. А. Иткин, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Розанов

Для установления связи сохранности консервируемых клеток с условиями замораживания и выяснения механизмов повреждения на этапе кристаллизации в первую очередь требуется установить, как разные условия замораживания сказываются на кинетических особенностях роста кристаллов. Мы надеемся, что применение физико-математического аппарата неравновесной термодинамики позволит нам описать и процессы роста кристаллов и взаимодействие «клетка—окружающая среда» в процессе фазового превращения консервируемого объекта. В данной статье обсуждаются условия совместимости на движущейся границе раздела фаз, обсуждается сама постановка задачи о росте кристаллов и намечаются пути дальнейшего исследования.

Граничные условия. На основе законов сохранения массы, импульса и энергии определены [4] локальные динамические соотношения на движущейся границе раздела фаз. Обобщение этих соотношений на случай роста кристалла в n -компонентном растворе с учетом вязкостных эффектов приводит к следующим условиям совместности на фронте растущего кристалла:

$$[\rho u] = 0, \quad (1)$$

$$[v_\tau] = 0, \quad (2)$$

$$[\rho u^2 + P - \sigma'_{nk} n_k] = -2\alpha H, \quad (3)$$

$$[\rho u (1/2 \cdot u^2 + w) + j_q + v_k \sigma'_{kn}] = 0, \quad (4)$$

$$[\rho_i u - j_i] = 0 \quad (i = 1, 2, \dots, n), \quad (5)$$

где ρ — плотность, v — скорость частиц среды, индексы τ и n относятся к тангенциальным и нормальной к фронту кристалла составляющим, u — нормальная составляющая скорости среды относительно фронта, $u = v_n - N$, N — скорость роста раздела фаз в нормальном направлении, P — давление, σ'_{jk} — вязкий тензор напряжений, который для несжимаемой жидкости имеет вид $\sigma'_{jk} = \eta \left(\frac{\partial v_j}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_j} \right)$, η — коэффициент вязкости, n_k ($k = \tau, n$) — тангенциальные и нормальная орты на поверхности раздела фаз, α — коэффициент поверхностного натяжения, H — средняя кривизна поверхности, w — тепловая функция, j_q, j_i — соответственно тепловой поток и поток i -компонента через единичную площадку границы раздела, $1/\rho_i$ — удельный объем i -компонента. Квадратные скобки означают разность значений величины, которая в них заключена, с обеих сторон поверхности раздела фаз. Индексы 1 и 2 в дальнейшем будут относиться соответственно к кристаллу и маточному раствору.

Поскольку скорости роста кристаллов значительно меньше, чем скорость звука, жидкость, из которой растет кристалл, можно считать несжимаемой и пренебречь первыми членами в (3) и (4). Учитывая отсутствие конвекции в твердой фазе, из (1) — (5) получаем

$$N\rho_1 \left[\frac{1}{\rho} \right] = v_2, \quad (6)$$

где $v = 1/\rho$ — удельный объем раствора:

$$v_{\tau_i} = 0, \quad (7)$$

$$\rho_1 = [\sigma_n' n - P] - 2\alpha H, \quad (8)$$

$$\rho_1 N = \{ -[j_q] + v_2 \sigma_n' n \} / \{ [1 + w] \}, \quad (9)$$

$$\rho_1 N [c_i] = [j_i], \quad (10)$$

где c_i — массовая концентрация i -компонента.

Считая, что локальное равновесие в системе, претерпевающей фазовое превращение, достигается всюду, кроме границы раздела фаз, полагая отклонение от равновесия на границе малым, пренебрегая изменением удельного объема жидкой фазы с температурой и влиянием вязкости, граничное условие (9) приводим к виду

$$\rho_1 N (q + c_{p2}[T] - w_2[\bar{c}] - 2V_2\alpha H) = -[j_q^1], \quad (11)$$

где $[j_q^1] = [j_q] - w_2[j]$, q — скрытая теплота плавления, c_{p2} — теплоемкость со стороны жидкой фазы, а $\bar{c}(P_1, T_1)$ — фазовая диаграмма системы, которая задается связью

$$\mu_1^i(P, T, \bar{c}_1) = \mu_2^i(P, T, \bar{c}_2), \quad (12)$$

i — индекс компоненты.

Пренебрегая диффузией в твердой фазе и используя уравнения неравновесной термодинамики (без учета перекрестных эффектов), граничные условия (8), (10), (11) преобразовываем

$$0 = - \{ [P] + 2\alpha H \} v_2, \quad (13)$$

$$\rho_1 N = \rho_2 D_2 (\nabla c)_n / [c], \quad (14)$$

$$\rho_1 N = [\alpha (\nabla T)_n] / \{ q + c_{p2}[T] \} - w_2 \bar{c}_2 (1 - \gamma) - 2V_2\alpha H, \quad (14)$$

где D_2 — коэффициент диффузии растворенного вещества в жидкой фазе, $\bar{c}_1/\bar{c}_2 = \gamma(P_1, T_1)$ — коэффициент захвата (равновесный).

В случае чистого расплава граничное условие (14) принимает вид

$$\rho_1 N = [\alpha (\nabla T)_n] / \{ q + c_{p2}[T] \}. \quad (15)$$

В обоих соприкасающихся фазах процессы теплопроводности, диффузии и конвективного переноса массы описываются уравнениями неравновесной термодинамики [1, 3]. В случае чистого расплава часто ограничиваются решением уравнений теплопроводности в двух соприкасающихся фазах и использованием условия совместности (15) в упрощенном виде

$$[T] = 0, \quad \rho_1 N q = [\alpha (\Delta T)_n]. \quad (16)$$

Распадение условия (15) на два граничных условия (16) позволяет выразить температурные поля в обеих фазах через неизвестную функцию N .

Термодинамической движущей силой кристаллизации в линейном приближении является разность химических потенциалов кристалла и

маточной среды [7], т. е. $[\mu]$, а поверхностная кинетика описывается выражением

$$N = \beta[\mu]. \quad (17)$$

Как правило, например, в работах [2, 6] при кристаллизации чистых веществ за движущую силу роста принимают разность истинной температуры на границе раздела и равновесной температуры, а при кристаллизации из раствора — разность концентрации на границе раздела фаз и равновесной концентрации. При этом предполагают, что температура и давление при переходе через границу раздела изменяются непрерывным образом, а в случае раствора, кроме того, концентрация со стороны кристалла равновесна ($c_1 = \bar{c}_1$), так что

$$[\mu] = [s](T - T(P)) \quad (18)$$

в случае роста кристалла из однокомпонентной системы и

$$[\mu] = \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial c} \right) (c_2 - \bar{c}_2) \quad (19)$$

в случае роста кристалла из раствора. Однако нет оснований считать, что эти предположения справедливы всегда. В общем случае, который мы здесь рассматриваем, нарушение локального равновесия связано не только со скачком химического потенциала на границе раздела фаз, но и со скачками температуры, поэтому

$$N = \beta[\mu] = \beta \left\{ V_2[P] - s_2[T] + \frac{\partial \mu_1}{\partial c} (c_1 - \bar{c}_1) - \frac{\partial \mu_2}{\partial c} (c_2 - \bar{c}_2) \right\}. \quad (20)$$

При таком подходе к задаче о росте кристаллов, решение ее, конечно, значительно усложняется и оказывается одновременно связанным с решением задачи теплопроводности, а также задач диффузии и конвективного переноса массы. Задание поверхностной кинетики кристаллизации в совокупности с граничными условиями позволяет найти закон роста кристалла по заданным внешним условиям, линейному кинетическому коэффициенту β и физико-химическим характеристикам замораживаемой среды.

Кривые охлаждения. Морфологическая устойчивость кристаллов. Типичная термограмма охлаждения охлаждающего раствора имеет вид, показанный на рис. 1. Кривые изменения температуры консервируемых образцов — основной параметр, характеризующий режимы замораживания и отогрева в криобиологических исследованиях. Обычно величина температурного скачка $\Gamma-B$ интерпретируется как переохлаждение объекта до начала кристаллизации [5]. Это, однако, ошибочное заключение. Температурный скачок $B-\Gamma$ возникает при пересечении фронтом раздела фаз спая термопары или другого датчика температуры и определяется соответствующим распределением температуры в узкой области перед фронтом растущего кристалла и скачком температуры на самом фронте. Кристаллизация в неравномерно охлаждаемом образце практически всегда начинается с периферии, вдали от датчика температуры (расположенного, как правило, в центре пробы), что отражается на термограмме в виде плавного уменьшения скорости охлаждения в интервале $B-B$ (см. рис. 1), вследствие доходящего до термопары тепла, источником которого являются растущие кристаллы.

Термографические исследования кристаллизации водных растворов криофилактиков приводят к заключению, что величина температурного скачка на термограмме увеличивается с повышением концентрации растворов и с уменьшением скорости охлаждения на участке $A-B$.

Наличие на термограмме плато Γ — Δ не имеет пока теоретического объяснения. Для этого требуется применение аппарата неравновесной термодинамики, а язык равновесной термодинамики неадекватен и приводит, например, к таким абсурдным заключениям [5]: «Если при достижении точки замерзания температура некоторое время остается постоянной, образуя плато, то при этом сохраняется равновесие между жидкой фазой и образующимися кристалликами».

Микроскопическое изучение процессов кристаллизации водных растворов криофилактиков показало наличие двух интервалов кристал-

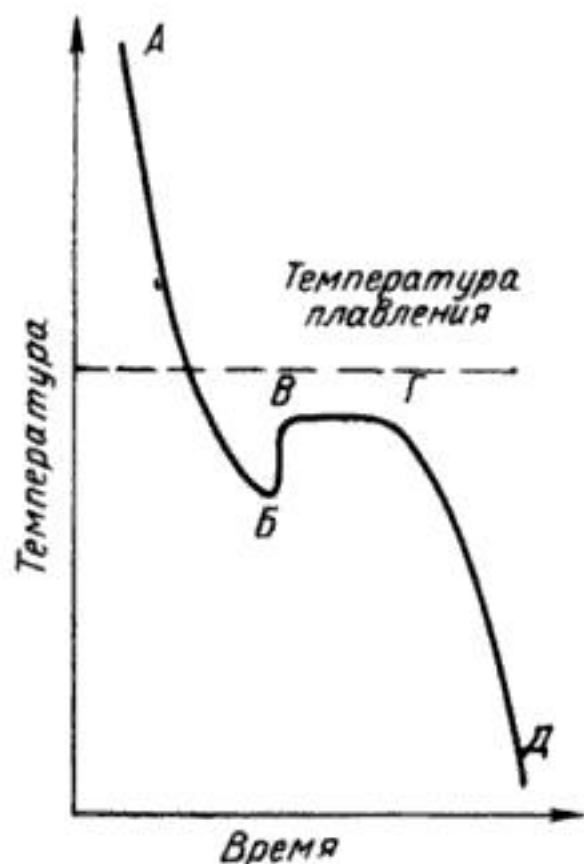


Рис. 1. Типичная термограмма охлаждения водного раствора.

AB — зона охлаждения; BB — температурный скачок; $ВГ$ — плато кристаллизации; $ГД$ — зона завершения кристаллизации.

лизации: 1) быстрого роста, соответствующего, по-видимому, участку $B—Г$; 2) относительно медленного роста ($\Gamma—\Delta$) (см. рис. 1). Как увеличение скорости охлаждения, так и увеличение исходной концентрации криофилактика уменьшает продолжительность плато.

Это краткое обсуждение показывает, что такие широко используемые в криобиологии понятия, как переохлаждение или плато, скорость охлаждения, определяемая по термограмме, и т. д. нуждаются в кардинальных уточнениях. В связи с этим возникает, в частности, задача определения зависимости температурного скачка на термограмме от условий охлаждения и свойств замораживаемого образца. Следствием решения этой задачи было бы выяснение, какая информация о кинетике кристаллизации заключена в начальном участке термограммы $A—B$.

Глубокий анализ морфологической устойчивости растущего кристалла проведен в работах ряда авторов [2, 6]. По Д. Кану, длина волны развивающегося искажения, определяющая ширину ветвей дендрита, под действием поля концентраций и поля температур уменьшается, а под влиянием кривизны поверхности раздела и кинетических явлений на этой поверхности увеличивается. Расстояние между ветвями дендрита ограничено снизу размером, при котором начинают перекрываться поля, окружающие соседние ветви.

Замороженный слой 10%-ного раствора полиэтиленоксида с молекулярным весом 100 отогревали. При плавлении устойчивыми оказывались формы кристаллов, близкие к дискообразным. Когда в поле зрения оставались единичные кристаллики (рис. 2) снова начинали охлаждение. Если охлаждение было быстрым, кристаллики становились центрами дендритного роста (рис. 3). При медленном охлаждении затравочные кристаллики росли медленно и форма их изменялась незначительно (рис. 4, 5). По мере увеличения размера кристалла на его поверхности появлялись выступы (рис. 6) и проявлялись черты дендритного роста. Если скорость охлаждения во время роста резко увеличивалась, с фронта исходного кристалла отрастали мелкоструктурные дендритные ответвления (рис. 7).

Вероятно, применение более общих, чем использовавшиеся до сих пор, динамических соотношений на движущейся границе раздела фаз при анализе роста кристаллов и их морфологической устойчивости позволит открыть новые закономерности в процессах фазового превращения, связанные с сохранением жизнеспособности клеток при низкотемпературной консервации клеточных суспензий.

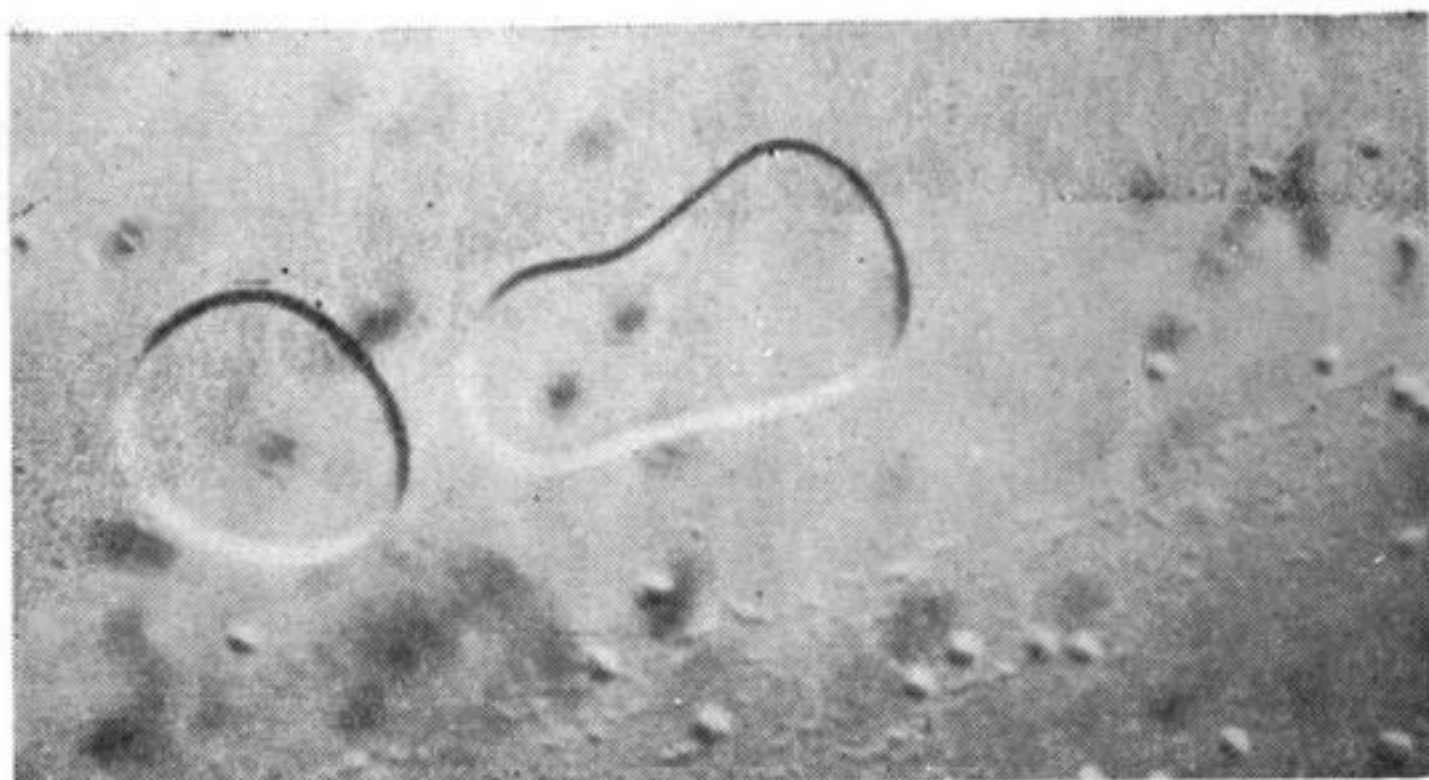


Рис. 2. Одиночные кристаллы льда, оставшиеся в поле зрения микроскопа при отогреве 5%-ного водного раствора ПЭО-400.

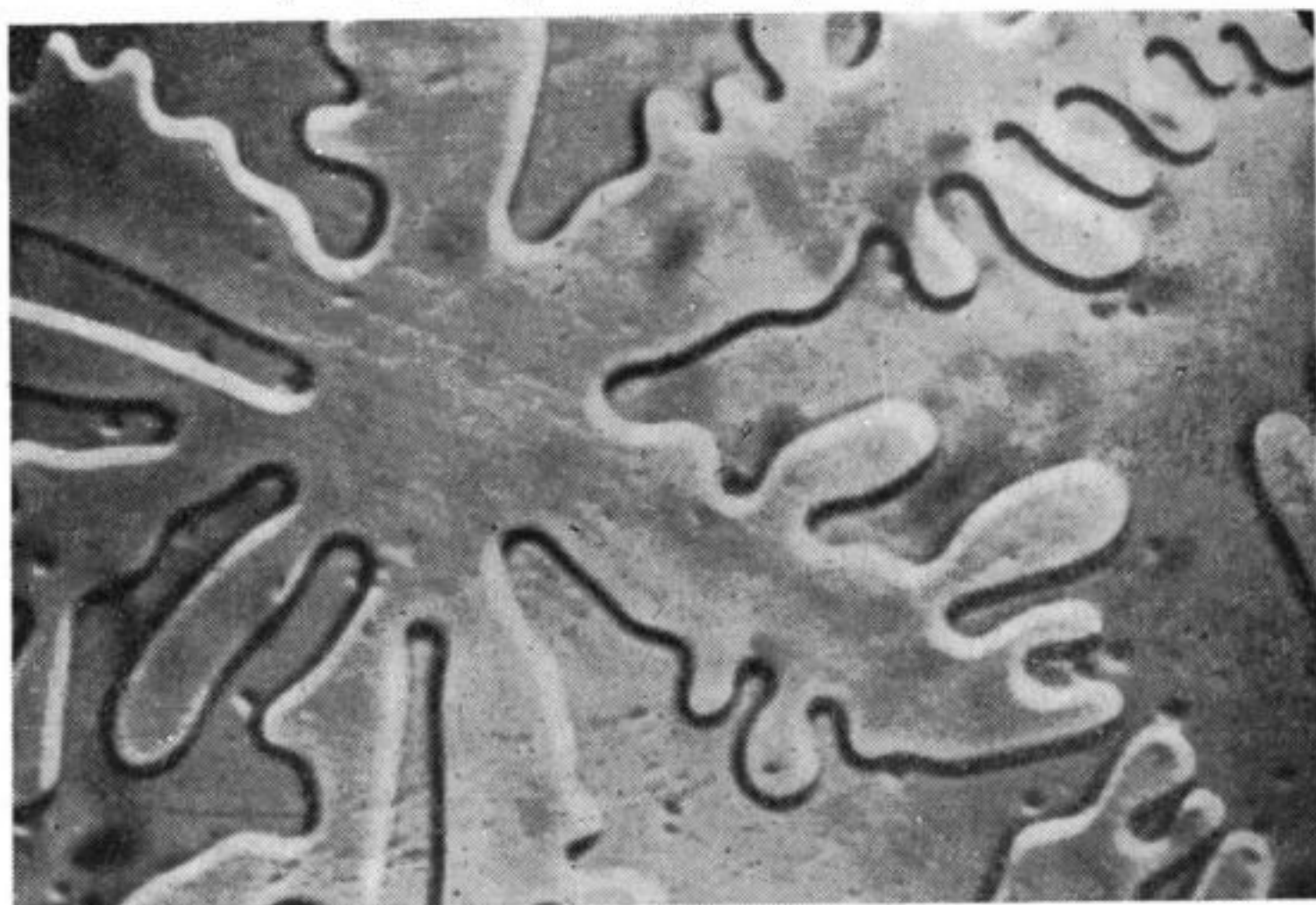


Рис. 3. Дендрит, образующийся при охлаждении 5%-ного водного раствора ПЭО-400 на затравочном кристаллике.

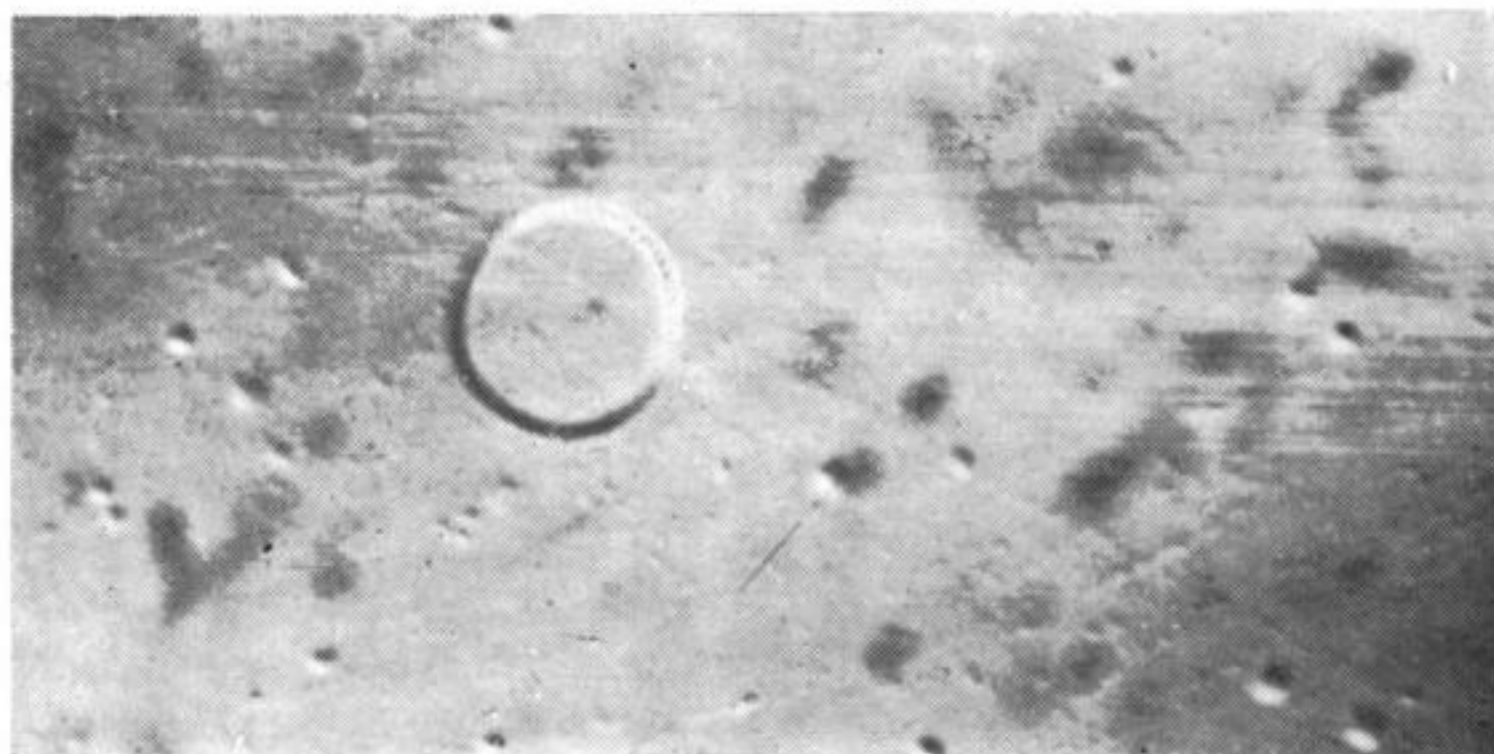


Рис. 4. Устойчивый (дискообразный) кристалл, растущий при медленном охлаждении 5%-ного водного раствора ПЭО-400.

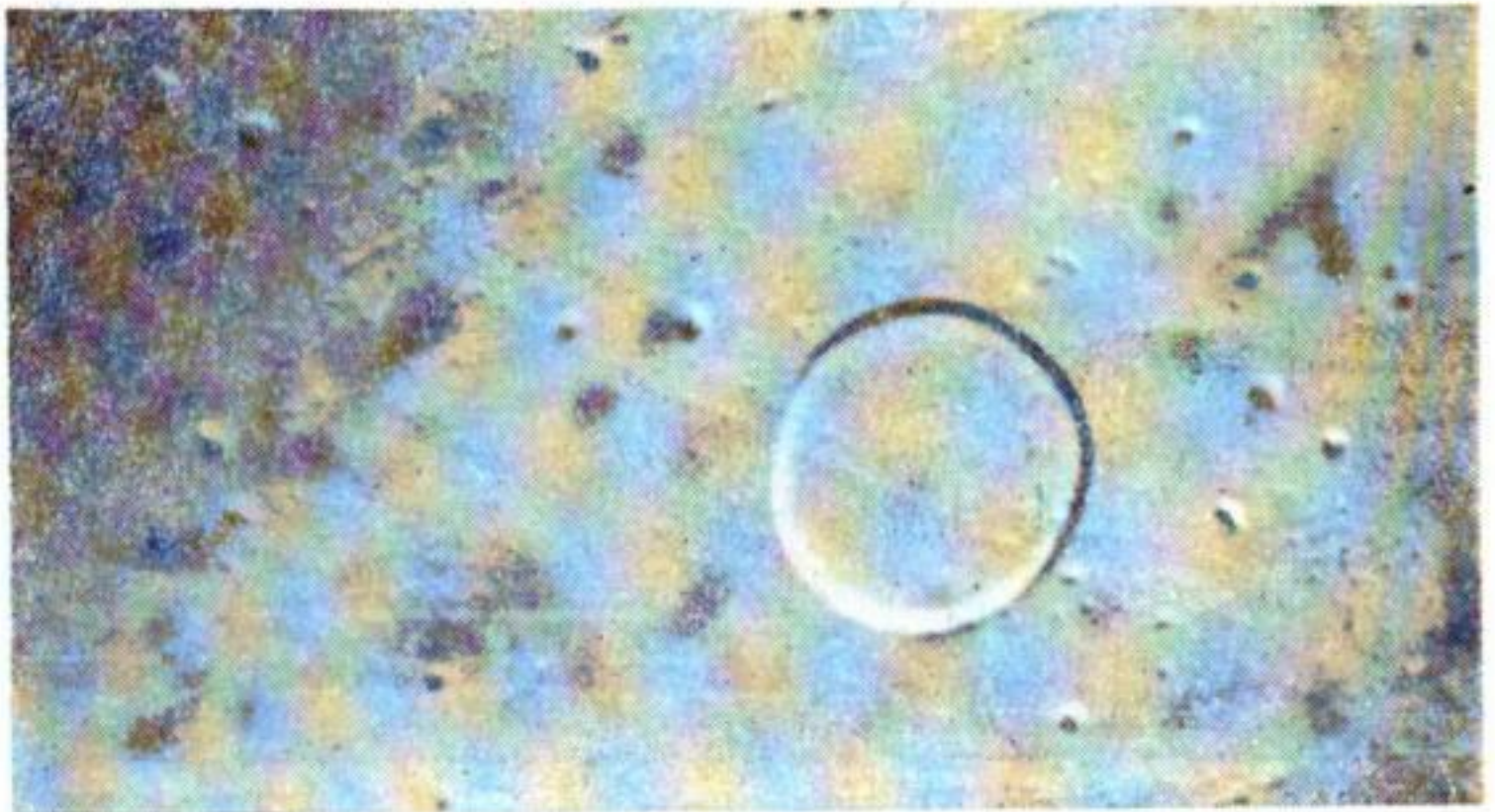


Рис. 5. Кристалл, растущий в 5%-ном водном растворе ПЭО-400 при медленном охлаждении.

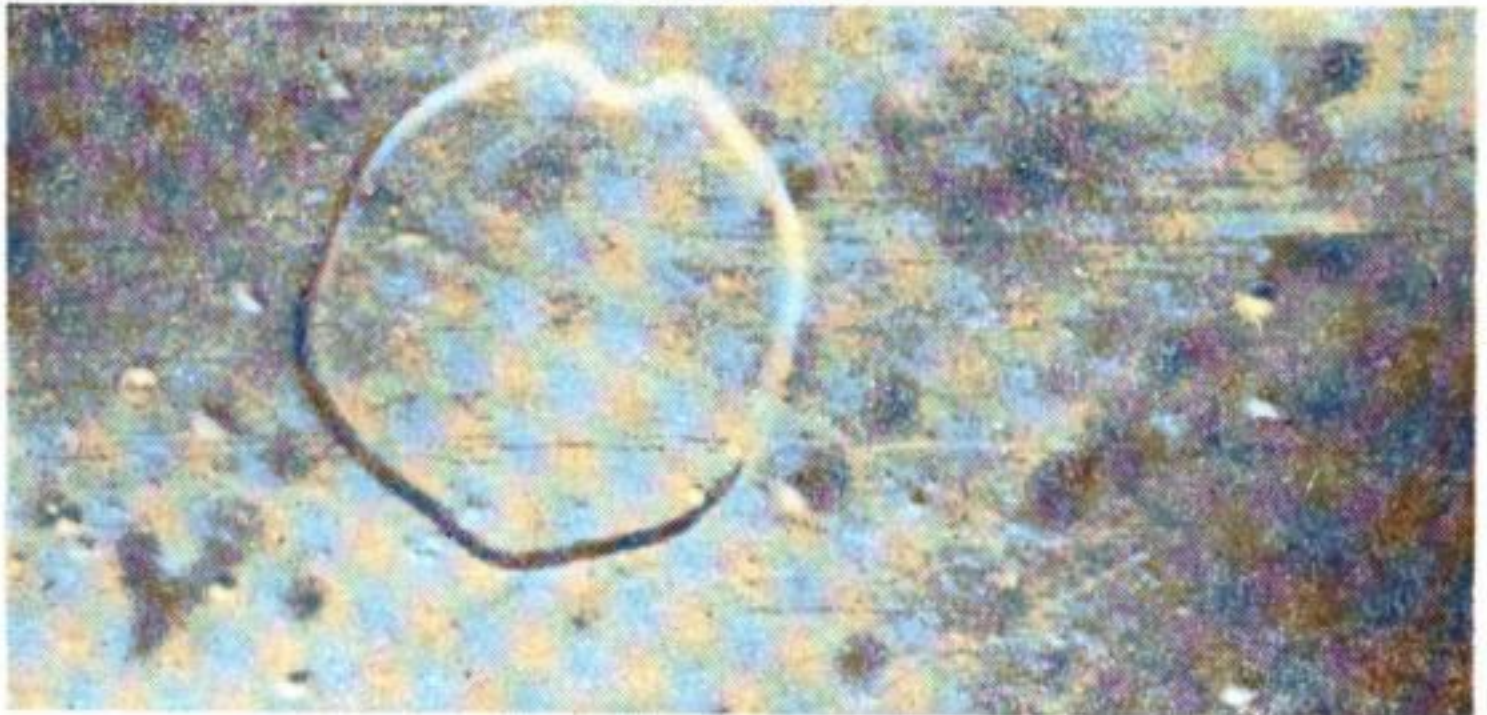


Рис. 6. Кристалл, теряющий устойчивость при медленном охлаждении 5%-ного водного раствора ПЭО-400.

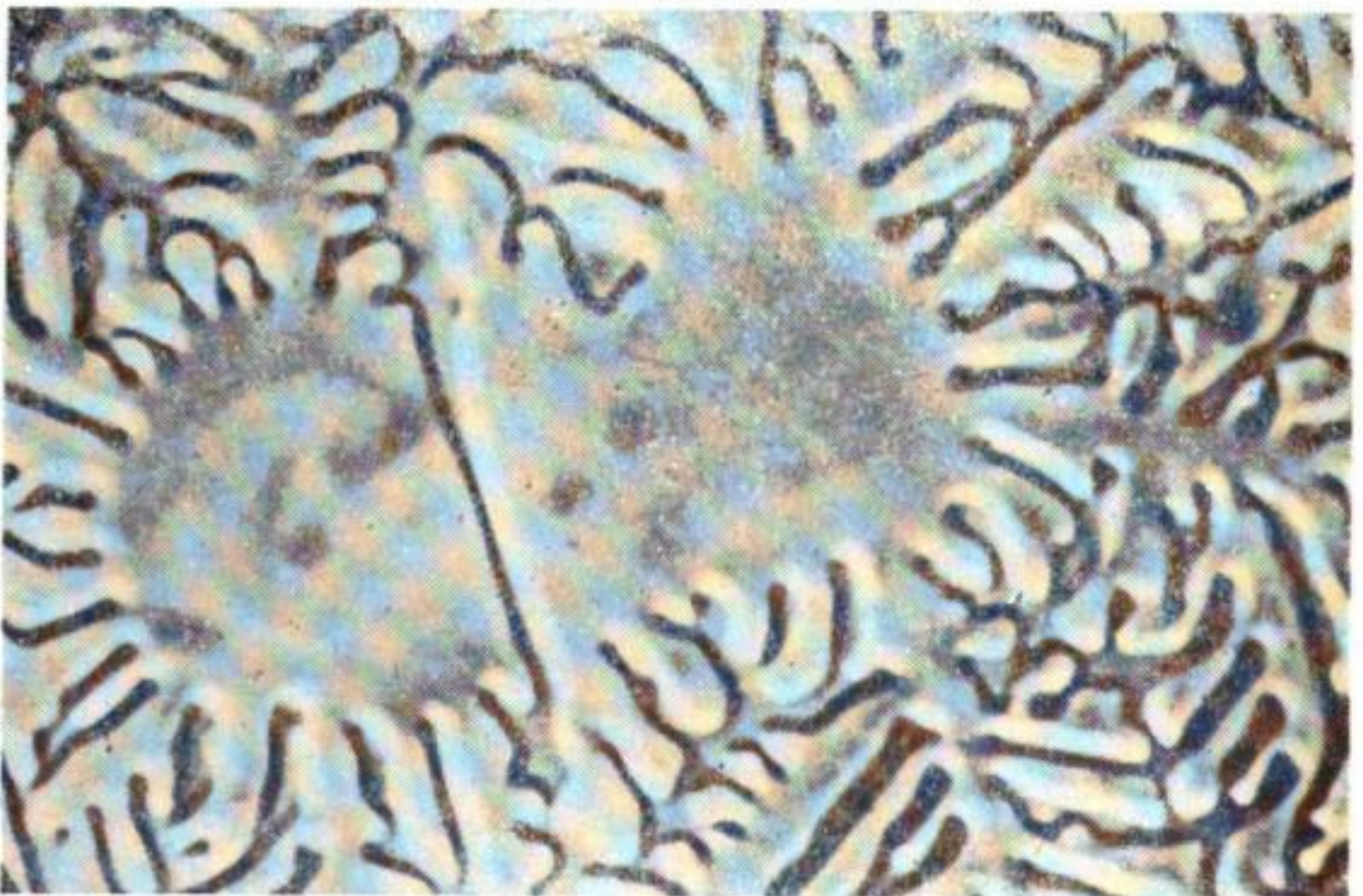


Рис. 7. Затравочные кристаллики и мелкоструктурные ответвления, возникающие при быстром охлаждении 5%-ного раствора ПЭО-400.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гроот де С. Р., Мазур П. Неравновесная термодинамика. М., «Мир», 1964.
2. Кан Д. О морфологической устойчивости растущего кристалла. — В кн.: Проблемы роста кристаллов. М., «Мир», 1968, 127.
3. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Механика сплошных сред. М., Гостехиздат, 1954.
4. Лихт М. К., Штейнберг В. А. О динамических соотношениях на движущейся границе раздела фаз. — Журн. прикладной механики и техн. физики, 1969, 3, 58.
5. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972.
6. Чернов А. А. Устойчивость роста анизотропных кристаллов. — Кристаллография, 1971, 16, 4, 842.
7. Чернов А. А., Любов Б. Я. О теории роста кристаллов. — В кн.: Рост кристаллов. М., «Наука», 1965, 100.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в январе 1975 г.

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Л. Г. Кулешова, В. А. Моисеев, Ю. А. Иткин

Равновесное состояние раствора при разных температурах, как известно, характеризуется кривой растворимости [1].

Теоретически при любом, даже очень незначительном, охлаждении раствора ниже температуры равновесия для данной концентрации должно начаться выделение твердой фазы. Однако экспериментально установлено, что охлаждение растворов может быть доведено без признаков кристаллизации до температур значительно более низких, чем по кривой растворимости, т. е. растворы склонны к температурному переохлаждению. Причем протяженность метастабильной фазы (область переохлаждения) зависит от химизма и строения системы, степени ее загрязненности, механического воздействия, скорости охлаждения и др. В органических веществах переохлаждению способствуют также группы ОН. Показано, что степень переохлаждения воды существенно зависит от предыстории жидкости и до перегрева порядка $+30^\circ$ пропорциональна предварительному перегреву [6]. Это объясняется тем, что в воде велико время релаксации — установления равновесия в данных условиях. Помимо теплового переохлаждения говорят о концентрационном переохлаждении, возникающем в результате увеличения концентрации примесей, ведущих к снижению температуры затвердевания.

Явление кристаллизации есть фазовый переход первого рода, характеризующийся скачком теплосодержания Q и обращением теплоемкости C в бесконечность. В результате изменения состояния системы можно получить характеристику энергии кристаллизации. Она может быть определена по упругости пара обеих фаз [6]:

$$A = RT \ln \frac{p'}{p},$$

где p' — давление пара надо льдом, p — давление пара переохлажденной воды. Для воды эта работа составляет $56,418 \text{ ккал/г} \cdot \text{моль}$.

Различают два типа кристаллизации: спонтанную (в объеме) и гетерогенную (на поверхностях). Важнейшим вопросом теории кристаллизации является вопрос о природе центров зарождения новой фазы. В основе современных теорий зарождения, флуктуационной и молекулярно-кинетической, лежит термодинамическая теория Гиббса. Гиббс (см. [6]) исходит из классического положения термодинамики, по которому изолированная система абсолютно устойчива, стабильна, если при постоянстве энергии системы любое конечное изменение ее

состояния не изменяет энтропию или уменьшает ее. Если энтропия возрастает, то система может быть лишь относительно устойчива (метастабильна). Такой системой является пересыщенный раствор, энтропия которого при кристаллизации возрастает на конечную величину. Как функция вероятностная, энтропия изолированной метастабильной системы испытывает непрерывный ряд малых беспорядочных изменений — флуктуаций, оставаясь меньше максимального значения, но близкой к нему. Соответственно параметры системы (концентрация, температура, давление) в отдельных ее частях не остаются постоянными, а колеблются около некоторых средних значений, отвечающих максимуму энтропии. Если такие флуктуации происходят при температурах, больших температуры плавления, то они термодинамически неустойчивы ($T > T_{пл}$). В противном случае ($T < T_{пл}$) они могут стать зародышами новой фазы. При этом вероятность возникновения зародышей в значительной степени определяется энергетическим фактором [5]

$$I = K e^{-\frac{A_k}{RT}},$$

где A_k — работа образования зародыша критического размера при данном переохлаждении, K — множитель, зависящий от продолжительности жизни зародыша, $A_k = \frac{B\sigma^3}{(\Delta T)^2}$; σ — поверхностное натяжение на границе кристалл — жидкость; ΔT — переохлаждение, T — температура; R — газовая постоянная.

Для того чтобы процесс кристаллизации был возможен, недостаточно наличия центров кристаллизации. Необходимо, чтобы подвижность атомов была достаточной для перехода из одной фазы в другую. Подвижность атомов характеризуется энергией активации U . Зависимость вероятности зарождения центров кристаллизации переохлажденной жидкости от подвижности атомов учитывается кинетическим

множителем $e^{-\frac{U}{RT}}$, введенным Я. Френкелем. Учет обоих факторов приводит к следующему выражению для частоты нуклеации:

$$I = K_1 e^{-\frac{U}{RT}} \cdot e^{-\frac{B_1 \sigma^3}{T(\Delta T)^2}}.$$

Аналогичное выражение флуктуационная теория дает для линейной скорости роста:

$$v = K_2 e^{-\frac{U}{RT}} \cdot e^{-\frac{B_2 \varkappa^2}{T\Delta T}},$$

где $\varkappa$ — граничная свободная энергия двумерного зародыша.

Очевидно, что величины I и v существенно зависят от природы кристаллизующейся жидкости (σ , U , $\varkappa$, $B_{1,2}$) и внешних условий (T). Отвод тепла является внешним условием, благодаря которому возможно зарождение и рост кристаллов.

Для флуктуационного зарождения центров требуются значительные переохлаждения, это связано с тем, что A_k в чистых веществах сравнительно велико и уменьшается с увеличением переохлаждения пропорционально $1/\Delta T^2$. Для воды температура спонтанного зародышеобразования лежит около -40° . Критический размер зародыша при этой температуре составляет $10 \text{ \AA}$, что соответствует флуктуации примерно из 100 молекул воды, в то время как при -1° для построения кристаллической решетки льда необходимо $4 \cdot 10^6$ молекул [8]. Работа A_k при -40° порядка $2 \cdot 10^{-14}$ эрг, что на порядок меньше, чем при -10° [7].

В реальных условиях кристаллизация всегда происходит при значительно меньших переохлаждениях из-за наличия примесей. Примеси делятся на растворимые и нерастворимые. Нерастворимые примеси являются готовыми центрами кристаллизации. Действие растворимых примесей определяется суммарным влиянием их на работу образования зародыша критического размера и энергию активации.

При низкотемпературной консервации клеток костного мозга, крови и другого биологического материала вводятся специальные криозащитные вещества, вносящие значительные изменения в связанные с охлаждением явления.

В настоящей работе исследовали особенности кристаллизации некоторых криопротекторов методом низкотемпературной рентгенографии, позволяющим получить качественную и количественную информацию о характере процесса.

Замораживание исследуемого образца и поддержание заданной температуры в течение съемки рентгенограмм производили парами жидкого азота в трубке специального устройства [2]. Температуру контролировали медь-константановой термопарой, теплый спай которой находился при 0° . Рассеянные рентгеновские лучи регистрировались при температуре -140° , напряжении анода 30 кВ, токе накала 400 мкА. Время экспозиции — 35 мин. При стандартных условиях съемки по изменению числа рефлексов на кольцах рентгенограммы (при отсутствии текстуры) можно судить об изменении числа отражающих частиц в облучаемом объеме, а следовательно, об изменении их размеров [3]. Число рефлексов на кольце рентгенограммы N_{HKL} прямо пропорционально площади облучаемого участка S , его толщине h , фактору повторяемости P , показывающему, с какой частотой встречается при хаотической ориентации плоскость с данными индексами, углу сходимости рентгеновских лучей β и обратно пропорционально среднему объему частиц V_0 .

$$N_{HKL} = \frac{P \cdot S \cdot h \cdot \beta \cos \theta}{2V_0},$$

отсюда, средний линейный размер равноостных зерен

$$L_0 = \sqrt[3]{\frac{P \cdot S \cdot h \cdot \beta \cos \theta}{2N_{HKL}}},$$

где $\beta = d/l$; d — размер диафрагмы, ограничивающий угол сходимости, l — расстояние от этой диафрагмы.

Изучено влияние разных концентраций (5, 10, 15 вес.%) криопротекторов (ПЭО-400, сахарозы, глицерина) на размер образующихся кристаллов льда. Охлаждение растворов велось по двум программам: со скоростью 1° в 1 мин с выдержкой на плато кристаллизации и далее со скоростью 100° в 1 мин (двухэтапная программа) и со скоростью 100° в 1 мин от комнатной температуры.

Полученные рентгенограммы свидетельствуют о том, что растворы кристаллизуются в поликристаллический лед гексагональной модификации. Вид рентгенограммы меняется в зависимости от концентрации и примесей. Для чистой воды, замороженной по двухэтапной программе, характерно хаотическое распределение рефлексов от зерен с размером 74,2 мк. С увеличением содержания криопротекторов кольца приобретают достаточно четкие границы, число рефлексов увеличивается, что указывает на измельчение структуры.

Как видно из таблицы, дисперсность структуры определяется не только концентрацией криопротектора, но и их типом, что, по-видимому, связано со структурными особенностями и физическими свойствами

вводимых примесей. Поскольку рассматриваемые примеси растворимы в жидкой фазе, их модифицирующее действие на кинетику процесса кристаллизации и структуру вещества, образующуюся в конечном состоянии, можно оценить из уравнения адсорбции Гиббса [4]

$$\Gamma = - \frac{c}{RT} \cdot \frac{d\sigma}{dc}$$

Здесь Γ — количество молекул примеси, адсорбирующихся на единицу поверхности.

Так как рост зародыша сопровождается вытеснением молекул примеси в жидкую фазу, то у его границ образуется слой с повышенной концентрацией примесей. Судьба этого слоя зависит от соотношения

Т а б л и ц а
Зависимость средних линейных размеров
(мк) кристаллов льда от вида
и концентрации криопротектора
(охлаждение по двухэтапной программе)

Криопротектор	Концентрация криопротектора, %		
	5	10	15
ПЭО-400	28,9	22,5	17,6
Сахароза	27,6	21,0	17,4
Глицерин	23,1	18,7	16,6

между скоростью отвода растворимых молекул и скоростью пополнения вследствие роста зародыша. При определенных значениях коэффициента диффузии и скорости роста зародыша распределение концентрации в граничном слое будет определяться поверхностной активностью растворенного вещества $\frac{d\sigma}{dc}$. При положительной активности $\left(\frac{d\sigma}{dc} > 0\right)$

энергетически выгодно удаление примесных молекул, а при отрицательной $\left(\frac{d\sigma}{dc} < 0\right)$ растворенные молекулы должны задерживаться у границ зародыша. При этом повышение концентрации примесей вблизи зародыша затрудняет поступление молекул основного вещества из материнской фазы в зародыш, что при одном и том же теплоотводе будет соответствовать, с одной стороны, увеличению вероятностного множителя $e \cdot \left(\frac{B_1 \sigma^3}{T \Delta T^2}\right)$, а с другой — увеличению энергии активации. В результате наложения двух факторов число зародышей, возникающих в единицу времени, возрастет, линейная же скорость их роста уменьшится, что приводит к измельчению структуры. Из анализа полученных экспериментальных данных можно заключить, что поверхностная активность криопротекторов как модификаторов процесса кристаллизации отрицательна.

В заключение отметим, что большие скорости охлаждения (100° в 1 мин) приводят к анизотропии роста кристаллов, т. е. имеются направления преимущественного роста, что отражается на рентгенограммах появлением уплотнений рефлексов. Рентгенограммы замороженных 100%-ных ПЭО-400 и глицерина соответствуют рассеянию рентгеновских лучей аморфными структурами, дающими диффузное гало с периодами 3,8 и 4,5 Å соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакли Г. Рост кристаллов. М., ИЛ., 1954.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Разумова Л. Л., Кудряшова С. Н. Применение рентгенографии для исследования замороженной крови. — Биофизика, 1960, 5, 2, 229.
3. Горелик С. С., Расторгуев Л. Н., Скаков Ю. А. Рентгенографический и электроннооптический анализ. М., «Металлургия», 1970.
4. Данилов В. И., Каменецкая Д. С. Влияние растворимых примесей на зарождение центров кристаллизации в переохлажденных жидкостях. — В кн.: Проблемы металловедения и физики металлов. М., «Металлургия», 1951, 3.

5. Каменецкая Д. С. О влиянии примесей на зарождение центров кристаллизации. — В кн.: Рост кристаллов. М., Изд-во АН СССР, 1957, 39.
6. Козлова О. Г. Рост и морфология кристаллов. М., Изд-во МГУ, 1972.
7. Розенталь О. М. О работе льдозарождения в воде. — Журн. структурной химии, 1965, 6, 4, 635.
8. Самыгин Г. А. Причины вымерзания растений. М., «Наука», 1974.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в январе 1975 г.

ВЛИЯНИЕ ОКСИЭТИЛИРОВАНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛИЦЕРИНА

*М. И. Шраго, Ю. В. Калугин, Г. Г. Кочуровская,
Н. М. Матвиец, В. А. Моисеев, А. Л. Марковский,
А. М. Воротилин, Л. В. Карева, Л. П. Бредихина*

Направленный синтез биологически активных веществ дает возможность создавать новые химические соединения с заданными свойствами, модифицируя исходные ингредиенты и условия взаимодействия.

Одним из способов направленного изменения физико-химических и биологических свойств глицерина является его оксиэтилирование. Продукты комбинированной полимеризации глицерина находят применение в качестве диспергирующих веществ наполнителей, растворителей и эмульгаторов [1].

Глицерин поступает в организм главным образом в виде различных эфиров жирных кислот и образуется в процессе межуточного обмена. Кроме того, он широко применяется в качестве составной части разных лекарственных композиций, вводимых энтерально и парэнтерально.

Биологическое действие глицерина активно изучали особенно в связи с его криопротекторными свойствами. Согласно данным Лавлока [2] и др., полученным в опытах с эритроцитами человека, глицерин — осмотически активное соединение, эндоосмос его в 4 раза превышает экзоосмос, он обладает способностью обезвоживать биологические структуры.

В настоящем сообщении показаны изменения некоторых физико-химических и биологических свойств глицерина под влиянием оксиэтилирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оксиэтилирование глицерина производилось колоночным и автоклавным методами в присутствии катализатора едкого калия. Получены полимергомологи оксиэтилированного глицерина (ОЭГ) с заданным молекулярным весом со степенью замещения 10, 20 и 30 оксиэтильных групп, имеющие общую химическую формулу $C_3H_5O_3(C_2H_4O)_nH_2$, где n — степень полимеризации.

Изучали следующие физико-химические показатели водных растворов ОЭГ: вязкость (вискозиметром Оствальда), поверхностное натяжение методом отрыва кольца на тензиометре Дю-Нуи, осмотическое давление криоскопическим методом, гидратационные свойства методами ультразвукового лоцирования в СВЧ-диэлектрметрии, диаграммы плавления. В биологических экспериментах оценивалось гемолизирующее действие ОЭГ на эритроциты консервированной крови человека в зависимости от степени его полимеризации.

При определении относительной вязкости значение $\eta_{отн.}$ для каждого гомолога с ростом его концентрации увеличивается. Для растворов низкой концентрации (1,5%) вязкость изменяется медленнее, чем для веществ более высокого молекулярного веса, для которых характерно падение вязкости в ряду ОЭГ молекулярных весов от 133 до 450, после

Относительная вязкость в ряду

Концентрация, %	Степень полимеризации				
	$n=1$	$n=2$	$n=4$	$n=5$	$n=6$
1	1,3040	1,5533	1,4985	1,5506	1,4580
5	1,4175	1,6659	1,7032	1,6605	1,5635
10	1,6011	1,9764	2,1060	1,9845	2,2464
15	1,9521	2,4381	2,5758	2,1168	2,7945
30	3,1690	4,3173	5,0329	4,7898	5,5539
60	19,3300	21,4300	24,7802	24,0000	29,2956
100	304,4000	293,7000	163,3000	160,5000	136,2000

чего отмечается повышение относительной вязкости до молекулярного веса 1400. Минимальной $\eta_{\text{отн.}}$ обладает полимер молекулярного веса 350 ($n=6$). Отмечено, что одни и те же значения $\eta_{\text{отн.}}$ для растворов все более высокого молекулярного веса достигаются при снижающихся концентрациях (табл. 1). Таким образом, показано, что оксиэтилирование глицерина изменяет относительную вязкость исходного вещества. Наблюдаемые аномалии вязкости, по-видимому, связаны с конформационными изменениями макромолекул.

Нам удалось также установить, что вследствие оксиэтилирования поверхностно-активные свойства глицерина несколько изменяются при введении первой оксиэтильной группы. В последующем, с ростом полимеризации, поверхностное натяжение водных растворов синтезированных олигомеров существенно не изменяется. Так, если поверхностное натяжение глицерина равно $63,01 \text{ эрг/см}^2$, то введение одного звена снижает его до величины $55,04 \text{ эрг/см}^2$, 5 звеньев окиси этилена — до $52,6 \text{ эрг/см}^2$, а 20 звеньев — до $50,67 \text{ эрг/см}^2$.

Таблица 2

Осмотическое давление глицерина и его оксиэтильных производных, осмол/л H_2O

Концентрация, %	Степень полимеризации ОЭГ							Глицерин
	$n=1$	$n=2$	$n=3$	$n=4$	$n=5$	$n=6$	$n=10$	
0,5	—	—	0,0350	0,0320	0,0240	0,0134	0,0172	0,0618
1	0,0970	0,0710	0,0578	0,0590	0,0480	0,0161	0,0360	0,1183
2	—	0,1410	0,1100	0,1020	0,0830	0,0873	0,0560	0,2365
5	0,4700	0,3770	0,2500	0,2400	0,2120	0,1990	0,1170	0,6560
10	0,8920	0,8300	0,5480	0,5380	0,4510	0,4750	0,3030	1,3700
15	1,4800	1,3800	0,9240	0,8870	0,7740	0,8060	0,5220	2,0700
20	2,1600	2,0870	1,4400	1,3620	1,1990	1,2940	0,8300	Не измер.
30	Не измер.	Не измер.	Не измер.	Не измер.	Не измер.	Не измер.	1,7120	Не измер.

Осмотическое давление является одним из важных критериев гомеостаза. Показатели осмотической резистентности биологических структур и их выносливость к перепадам осмотического давления учитываются при подборе перфузионных сред для изолированных органов, кровезаменителей, растворов для культуры тканей, микроорганизмов и других объектов.

Растворы глицерина гипертоничны, 15%-ная концентрация в 5 раз превышает изоосмотическую. Оксиэтилирование дает возможность понизить осмотическое давление исходного соединения (табл. 2). Это приобретенное качество подтверждается в условиях биологического эксперимента. Так, известно [3], что эритроциты консервированной крови человека переносят перепад осмотического давления в пределах 5 изоосмий и при перенесении клеток из 15%-ного раствора глицерина в среду 0,85%-ного хлористого натрия гемолизуются. То же наблюдается

Таблица 1

оксиэтилированных глицеринов, слэ

глицеринов

	$n=7$	$n=8$	$n=9$	$n=10$	$n=20$	$n=30$
	1,0395	—	1,0251	0,9945	1,0185	1,0206
	1,2663	1,0752	1,0962	1,0500	1,2705	1,3356
	1,3146	1,4847	1,1613	1,1991	1,6947	1,8417
	1,6863	—	—	1,6968	2,1105	3,7317
	2,9883	3,9144	3,8850	3,7330	5,3844	5,9346
	10,0600	23,1735	23,5326	19,1240	36,4000	56,2480
	142,8000	145,0000	134,0700	136,3200	165,5000	208,500

с растворами оксиэтилированного глицерина, имеющего 1, 2 и 3 оксиэтильных звена. Включение 5 оксиэтильных звеньев (ОЭГ $n=5$) и более настолько понижают осмотическое давление растворов соответствующих веществ, что при замене указанных растворов на изоосмотическую среду разрушения клеток не наблюдается.

Наконец, важным свойством глицерина является его способность связывать и структурировать воду. Оксигилирование оказывает влияние и на этот показатель. Методами ультразвукового лоцирования и СВЧ-диэлектрометрии установлено, что введение оксиэтильных групп повышает гидратационные свойства глицерина. Если 15%-ный водный раствор глицерина при 20° гидратирует 4 молекулы воды, то ОЭГ $n=5$ и $n=10$ «связывает» соответственно 14 и 21 молекулы воды в той же концентрации. Увеличение гидратации с ростом полимеризации, по-видимому, обусловлено накоплением в молекуле вещества эфирных атомов кислорода. Результаты этих экспериментов согласуются с данными по криоскопии водных растворов глицеринов. Сравнение диаграмм плавления показало, что у растворов глицерина температура замерзания значительно ниже, чем у растворов оксигилированного глицерина соответствующих концентраций. При 50%-ной концентрации разница в температуре замерзания растворов глицерина и его оксиэтильных производных составляет 10—15°.

Следовательно, оксигилирование изменяет физико-химические свойства глицерина, оказывая влияние на его биологические эффекты, что может иметь значение при использовании как глицерина, так и его производных в качестве ингредиентов биологически активных сред.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глузман М. Х., Башура Г. С., Цагарешвили Г. В. Поверхностно-активные вещества в фармации. Тбилиси, «Мецниереба», 1972.
2. Lovelock J. E. Physical in stability and thermal shock in red cells. — Nature, 1954, 4406, 659.
3. Meryman H. Cryoprotective agents. — Cryobiology, 1972, 9, 4, 262.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ И КРИОПРОТЕКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ in vitro и in situ

**В. В. Лемешко, В. А. Бондаренко,
Н. П. Суббота, А. М. Белоус**

Сохранение механизмов аккумуляции и трансформации энергии в клетке при замораживании-оттаивании — одно из основных условий обеспечения жизнеспособности биологических объектов после их

низкотемпературной консервации. Однако, как показано в ряде работ, основные энергопродуцирующие структуры клетки — митохондрии в значительной степени повреждаются замораживанием [5, 6]. Некоторыми авторами показана возможность уменьшения криповреждений митохондрий с помощью ДМСО и глицерина. В настоящей работе изучено влияние разных режимов замораживания изолированных митохондрий, срезов печени и коры почек крыс на сопряженность дыхания с синтезом АТФ и характер разобщения дыхания и фосфорилирования. Показана также принципиальная возможность сохранения основной функции митохондрий — синтеза АТФ после замораживания-оттаивания *in vitro* и *in situ* под защитой ПЭО-400 и ДМСО.

Опыты проводили с изолированными митохондриями печени, срезами печени и коры почки крыс. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования, осадок суспендировали в среде выделения: 0,3 М сахарозы, 10 мМ трис-НСI, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4. В опытах по изучению перекисного окисления липидов среда выделения не содержала ЭДТА, а митохондрии суспендировали в среде 105 мМ КСI. Для замораживания митохондрий под защитой ПЭО-400 последний добавляли к суспензии в виде 20%-ного раствора, приготовленного на среде выделения, после чего митохондрии выдерживали 1 ч на льду и затем замораживали.

Срезы почки толщиной 1,0—1,2 мм перед замораживанием инкубировали 30 мин в указанных ниже средах и замораживали. Срезы печени толщиной 1,0—1,2 мм, весом 500 мг замораживали в 1 мл среды выделения. Быстрому замораживанию и оттаиванию в настоящей работе соответствует скорость 300—400° в 1 мин, медленному — от 1 до 3° в 1 мин. Двухэтапное замораживание — сочетание медленного замораживания до конца плато термограммы, а затем быстрого до —196° со скоростью 300—400° в 1 мин.

Дыхание гомогенатов, полученных из срезов органов, и дыхание изолированных митохондрий регистрировали полярографически. О скорости перекисного окисления митохондриальных липидов судили по накоплению малонового диальдегида, выязляемого с помощью тиобарбитуровой кислоты [3]. Концентрацию белка митохондрий в суспензии определяли биуретовым методом.

Результаты замораживания-оттаивания суспензии изолированных митохондрий представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние разных режимов замораживания и быстрого оттаивания суспензии митохондрий печени крыс на величину их дыхательного контроля

Условия опыта	Наличие 10%-ного ПЭО-400 в среде	Дыхательный контроль с субстратами	
		Сукцинат	α -Кетоглутарат
Контроль	—	4,49±0,69 (5)	3,97±0,70 (5)
Медленное замораживание до —25°	—	1,26±0,07 (7)	1,23±0,26 (7)
	+	2,24±0,16 (8)	2,37±0,09 (8)
Быстрое одноэтапное замораживание до —196°	—	2,67±0,26 (5)	2,01±0,62 (5)
	+	2,51±0,12 (7)	2,35±0,35 (7)
Двухэтапное замораживание до —196°	—	2,89±0,21 (5)	2,47±0,29 (5)
	+	4,01±0,23 (8)	3,50±0,39 (8)

Примечание. В скобках — количество опытов.

Как известно, величина дыхательного контроля (ДК) отражает способность митохондрий синтезировать АТФ (за исключением специальных условий опыта). ДК=1,0 означает, что АТФ не накапливается. Как видно из приведенных в табл. 1 данных, при медленном замораживании уже до —25° митохондрии печени крыс практически полностью утрачивают способность синтезировать АТФ, поскольку ДК близок к единице. ПЭО-400 в 10 %-ной концентрации в значительной мере защищает митохондрии от повреждений при медленном замораживании, хотя такой же уровень их активности может быть достигнут при

быстром и двухэтапном замораживании органелл до -196° и без применения ПЭО-400. Более того, при быстром одноэтапном замораживании — быстром оттаивании — ПЭО-400 не обеспечивает дополнительной протекции. Двухэтапное замораживание суспензии митохондрий печени крыс до температуры жидкого азота наиболее эффективно для защиты этих органелл в присутствии ПЭО-400. Можно полагать, что

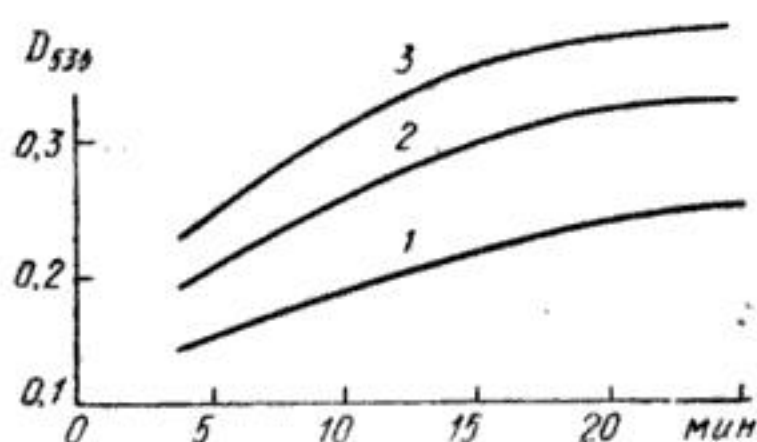


Рис. 1. Накопление малонового диальдегида в суспензии митохондрий в норме (1), после медленного замораживания-медленного оттаивания (3), медленного замораживания — быстрого оттаивания (2).

Реакционная среда: трис-HCl 50 мМ, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15,0 мкг в 1 мл. Температура 20–22°.

этот режим замораживания является оптимальным для указанного криопротектора.

В наших исследованиях установлено, что основной причиной разобщения дыхания и синтеза АТФ в митохондриях при замораживании-оттаивании является увеличение проницаемости внутренней мембраны для ионов H^+ . Поскольку это свойство мембраны удерживать градиент ионов водорода в значительной степени зависит от определенной упаковки белков и липидов мембраны, нами для характеристики белково-липидных взаимодействий была изучена способность мембраносвязанных липидов к перекисному окислению в присутствии Fe^{2+} . Согласно [4] в норме перекисное окисление липидов в митохондриях лимитируется так называемым структурным антиоксидантом, т.е. соответствующей упаковкой белков и липидов. Как видно из рис. 1, после замораживания-оттаивания суспензии митохондрий в солевой среде накопление продукта перекисного окисления — малонового диальдегида — происходит значительно быстрее, чем в нативных митохондриях. Эти данные позволяют полагать, что замораживание вызывает определенную лабильзацию мембран.

При одно- или двухэтапном замораживании срезов печени крыс и последующем быстром оттаивании наблюдалось практически полное разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования (рис. 2). В норме, как видно из рисунка, добавка разобщителя динитрофенола (ДНФ) вызывает почти 5-кратную активацию дыхания. После замораживания-оттаивания ДНФ не активирует дыхание, поскольку митохондрии уже «разобщены». Можно также отметить, что максимальная активность дыхательной цепи угнетена замораживанием незначительно

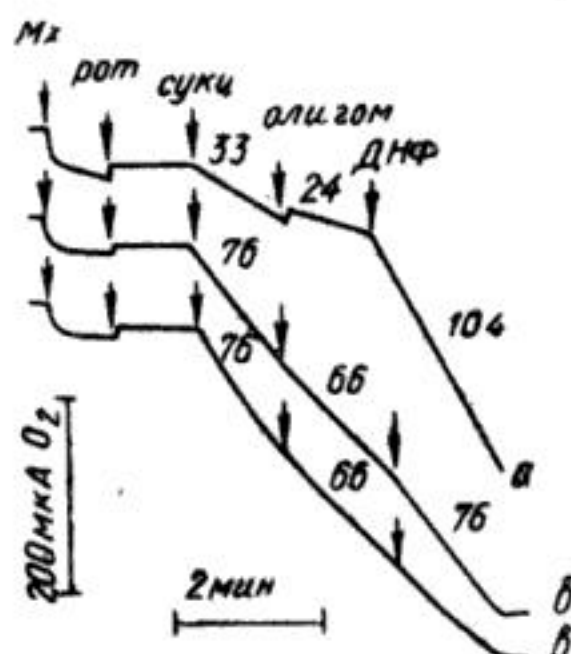


Рис. 2. Кинетика потребления кислорода митохондриями в гомогенате печени в норме (а), после двухэтапного (б) и быстрого одноэтапного (в) замораживания до -196° , быстрого оттаивания.

Реакционная среда: сахароза 0,25 М, KCl 20 мМ, KH_2PO_4 10 мМ, трис-HCl 20 мМ, pH 7,4. Добавки: митохондрии (Мх), ротенон (рот) 2 мкМ, сукцинат (сукц.) 8 мМ, олигомицин (олиг.) 2 мкг/мл, ДНФ 0,1 мМ.

и добавка экзогенного цитохрома С не увеличивает сукцинатоксидазную активность. Последнее свидетельствует о том, что сравнительно слабо связанный с мембраной дыхательный фермент цитохром С не диссоциирует из мембраны.

На рис. 3 приведены данные по изучению НАД-Н-оксидазной активности гомогенатов, полученных из срезов печени после их замораживания-оттаивания. Почти полное ингибирование окисления НАД-Н антимицином свидетельствует о митохондриальной природе НАД-Н-оксидазной активности, связанной с

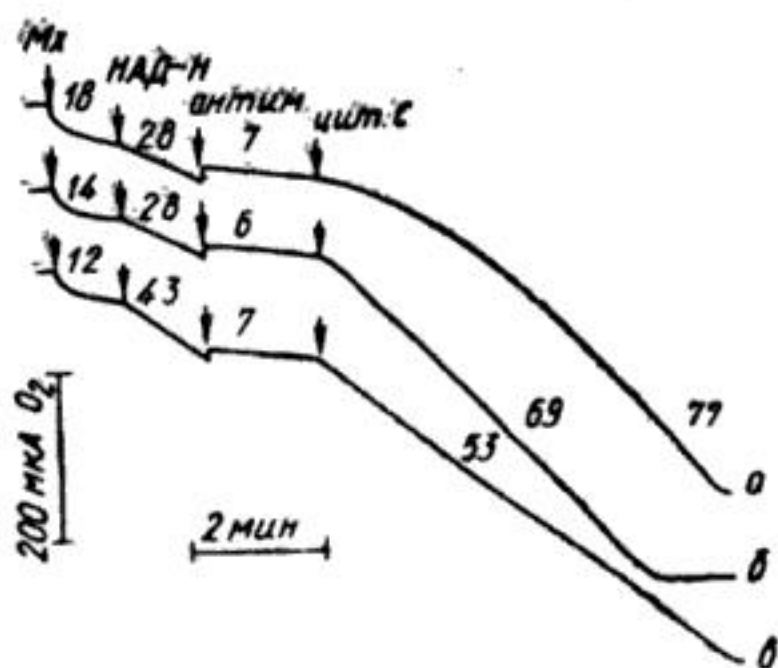


Рис. 3. НАД-Н-оксидазная активность митохондрий в гомогенате печени в норме (а), после двухэтапного (б) и быстрого одноэтапного (в) замораживания до -196° , быстрого оттаивания.

Реакционная среда, как и на рис. 2. Добавки: НАД-Н 2 мМ, антимицин (антим.) А 2 мкг/мл, цитохром (цитх.) С 30 мкМ.

с внутренней мембраной. При одноэтапном замораживании НАД-Н-оксидазная активность существенно возрастает, что, очевидно, связано с увеличением проницаемости внутренней мембраны для НАД-Н. Добавка ротенона и экзогенного цитохрома С переключает окисление НАД-Н на внешний путь окисления (т. е. через ферменты внешней мембраны). Интактная внешняя мембрана при этом непроницаема [7] либо плохо проницаема для цитохрома С, и поэтому активация окисления в ответ на добавку экзогенного цитохрома С происходит далеко не сразу (рис. 3а). После двухэтапного замораживания-оттаивания (рис. 3б) скорость окисления НАД-Н в ответ на добавку цитохрома С сразу же достигает максимальной величины. После одно-

этапного замораживания (рис. 3в) наблюдается также угнетение окисления НАД-Н по внешнему пути окисления. Последнее, возможно, связано с полным разрушением внешней мембраны митохондрий.

Исследование криозащитных свойств ДМСО, ПЭО-400 проведено нами также на срезах коры почки. Варианты опытов указаны в табл. 2. Установлено, что при замораживании срезов в фосфатном растворе Кребс-Рингера с ДМСО, ПЭО-100 и ПЭО-400 митохондрии полностью либо почти полностью утрачивают ДК. В среде Штенгольда [2] без гаммаоксимасляной кислоты (ГОМК), ДМСО в концентрации 10% обеспечивает почти полное сохранение ДК при быстром замораживании до -196° . ПЭО-100 сохраняет в значительной степени ДК с сукцинатом и совершенно неэффективен для защиты α -кетоглутаратоксидазы. Наши опыты свидетельствуют о том, что солевой состав среды имеет существенное значение для проявления защитного эффекта криопротекторов. Возможно, что Ca^{2+} , компонент среды Кребс-Рингера, при замораживании попадает в значительном количестве в клетки и вызывает специфическое разобщение митохондрий [1], однако этот вопрос подлежит отдельному выяснению.

Результаты проведенных исследований показывают, что замораживание вызывает глубокие повреждения митохондрий, что проявляется прежде всего в нарушении проницаемости мембран и, как следствие, в разобщении дыхания и фосфорилирования. При замораживании срезов наблюдаются более глубокие повреждения митохондрий, чем при замораживании изолированных органелл. В последнем случае сахарозная среда, в которой замораживали митохондрии, вероятно, обеспечивает частичную их криопротекцию.

Таблица 2

Влияние различных условий замораживания до -196°
и быстрого оттаивания срезов коры почки
на дыхательный контроль митохондрий
в гомогенате ткани

Условия опыта	Дыхательный контроль с субстратами	
	Сукцинат	α -Кетоглю- тарат
Контроль	2,28(9)	2,22(9)
<i>Одноэтапное быстрое замораживание</i>		
В среде Штенгольда (без ГОМК)	1,26(6)	1,0(3)
В среде Штенгольда (без ГОМК) с 10%-ным ДМСО	2,24(6)	2,08(4)
В фосфатном буфере Кребса-Рин- гера с 10%-ным ДМСО	1,23(6)	1,20(6)
В среде Штенгольда (без ГОМК) с 10%-ным ПЭО-100	1,80(4)	1,0(4)
<i>Двухэтапное замораживание</i>		
В фосфатном буфере Кребса-Рин- гера с 10%-ным ДМСО	1,30(4)	1,20(4)
В фосфатном буфере с 10%-ным ПЭО-100	1,00(4)	1,00(4)
В фосфатном буфере с 10%-ным ПЭО-400	1,00(4)	1,00(4)

ЛИТЕРАТУРА

1. Лейкин Ю. Н., Виноградов А. Д. О природе необратимой активации дыхания митохондрий, нагруженных кальцием в присутствии фосфата. — В кн.: Митохондрии. М., «Наука», 1973, 62.
2. Штенгольд Е. Ш. Консервация почек в эксперименте и клинике. Автореф. докт. дис. М., 1974.
3. Corwin L. M. Studies on peroxidation in vitamin E-deficient rat liver homogenates. — Arch. Biochem. Biophys., 1962, 97, 51.
4. Hanstein W. G., Hatefi J. Lipid oxidation in biological membranes. — Arch. Biochem. Biophys., 1970, 138, 87.
5. Porter V. S., Denning N. P., Wright R. C., Scotta E. M. Effects of freezing on particulate enzyme of rat liver. — J. Biol. Chem., 1953, 205, 883.
6. Roberts J. C., Arine R. M., Rahelle R. H. Effect of temperature on oxidative phosphorylation of liver mitochondria from hamster, rat and squirrel monkey. — Biochem. a. Physiol., 1972, B 41, 1, 127.
7. Wojtzak L., Sottocasa G. L. On the impermeability of the outer mitochondrial membrane to cytochrome C. II. Studies on isolated membrane fragments. — J. Membrane Biol., 1972, 7, 313.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в январе 1975 г.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ПЕЧЕНИ КРЫС

А. К. Гулевский

В ранее проведенных нами экспериментах [1] было показано, что замораживание-оттаивание тканей приводит к резкому снижению синтеза белков. Сходные данные получены [2] и в отношении клеток кост-

ного мозга. Объясняя их, мы предполагали, что обнаруженный эффект может быть обусловлен как гибелью клеток, так и непосредственным повреждением некоторых звеньев белоксинтезирующего аппарата. С целью проверки этого предположения в настоящей работе изучалась интенсивность биосинтеза белков в постмитохондриальном супернатанте (ПМС), выделенном из разных источников: замороженной ткани, гомогената, либо после замораживания-оттаивания самого ПМС, пропущенного через сефадекс $G=25$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Замораживание кусочков ткани печени осуществляли путем непосредственного погружения в азот. Замораживание гомогената и ПМС проводили со скоростью 200—400° в 1 мин, оттаивание — при 37°. После замораживания до -196° ткань гомогенизировали в 2,5 объема полисомного буфера: 0,25 М сахарозы, 0,025 М ККС, 0,05 М трис-НСI буфер, рН 7,5, 0,005 М $MgCl_2$. Гомогенат центрифугировали при 15 000 g 15 мин в рефрижераторной центрифуге при 0—4°. Постмитохондриальный супернатант использовали после пропускания через сефадекс $G=25$ в бесклеточной системе синтеза белка с конечной концентрацией реактивов: АТФ 1 мМ, ГТФ 0,1 мМ, КФ 10 мМ, КФ-киназа 16 мкн/мл, трис-НСI рН 7,5, 30 мМ, КСI 110 мМ, $MgCl_2$ 5 мМ, смесь немеченных аминокислот без лейцина по 0,04 мМ каждой, C^{14} -лейцин (ЧССР) по 0,1 мккюри на пробу. Радиоактивность проб, обработанных по [4], просчитывали на счетчике СЛ-40 (Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рис. 1, ПМС, выделенный из замороженной ткани, неактивен в отношении белкового синтеза после экспозиции гомогената, приготовленного из нее при 4° в течение 20 мин и сохраняет 50% активности при немедленном центрифугировании. Замораживание-оттаивание

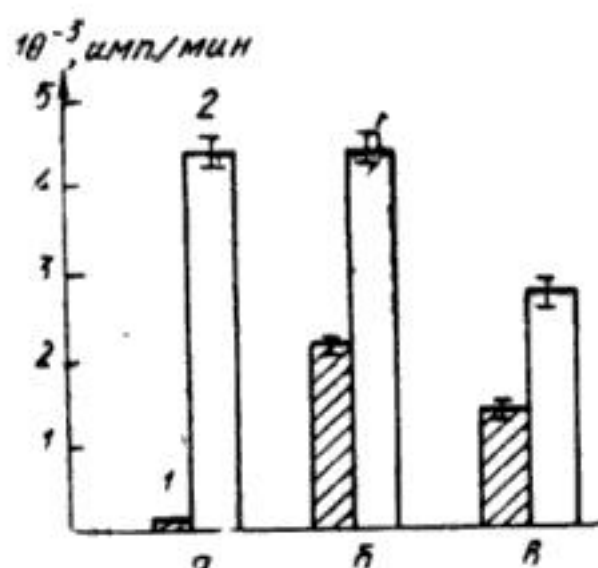


Рис. 1. Влияние быстрого замораживания-оттаивания ткани печени и гомогената на биосинтез белков в постмитохондриальном супернатанте:

1 — опыт; 2 — контроль; а — замораживание-оттаивание ткани с последующей экспозицией при 4° в течение 20 мин; б — замораживание-оттаивание гомогената; в — замораживание-оттаивание ткани и немедленное центрифугирование гомогената.

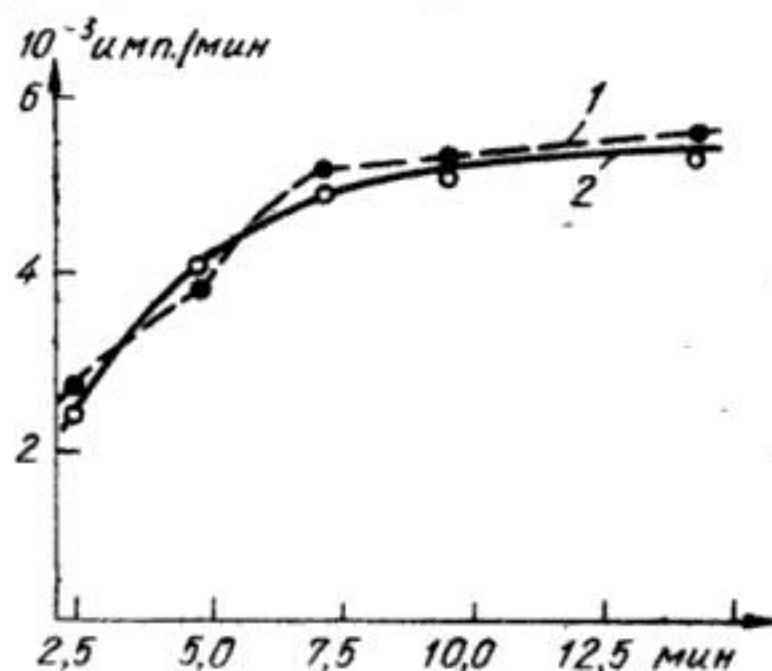


Рис. 2. Белоксинтезирующая активность постмитохондриального супернатанта после быстрого замораживания-оттаивания:

1 — опыт; 2 — контроль.

в белки бесклеточной системы (рис. 2).

Таким образом, факторы, ответственные за снижение белкового синтеза, присутствуют в органоидах, осаждаемых скоростным центрифугированием. Вероятнее всего, одним из них является рибонуклеаза, активация которой вследствие распада лизосом [5] приводит к деградации полисом, и, следовательно, к снижению белкового синтеза. В пользу этого предположения свидетельствуют данные Хигаши и Буха [5], которые обнаружили деградацию ядерной высокополимерной РНК,

выделенной из ткани, подвергнутой замораживанию-оттаиванию, в то время как РНК, выделенная из замороженных ядер, сохраняла свою полимерность.

Отсутствие изменений в уровне биосинтеза белков при замораживании-оттаивании ПМС свидетельствует об устойчивости всех ферментов и рибосом, принимающих участие в элонгации белковых цепей, к факторам быстрого замораживания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гулевский А. К., Переверзев Н. П., Белоус А. М. Влияние ультранизких температур (-196°C) на биосинтез суммарных белков в срезах внутренних органов в эксперименте. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974, 47.
2. Шнайдер В. Г. (Schneider W. G.). Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1970, 138.
3. Higashi K., Buch H. Preservation of rapidly synthesized ribonucleic acid of high molecular weight in frozen nuclei of rat liver. — Biochem. Biophys. Acta, 1965, 103, 3395.
4. Mosimann W., Furlan M., Beck E. A., Bucher U. Zellkonservierung durch Tiefkühlung. — Schweiz. Med. Wochenschr., 1972, 102, 1600.
5. Persidsky M. D., Ellett M. H. Lysosomes and cell cryoinjury. — Cryobiology, 1971, 8, 4, 345.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

НАШ ОПЫТ ЗАГОТОВКИ КОСТНОМОЗГОВОГО ТРАНСПЛАНТАТА ЧЕЛОВЕКА

*Б. С. Лакиза, И. А. Морозов, П. В. Комлик,
Ю. В. Кононов, Н. П. Трунов*

В настоящем сообщении представлены данные о некоторых организационных и научно-практических подходах к заготовке донорского и посмертного костного мозга в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и на Харьковской областной станции переливания крови МЗ УССР.

Под термином «заготовка» мы подразумеваем все этапы работы с костномозговым трансплантатом, от получения до выдачи его в клинику. Получение, фракционирование и подготовка костномозговых клеток к замораживанию осуществляется отделом заготовки трупных тканей и органов станции переливания крови, с которым в тесном сотрудничестве работает лаборатория низкотемпературного тканевого белка ИПКиК. Работа ведется круглосуточно, имеется специальный автотранспорт, в отделе оборудованы две операционные (одна для взятия костного мозга от доноров, другая — от трупов скоропостижно умерших) и боксы для манипуляций со стерильным костномозговым трансплантатом.

Заготовка костного мозга и создание его запасов прежде всего связаны с решением вопроса об источниках получения миелоидной ткани. Находящиеся под нашим наблюдением доноры костного мозга являются, как правило, и донорами крови. Разработана и внедрена в практику оригинальная индивидуальная карта донора костного мозга. Опыт работы показал, что 4-кратные миелоэксфузии костного мозга с интервалом не менее шести месяцев не отражаются на состоянии здоровья донора и полноценности миелотрансплантатов.

Нами проводится сравнительное изучение костного мозга, получаемого из разных костей, содержащих гемспоэтическую ткань. Разрабо-

тана оригинальная техника пункции с учетом морфологических особенностей грудины [3].

В ходе исследований сконструированы модифицированная игла для извлечения костного мозга и аппарат для эксфузии костного мозга. Рабочая часть иглы, в отличие от стандартных, выполнена в форме метчика [2].

Как известно, важное значение приобретает заготовка больших количеств биологически полноценной миелоидной ткани от трупов скоропостижно умерших людей.

В Харькове, в связи с удаленностью судебномедицинского морга от отдела заготовки трупных тканей и органов Областной станции переливания крови, для своевременной доставки трупов скоропостижно умерших людей выделены специализированная автомашина и штат обслуживающего персонала, закрепленные за судебномедицинским моргом. Этим транспортом можно доставлять трупы в отдел заготовки с места происшествия, обнаружения и осмотра судмедэкспертом, минуя морг или непосредственно из морга. В штат отдела заготовки включен судебномедицинский эксперт, который решает вопрос об изъятии материала для трансплантации. Он должен присутствовать при операциях, когда для заготовки тканей и органов необходимо вскрытие полостей трупа. Доставка трупов в морг после взятия органов осуществляется на специальной автомашине, закрепленной за отделом заготовки тканей и органов. В обязанность сотрудников станции скорой медицинской помощи также вменяется своевременная транспортировка трупов скоропостижно умерших людей в судебномедицинский морг или отдел заготовки. В работе отдела большое значение придается усовершенствованию и разработке эффективных методов получения посмертных костномозговых клеток.

Нами сконструирована замкнутая система для вымывания посмертного костного мозга, состоящая из инъекционной иглы, пневматического регулирующего устройства, приспособления для обеззараживания воздуха и емкостей для стабилизирующего раствора и костномозговой взвеси.

Известно, что метод вымывания с гидравлическим подпором эффективнее метода аспирации костномозговых клеток [2].

С целью получения максимального количества посмертной миелоидной ткани апробируется метод получения костного мозга из резецированных костей [1, 4]. Резекция грудины, ребер и тел позвонков производится с разрешения и в присутствии судмедэксперта. Кости освобождаются от мягких тканей, завсрачиваются в салфетки, смоченные физиологическим раствором с антибиотиками, и помещаются в холодильник. Составляется протокол операции, который направляется в бюро судебномедицинской экспертизы.

Костный мозг из резецированных костей извлекается фрагментационным, фрагментационно-компрессионным и компрессионным способами. Фрагментационный метод заключается в измельчении костей в емкость с консервирующим раствором (ЦОЛИПК-3) и вымыванием костного мозга посредством ручного встряхивания или вибрации. Фрагментационно-компрессионный способ наряду с фрагментацией и вымыванием включает компрессию отмытых костных фрагментов в изготовленном нами устройстве, которое состоит из гидравлического пресса и замкнутой системы, представленной камерой компрессии, соединительными трубками и емкостями для консервирующего раствора и костномозговой взвеси. Компрессионный способ с использованием указанного устройства применяется при получении костного мозга из тел позвонков без фрагментации. От одного трупа указанными способами можно получить до $100 \cdot 10^9$ ядродержащих клеток.

Фракционирование костного мозга в зависимости от метода получения производится посредством седиментации, центрифугирования или их комбинации во флаконах или в пластиковых мешках.

На этапах заготовки костного мозга подсчитывают количество ядросодержащих клеток, определяют их функциональную активность, морфологические особенности.

Нашими исследованиями подтверждены достоинства и недостатки обоих методов заготовки посмертного костного мозга. Преимуществом аспирационного метода является: сравнительная нетрудоемкость процесса, замкнутость системы, что позволяет при необходимости осуществлять заготовку трансплантата в малоприспособленных условиях; минимальная травматизация трупа, в связи с чем в момент эксфузий не требуется присутствие судебно-медицинского эксперта. Главный недостаток этого метода — значительное разбавление костного мозга периферической кровью. В этом отношении явные преимущества имеет метод заготовки костного мозга из резецированных костей. Он позволяет получать максимальное количество костномозговой взвеси от одного трупа, что особенно важно при заготовке миелотрансплантатов дефицитных групп крови. Несмотря на трудоемкость этого метода, при овладении определенными навыками и соблюдении правил асептики в условиях операционной он обеспечивает получение стерильного биологически полноценного костного мозга.

В ходе исследований обнаружено, что при компрессии фрагментов костей, из которых костный мозг был предварительно вымыт консервирующим раствором, можно дополнительно получить до 50% костномозговой взвеси со значительно меньшей примесью периферической крови.

Проведенные исследования позволяют прийти к выводу, что максимальное количество стерильного биологически полноценного посмертного костного мозга следует заготавливать комбинированным методом, который включает миелоэксфузию в замкнутой системе посредством пункции костей, резекция которых затруднительна (кости таза, отроки позвонков и др.), и извлечение костного мозга из резецированных костей фрагментационно-компрессионным способом.

Персонал отдела заготовки тканей и органов подготавливает костный мозг для низкотемпературного консервирования: концентрат ядерных клеток помещают в контейнеры, для защиты клеток прибавляют рабочий раствор полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) до 15%-ной конечной (объемной) концентрации. Герметично закрытые контейнеры и образцы костного мозга в ампулах для иммунологического подбора пар донор-реципиент направляются в банк крови и костного мозга.

Костный мозг замораживается по двухэтапной программе (до -13° со скоростью 1° в 1 мин; а затем до -196° — со скоростью около 200° в 1 мин) электронным устройством, изготовленным в Физико-техническом институте низких температур АН УССР. Одновременно с контейнером замораживаются ампулы для иммунологических проб в специальных кассетах. Контейнер и кассеты помещаются в переносной цилиндрический сосуд Дьюара с жидким азотом, а затем погружаются в хранилище биопрепаратов, где находятся в жидком азоте до размораживания.

Костный мозг для иммунологического подбора пар донор-реципиент и для трансфузии размораживается при температуре $+42^{\circ}$ в водяной бане, которая входит в комплект программной электронной установки. Время оттаивания зависит от величины контейнера и объема костномозговой взвеси. Размороженный костный мозг в специальном боксе переливают во флаконы через фильтр разовой системы для переливания крови и передают в отдел экспедиции станции.

Широкое внедрение в медицинскую практику трансплантации миелоидной ткани и необходимость удовлетворения растущих потребностей клиницистов в миелотрансплантатах обуславливает актуальность дальнейшей разработки как научно-практических, так и организационных аспектов заготовки и создания запасов костного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Медведев П. М., Фисанович Т. И., Раков А. А. К методике извлечения позвонков трупов в условиях операционной для получения костного мозга. — Пробл. гематол., 1972, 6, 60.
2. Морозов И. А., Пушкарь Н. С., Наконечный А. А., Безюк О. Н., Климко Н. А. О заготовке костного мозга. — Военно-мед. журн., 1972, 5, 70.
3. Морозов И. А., Сак Н. Н., Панков Е. Я. Морфологическое обоснование участков и техника получения костного мозга из грудины. — Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1973, 11, 103.
4. Спичарская Л. М., Мамышева Г. К. К вопросу о заготовке посмертного костного мозга из резецированных костей. — Пробл. гематол., 1970, 7, 19.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ФОСФОЛИПИДЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Э. И. Обозная, О. П. Маркова, И. А. Морозов

Целью настоящей работы явилось изучение содержания фосфолипидов в ядродержащих клетках костного мозга и крови, подвергшихся низкотемпературной консервации.

Фосфолипиды определяли в клетках донорского и посмертного костного мозга. Посмертный костный мозг получали у трупов людей в первые 4—6 ч после скоропостижной смерти. Как донорский, так и посмертный костный мозг, взятый на консервирующем растворе ЦО-ЛИПК-3, фракционировали и после 15—30-минутной экспозиции с полиэтиленоксидом молекулярного веса 400 (ПЭО-400) в 15%-ной конечной концентрации подвергали замораживанию по двухэтапной программе до -196° .

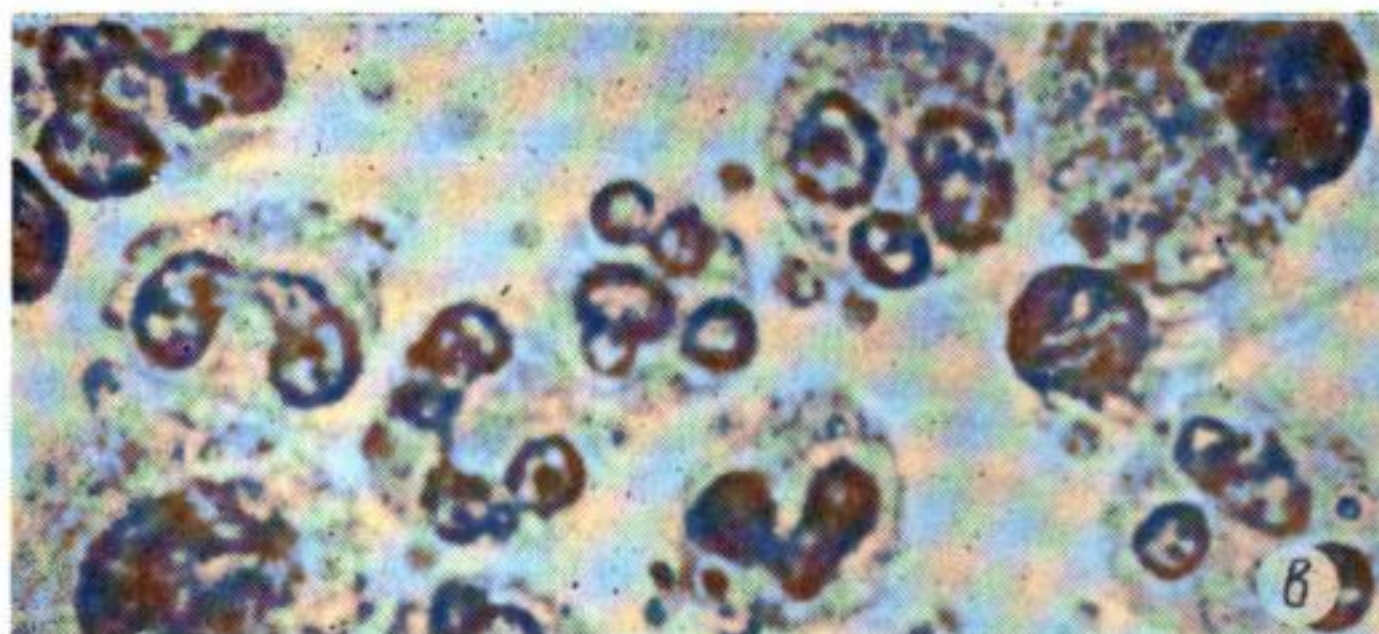
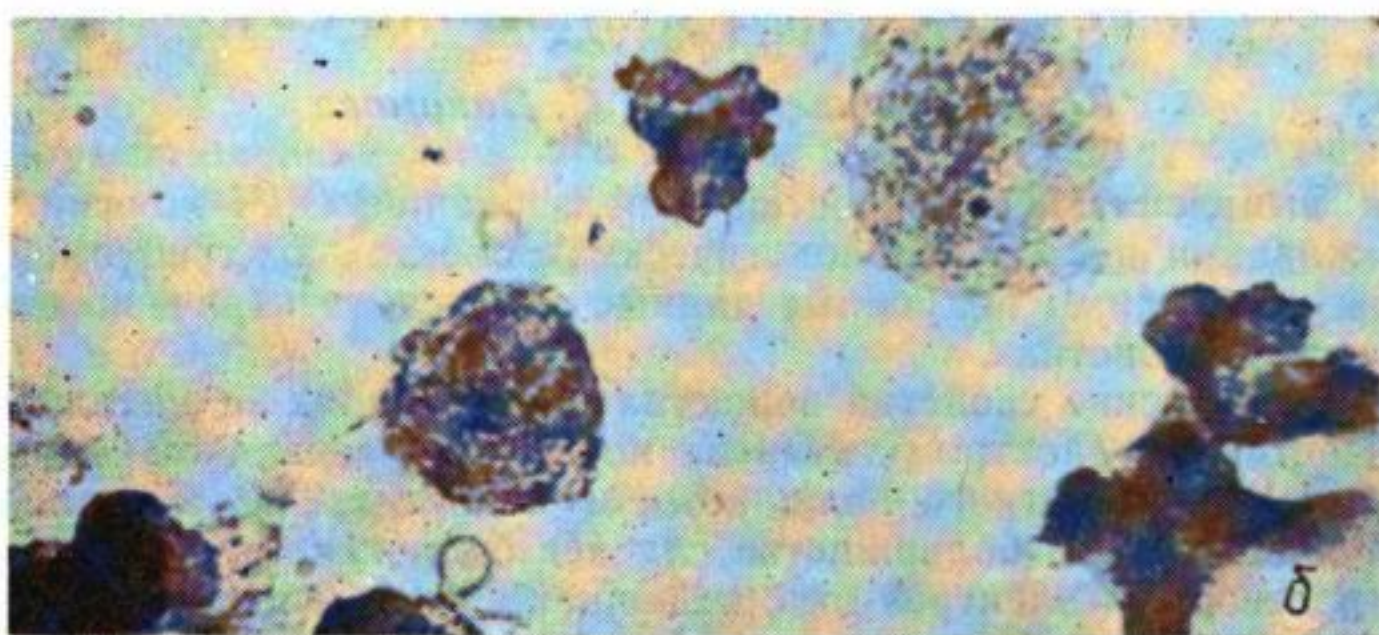
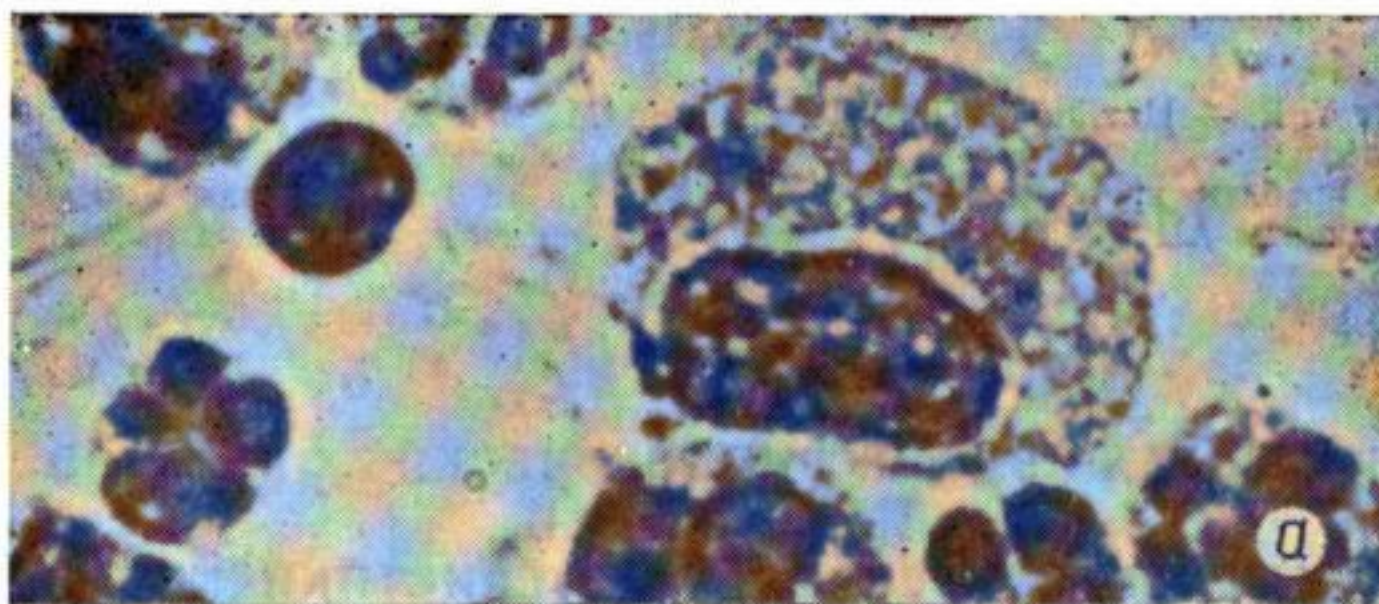
Нами изучены такие фосфолипиды, как лецитины, серинфосфатиды, а также ацетальфосфатиды, являющиеся компонентами цитохромоксидазной цепи переноса электронов.

Характерной особенностью ацетальфосфатидов является наличие в их молекуле альдегида жирной кислоты. Кроме того, для них специфична плазмалевая реакция, при которой альдегид жирной кислоты дает характерную реакцию с фуксинсернистой кислотой. Наиболее часто используемой реакцией на лецитины и серинфосфатиды является реакция Бэкер [1]. Она заключается в обработке материала бихроматом калия с последующим выявлением хрома гематоксилином.

При изучении ацетальфосфатидов в ядерных клетках костного мозга обнаружено, что в бластных клетках содержится незначительное количество плазмала. Средний гистохимический коэффициент (СГК) в бластных клетках донорского костного мозга равен $1,02 \pm 0,01$, посмертного — $1,00 \pm 0,02$; в миелоцитах СГК несколько выше: соответственно $3,02 \pm 0,02$ и $2,86 \pm 0,04$, в зрелых гранулоцитах — $2,16 \pm 0,32$ и $1,96 \pm 0,11$; в нормобластах — $3,03 \pm 0,03$ и $2,41 \pm 0,11$. После замораживания-оттаивания как в донорском, так и в посмертном костном мозге обнаружены лишь следы плазмала.

В отличие от ацетальфосфатидов, при выявлении лецитинов и серинфосфатидов обнаружено высокое содержание последних во всех

группах клеток (рисунок, а). После замораживания-оттаивания ядерных клеток костного мозга без добавления ПЭО-400 содержание фосфолипидов резко уменьшилось. На рисунке (б) можно видеть свободный выход фосфолипидов из клеток после их замораживания-оттаивания без предварительной защиты. После замораживания-оттаивания



Фосфолипиды (лецитины, серинфосфатиды) в клетках костного мозга до замораживания-оттаивания (а), после глубокого охлаждения без предварительной защиты (б) и после замораживания-оттаивания под защитой ПЭО-400 (в).

клеток костного мозга под защитой ПЭО-400 содержание фосфолипидов было несколько выше. Вместе с тем следует отметить, что при достаточно высокой жизнеспособности по эозиновой пробе (70—75%) содержание фосфолипидов низкое. И лишь при жизнеспособности ядерных клеток костного мозга после замораживания, составляющей 90—100%, содержание фосфолипидов не отличается от исходных проб (рисунок, в). Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности метода к действию низких температур.

Анализируя результаты исследования содержания фосфолипидов в ядерных клетках костного мозга, подвергшихся низкотемпературной консервации, можно сделать вывод о действии низких температур на цитохромоксидазную систему переноса электронов, включая ее компоненты — ацетальфосфатиды, лецитины и серинфосфатиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baker Y. R. — Цит. по Э. Пирс. Гистохимия. М., ИЛ, 1962.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СВЧ-ЭНЕРГИЕЙ.

1. ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРОВИ И ЕЕ ФРАКЦИЙ В ДИАПАЗОНЕ СВЧ

Ю. П. Тимошенко, И. С. Пахомова

Для выявления возможностей использования СВЧ-энергии * при размораживании и нагреве биологических объектов до требуемой температуры необходимы подробные данные об их диэлектрических и теплофизических свойствах.

Диэлектрические свойства вещества ответственны за механизм его взаимодействия с электромагнитным полем и определяют количество энергии электромагнитного поля, которое в процессе поглощения превращается в тепло. В большинстве случаев биологические объекты являются растворами электролитов, содержащими суспензии макромолекул разных форм и размеров.

Диэлектрические свойства крови в СВЧ-диапазоне частот (10^8 — 10^{10} гц) исследованы недостаточно. В литературе имеются ограниченные данные для крови и ее фракций при положительных температурах [4, 5, 6]. Сведений о диэлектрических характеристиках замороженной крови нет.

В настоящей работе проведены исследования частотной зависимости ϵ' и ϵ'' в области СВЧ-диапазона (10^8 — 10^{10} гц) донорской крови, стабилизированной глюкозно-цитратной средой ЦОЛИПК-7Б, плазмы, эритроцитов с добавлением глицерина и ядерных клеток с криопротектором ПЭО-400 в жидком (+25°) и замороженном (–25°) состояниях.

Для эритроцитов с 10%- и 20%-ной конечной концентрацией глицерина исследована температурная зависимость на частоте 9000 мгц.

Погрешность измерений действительной части (ϵ') порядка 5%, мнимой (ϵ'') — порядка 10%. Методика измерений и установка описаны в работе [1].

На рис. 1 представлена частотная зависимость ϵ' и ϵ'' при +25° для крови и ее компонент — экспериментальные точки. Для сравнения сплошной линией показана зависимость ϵ' от частоты для крови, по [6], и пунктирной линией — для плазмы крови, по [4]. Из рис. 1 видно, что в исследуемой области частотная зависимость ϵ' слабо выражена; это означает, что диэлектрический нагрев в этой области не носит «пикового» характера, и повышение скорости нагрева при одинаковом уровне

* Особенности нагрева биологических объектов СВЧ-энергией будут рассмотрены в сообщении III.

мощности пропорционально увеличению частоты источника СВЧ-колебаний. Средние значения ϵ'' монотонно возрастают от 10 в нижней границе исследованного диапазона до 20 в области 3000—6000 мГц, что обусловлено большим содержанием воды в образцах (около 80 вес. %).

Приняв для $f=2400$ мГц, $\epsilon''=15$, по формуле $\sigma=2\pi f\epsilon''\epsilon_0$, где σ удельная проводимость, ϵ_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума ($8,85 \cdot 10^{-12}$ ф/м), найдем для σ значение порядка 0,015 ом·см, что согласуется с результатами работы [4]. Это подтверждает сделанное



Рис. 1. Частотная зависимость ϵ' и ϵ'' при температуре $+25^\circ$:

X — кровь, + — плазма, O — лейкоциты, $\odot$ — эритроциты, Δ — лимфоциты. Сплошная кривая — для крови (по [6]), пунктирная — для плазмы (по [4]).

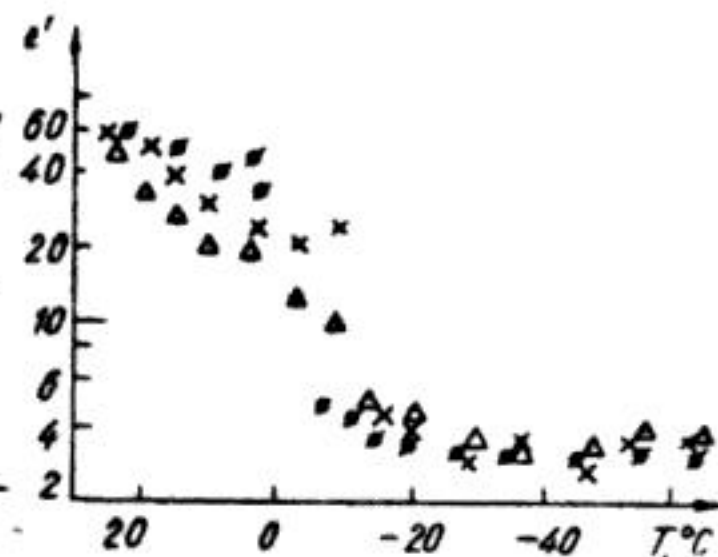


Рис. 2. Температурная зависимость ϵ' для эритроцитов на частоте 9000 мГц:

$\odot$ — эритроциты, X — эритроциты с 10%-ной конечной концентрацией глицерина, Δ — эритроциты с 20%-ной конечной концентрацией глицерина.

в работе [4] предположение, что величина ϵ'' для биологических объектов в этой области частот определяется потерями на ионную проводимость.

Исследование водных растворов криопротекторов (глицерин, ДМСО, ПВП, ПЭО-400) при температуре $+25^\circ$ показало слабую частотную зависимость. Величины ϵ' для 10%-ного раствора глицерина и 10%-ного раствора ДМСО близки ($\epsilon'=76$) и несколько выше значений ϵ' растворов ПВП и ПЭО-400 ($\epsilon'=70$). Значения ϵ'' исследованных растворов криопротекторов практически одинаковы для всех криопротекторов и возрастают от 5—6 при 500 мГц до 20—25 при 7000 мГц.

Частотная зависимость растворов криопротекторов аналогична зависимости ϵ'' для фракций крови, что подтверждает предположение о преимущественном вкладе ионной проводимости в диэлектрические потери и проводимость. Так как диэлектрическая проницаемость и проводимость воды в этой области частот значительно выше, чем остальных составляющих, то потери электромагнитной энергии в разогреваемом веществе на частотах — 433, 915 и 24000 мГц будут определяться в основном водой.

Присутствие криопротектора оказывает существенное влияние на диэлектрические свойства в зоне фазового перехода. Из рис. 3 видно, что при переходе из кристаллического состояния (-30°) в жидкое происходит резкое изменение диэлектрической проницаемости, что связано с изменением вязкости раствора. Характер температурной зависимости ϵ' определяется процентным содержанием криопротектора и скоростью охлаждения — параметрами, обуславливающими кристаллическую структуру вещества [2]. Увеличение концентрации глицерина расширяет температурную область, в которой возможно существование различных структурных состояний, и сглаживает максимум диэлектрической проницаемости, что уменьшает вероятность появления участков локального перегрева при СВЧ-размораживании.

Значения ϵ' и ϵ'' крови и ее компонент в замороженном состоянии при -25° приведены на рис. 3. Как и для льда, ϵ' крови и ее фракций имеет слабо выраженную частотную зависимость. Значения ϵ' крови значительно выше, чем льда, что объясняется наличием в структуре замороженных биологических объектов насыщенных растворов солей, не замерзающих вплоть до -40° .

Величина ϵ'' убывает с возрастанием частоты. Абсолютное значение ϵ'' крови лежит между ϵ'' льда и ϵ'' замороженной мышечной ткани при той же температуре [3]. Значение ϵ'' для крови при -25° в 100—

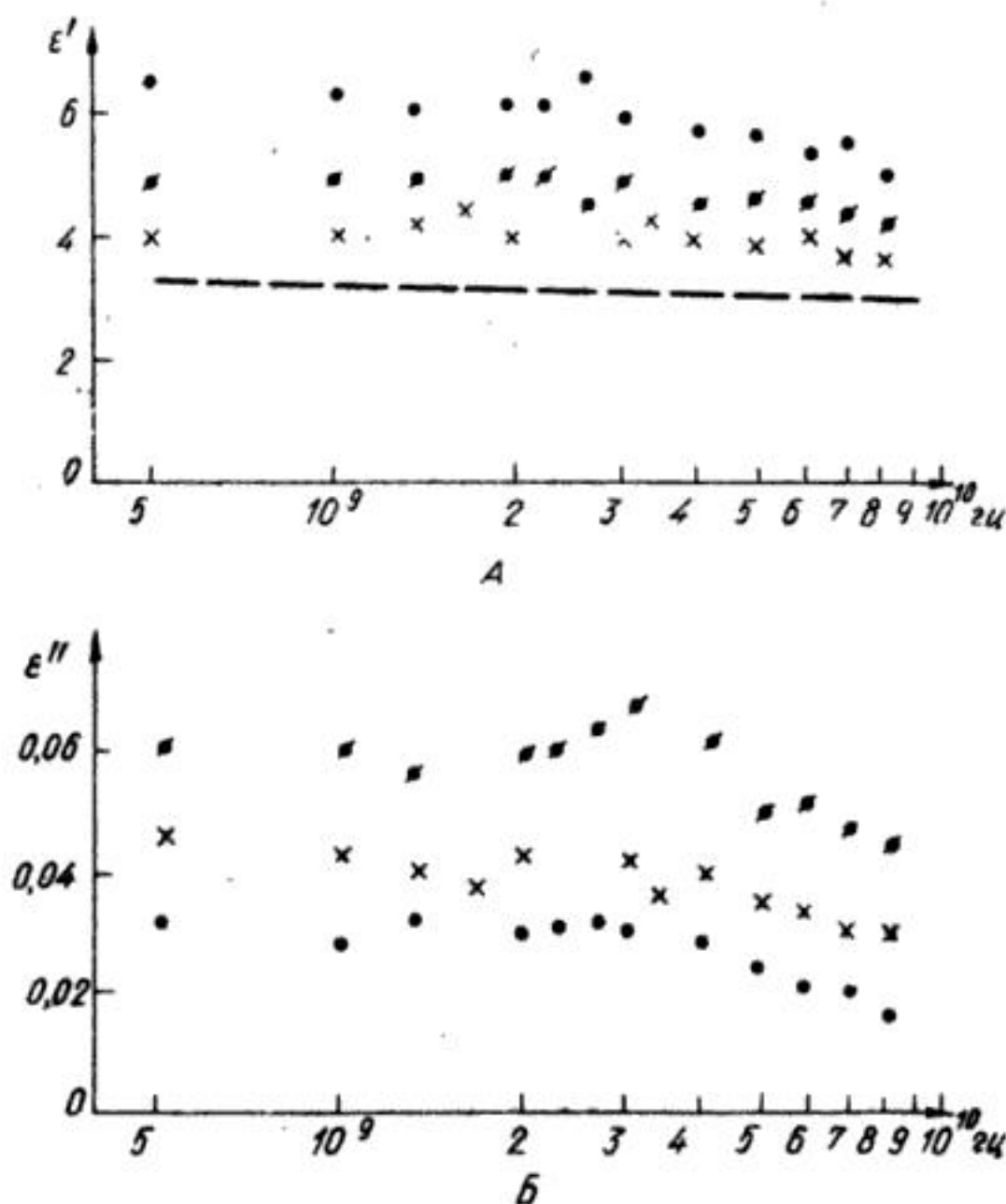


Рис. 3. Частотная зависимость ϵ' (А) и ϵ'' (Б) при температуре -25° :

X — кровь, □ — эритроциты с 10%-ной конечной концентрацией глицерина, ○ — лейкоциты с 10%-ной конечной концентрацией ПЭО-400. Пунктирная кривая — для льда (по [7]).

5000 раз меньше, чем при $+25^\circ$. Резкое различие диэлектрических свойств жидкой и твердой фаз служит основной причиной возникновения локальных перегревов при прохождении области фазового перехода в процессе СВЧ-размораживания.

Измеренные диэлектрические характеристики необходимы при разработке режимов контролируемых процессов размораживания, расчете частоты, мощности источника СВЧ-колебаний и камер нагрева, для определения глубины проникновения СВЧ-поля в разогреваемый объект.

Имеющиеся сведения дают возможность провести эксперименты по оптимизации процесса СВЧ-размораживания

ЛИТЕРАТУРА

1. Буртовой Д. П., Тимошенко Ю. П., Матушкин Н. И. СВЧ-установка для измерения ϵ' и ϵ'' биообъектов в диапазоне частот и температур. — В кн.: Радиотехника, 1976 (в печати).
2. Рэ Л. Консервирование жизни холодом. М., Медгиз, 1962.
3. СВЧ-энергетика, 2, М., «Мир», 1971.

4. Cook H. F. Comparison of the dielectric behavior of pure water and human blood at microwave frequencies. — Brit. J. Appl. Physiol., 1952, 3, 249.
5. Rajevsky B., Schwan H. B. Die Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit des Blutes bei ultrahohen Frequenzen. — Naturwiss., 1948, 36, 315.
6. Schwan H. B. Dielectrical properties of body tissue. — Adv. Biol. Med. Physiol., 1957, 5, 147.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СВЧ-ЭНЕРГИЕЙ.

II. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ ПРИ ЕЕ РАЗМОРАЖИВАНИИ

Ю. П. Тимошенко, И. И. Гаврилова

В процессе восстановления биологических объектов, консервированных низкими температурами, определяющим параметром является скорость нагрева. Для обеспечения заданной программы нагрева необходимо знание термодинамических свойств вещества, ответственных за поглощение теплоты и ее распределение по объему. Зависимость этих свойств от температуры существенно сказывается на ходе процесса размораживания, поэтому становится понятной необходимость изучения температурной зависимости теплоемкости и теплопроводности.

Исследование температурной зависимости теплоемкости проводилось методом дифференциально-сканирующей микрокалориметрии. Методика предполагает сканирование исследуемого и эталонного образцов, теплоемкость которых известна и линейна в исследуемом температурном диапазоне. Удельная теплоемкость определяется по формуле

$$C_p = \frac{A_m}{A_{m\text{эт}}} \cdot \frac{P}{P_{\text{эт}}} \cdot C_{p\text{эт}},$$

где A_m , $A_{m\text{эт}}$ — амплитуда отклонения регистрируемой величины тепловой мощности, необходимой для поддержания идентичной температуры эталона и образца; P , $P_{\text{эт}}$ — вес образца и эталона соответственно; $C_{p\text{эт}}$ — удельная теплоемкость эталона, в качестве которого был использован сапфир. Точность определения C_p составляет 2—5%.

Для исследований была взята лейкомаасса, приготовленная из донорской крови и замороженная по программе, описанной в работе [4]. Нагрев образца производился со скоростью $0,5^\circ$ в 1 мин.

Зависимость теплоемкости от температуры представлена на рис. 1. Результаты исследований показывают, что в интервале температур 0° — 40° теплоемкость крови является слабой функцией от температуры и для расчета процесса размораживания может быть принята как постоянная величина $0,83 \text{ кал/г} \cdot \text{град}$. Как видно из рис. 1 (верхняя кривая), в твердом состоянии теплоемкость линейно возрастает примерно на $10^{-3} \text{ кал/г} \cdot \text{град}$. При повышении температуры выше точки эвтектики -21° появляются отклонения от этой зависимости — так называемый эффект предплавления. Резкое изменение теплоемкости крови происходит в интервале температур от -3 до 0° , что связано с плавлением льда. Вместе с тем, как видно из рис. 1 (нижняя кривая), точка появления жидкой фазы (-40°) и ход температурной зависимости теплоемкости в зоне фазовых превращений существенно зависят от присутствия протектора в суспензии клеток.

Кровь можно рассматривать как смесь солей, протеинов, жиров и воды. Если предположить, что коэффициент активности каждого ком-

понента не зависит от температуры, то теплоемкость смеси при постоянном составе можно представить как сумму $C_p = \sum_i C_{pi} N_i$, где C_{pi} — парциальная мольная стандартная теплоемкость, значение которой не зависит от состава смеси; N — число молей компонента. Если предположить, что в крови по весу вода составляет около 80%, экспериментальные данные хорошо согласуются с исследованиями, проведенными ранее [2].

В области фазовых превращений кровь представляет собой гетерогенную систему, теплоемкость которой в общем случае может быть пред-

ставлена как сумма большого числа независимых друг от друга удельных теплоемкос-

тей $C_p = \sum_i C_{pi} \rho_i dV$, где

ρ_i — плотность компонента. Оценить вклады отдельных составляющих для такой сложной системы, как кровь, затруднительно, особенно, если повышение температуры происходит с определенной скоростью. Это вызывает нарушение взаимного равновесия сосуществующих фаз, изменение концентрации отдельных

компонентов в фазе, поэтому предпочтительнее для каждого конкретного случая пользоваться экспериментальными данными.

Определение температурной зависимости теплопроводности проводилось методом шарового слоя [3]. В процессе эксперимента определялся тепловой поток и перепад температур в слое. Коэффициент тепло-

проводности рассчитывали по формуле $\lambda = \frac{Q}{\Delta T} K$, где Q — тепловой поток; ΔT — перепад температур в слое; K — коэффициент формы в слу-

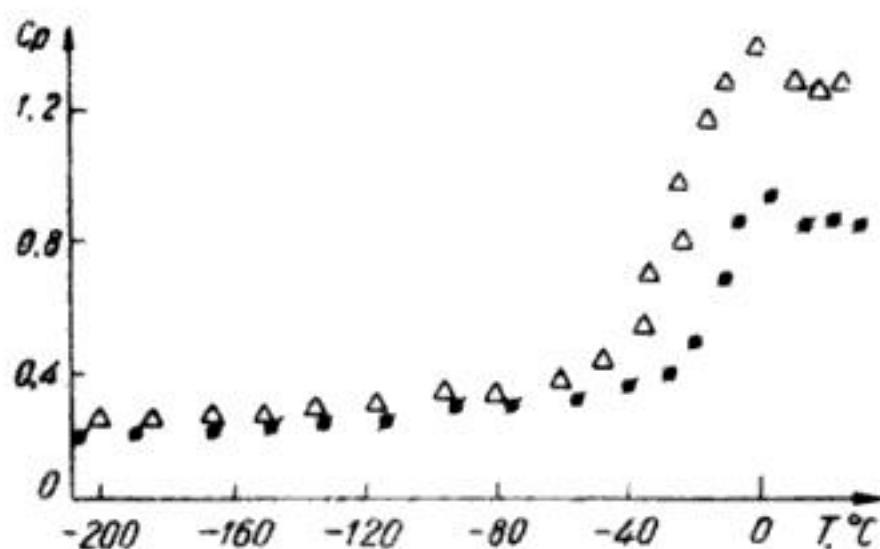


Рис. 1. Температурная зависимость C_p крови в кал/г·град:

□ — лейкоциты, Δ — лейкоциты с 10%-ной конечной концентрацией ПЗО-400.

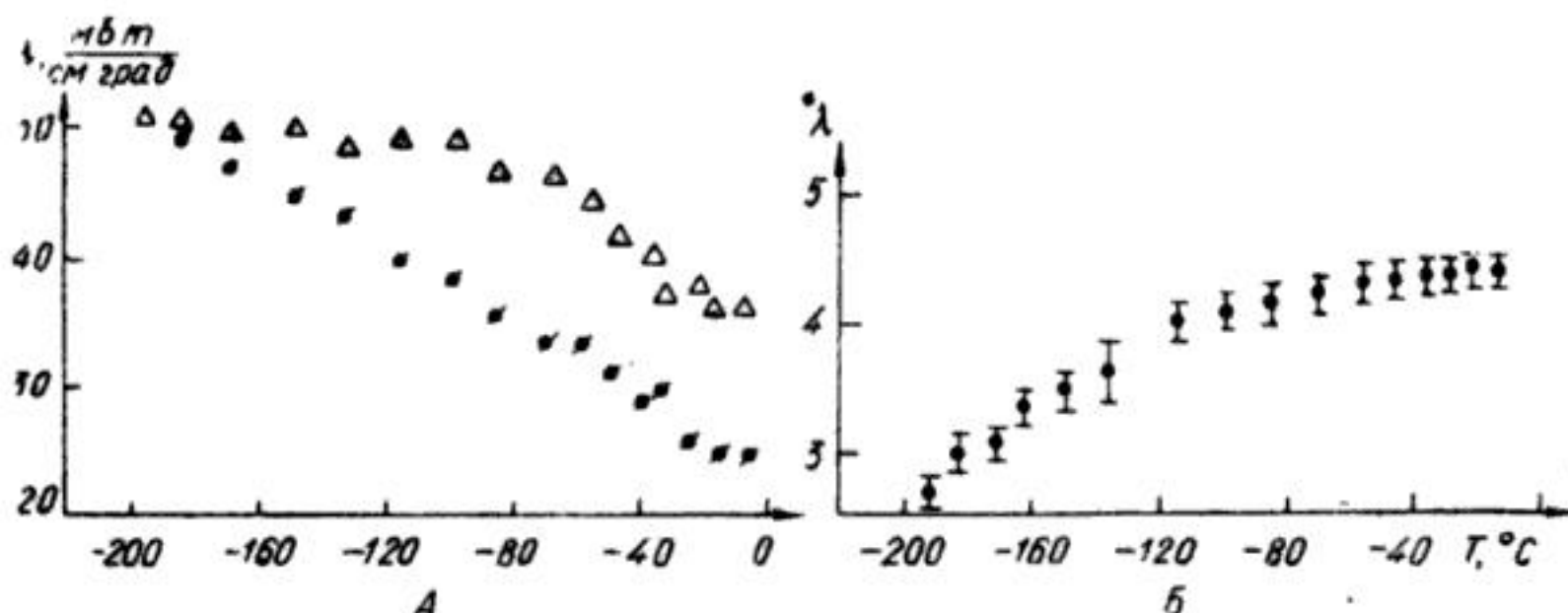


Рис. 2. Зависимость λ крови (А) и ПЗО-400 (Б) от температуры, мвт/см·град:

□ — лейкоциты, Δ — лейкоциты с 10%-ной конечной концентрацией ПЗО-400.

чае использования шаров с внутренним и внешним диаметрами соответственно d_1 и d_2 — определяли по формуле $K = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{1}{d_1} - \frac{1}{d_2} \right)$.

Температурная зависимость теплопроводности криопротектора ПЗО-400 изображена на рис. 2. В интервале температур от -196° до

—33° теплопроводность увеличивается незначительно, примерно на 0,13 мвт/см·град, а при дальнейшем повышении температуры остается почти неизменной, $\lambda=4,4$ мвт/см·град.

Температурный коэффициент $\frac{\partial \lambda}{\partial T}$ отрицательный для крови, и его значение примерно такое же, как и для льда. Как видно из рис 2, А, присутствие криопротектора, для которого $\frac{\partial \lambda}{\partial T} > 0$, изменяет ход температурной зависимости в твердой фазе и, особенно, в области фазовых превращений. Знание температурной зависимости для исследуемых объектов позволяет с достаточной для практики точностью осуществить требуемую программу размораживания и нагрева биологических объектов, консервированных низкими температурами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д у л ь н е в Г. Н., З а р и ч н я к Ю. П. Теплопроводность многокомпонентных растворов. — В кн.: Теплофизические свойства веществ и материалов, вып. 3. 1970, 103.
2. В е с с л и н г Ф., Б л е к ш и р П. Тепловые характеристики крови человека при ее замораживании. — Теплопередача, 1973, 2, 106.
3. О с и п о в В. А. Экспериментальное исследование процессов теплообмена. М., «Энергия», 1969.
4. П о л я к о в а А. И., Ц у ц а е в а А. А., И т к и н Ю. А. Оценки сохранности клеток лейкоконцентрата при низкотемпературной консервации (—196°) под защитой ПЭО. — Цитология и генетика, 1974, 3, 211.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СВЧ-ЭНЕРГИЕЙ.

III. РАЗМОРАЖИВАНИЕ КОНСЕРВИРОВАННОЙ КРОВИ

Ю. П. Тимошенко, Г. С. Лобынцева

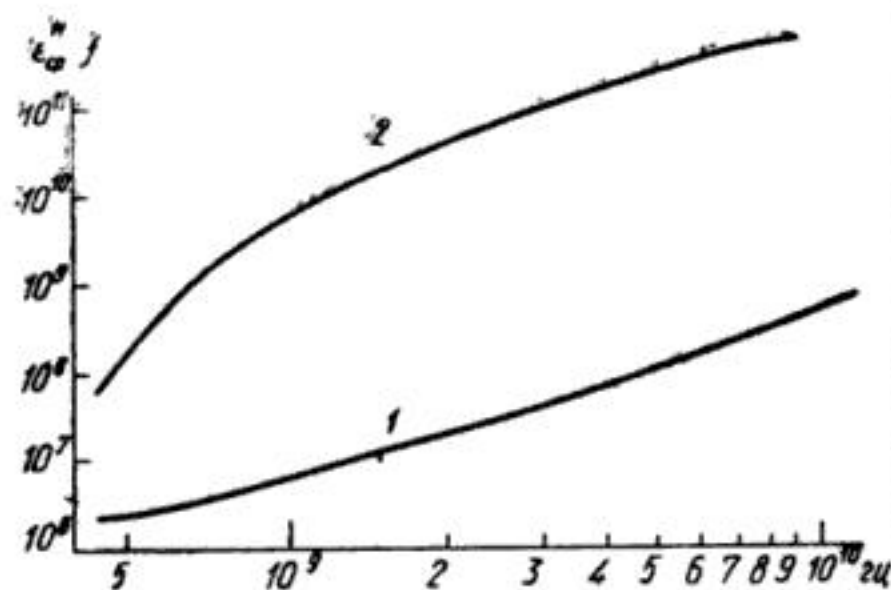
СВЧ-нагрев осуществляется за счет взаимодействия переменного электромагнитного поля частотой 10^8 — 10^{10} гц с разогреваемым веществом. При этом эффект воздействия высокочастотного излучения на биологические объекты заключается в процессе преобразования энергии электромагнитного поля в кинетическую энергию движения полярных молекул белка, воды и ионов различных солей, что и приводит к нагреву среды в целом. Рассматриваемый метод предполагает генерирование тепла внутри самого вещества при равномерном его нагреве.

При взаимодействии диэлектрика с СВЧ-полем в процессе нагрева участвуют два механизма. Один из них — ориентационный, связан с наличием токов смещения и обусловлен вращением дипольных молекул в среде, обладающей вязкостью. Это приводит к наличию комплексной диэлектрической проницаемости с активной составляющей ϵ' и реактивной ϵ'' . Кроме того, при наложении поля возникает смещение ионов, приводящее к возникновению токов проводимости. Это в свою очередь дает дополнительный вклад в ϵ'' , характеризующей поглощение энергии в веществе.

Оба эффекта можно описать в терминах комплексной диэлектрической проницаемости: $\epsilon^* = (\epsilon'_{ср} - j\epsilon''_{ср})\epsilon_0$, где ϵ_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума, ϵ' — диэлектрическая проницаемость среды, ϵ'' — потери в среде, которые записываются как $\epsilon''_{ср} = \epsilon''_{диз} + \epsilon''_{пр} = \epsilon' \operatorname{tg} \delta_{диз} + \sigma/2\pi f_0 \epsilon_0 (\operatorname{tg} \delta_{диз} + \sigma/2\pi f' \epsilon_0)$.

* ϵ^* знак комплексного числа.

Мощность, поглощаемая в единице объема вещества, определяется следующим известным выражением: $P = 5,56 \cdot 10^{-12} \epsilon''_{\text{ср}} f E^2$ вт/см³, где E — напряженность однородного электрического поля внутри материала (в/см), f — частота источника колебаний (гц). Как видно из формулы, количество тепла, выделяемое в единице объема диэлектрика, пропорционально его диэлектрическим потерям и частоте нагрева. Выражение $\epsilon''_{\text{ср}} f$ принято считать коэффициентом потерь. По изменению этой величины от частоты можно провести оценку эффективности использования той или иной частоты для размораживания биологических объектов.



Частотная зависимость коэффициента потерь для биологического объекта с высоким содержанием воды:

1 — в замороженном состоянии при -25° ; 2 — в жидком состоянии при $+25^\circ$.

Проведенные исследования диэлектрических свойств крови и ее фракций указывают на слабую частотную и температурную зависимость $\epsilon'_{\text{ср}}$ и $\epsilon''_{\text{ср}}$ в жидком (от $+25$ до $+10^\circ$) и кристаллическом (от -50 до -196°) состояниях биологических объектов*. Относительные изменения $\frac{\Delta \epsilon''_{\text{ср}}}{\epsilon''_{\text{ср}}}$, порядка 10%, характеризующие уменьшение $\epsilon''_{\text{ср}}$ с понижением температуры и увеличением частоты, несущественны при расчете процесса размораживания.

Из представленной на рисунке частотной зависимости коэффициента потерь для замороженного и жидкого состояний видно, что повышение частоты ускоряет как процесс размораживания (кривая 1), так и, особенно, нагрева (кривая 2). Повышение частоты источника СВЧ-энергии ограничивается глубиной проникновения электромагнитной энергии в нагреваемое вещество. Глубина проникновения уменьшается с ростом частоты и возрастает с уменьшением температуры. Ослабление напряженности электрического поля E можно представить в виде: $E = E_0 \exp(-kx)$, где k — постоянная затухания, x — глубина, на которой определяется величина E . Так, для исследованных фракций крови при температуре $+25^\circ$ на частоте $3 \cdot 10^9$ гц уровень, на котором 63% начальной энергии электромагнитной волны поглотится и превратится в тепло, составит 1,4 см, на $6 \cdot 10^9$ гц — 0,8 см. В замороженном состоянии (-25°) глубина проникновения составляет 1,2 см. Для рассматриваемого нами процесса характерно изменение коэффициента отражения на границе раздела воздух — биологический объект, определяющего долю прошедшей энергии. Частотная зависимость его выражена слабо, однако температурная зависимость коэффициента отражения существенна; от состояния полной прозрачности 0,25 при температуре -50° до величины 0,75 при $+10^\circ$ на частоте 2450 мгц.

В процессе восстановления замороженных биологических объектов основным параметром, определяющим биологическую полноценность, является скорость нагрева, $\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{P}{\rho C_p}$ (град/мин). Здесь ρ — плотность вещества (г/см³), C_p — удельная теплоемкость (кал/г·град). Формула связывает возрастание температуры в единице объема вещества с ко-

* Область фазовых переходов ввиду сложности и значимости рассматриваемых явлений будет обсуждена отдельно.

личеством поглощенной мощности при отсутствии тепловых потерь и изменений агрегатного состояния.

Как показали проведенные исследования, физические свойства биологических объектов, ответственные за скорость нагрева, в жидком ($+10^\circ$) и кристаллическом (-50°) состояниях имеют слабую температурную зависимость, что позволяет легко осуществлять требуемую программу нагрева для жидкого и кристаллического состояний. В значительном интервале температур от -50° до 0° биологические объекты представляют гетерогенные среды, что определяется скоростью замораживания и содержанием криопротектора. СВЧ-энергия преобразуется в тепло в каждой точке объема вещества пропорционально $\epsilon''_{\text{ср}}$ в этой точке, поэтому становится понятной опасность появления начинающегося локального таяния в каких-либо точках.

Важно подчеркнуть основные преимущества, обеспечиваемые сверхвысокочастотным размораживанием: существенное повышение скорости размораживания, особенно нагрева, возможность избирательного нагрева биологического объекта из-за различия в диэлектрических свойствах составляющих гетерогенной среды, стерильность процесса вследствие отсутствия контакта с теплоносителем, безынерционность в управлении, так как распространение СВЧ-энергии происходит со скоростью света и изменять ее можно в любой момент.

В известной нам литературе исследований по размораживанию крови не обнаружено. Для экспериментов была использована донорская кровь, взятие которой осуществлялось на растворе ЦОЛИПК-76. Лейкоцитную массу готовили по методу осаждения без коллоидных осадителей. В качестве защитного вещества при низкотемпературной консервации суспензий лейкома́ссы использовали ПЭО-400. Замораживание осуществляли по программе, описанной в работе [1]. Отогрев замороженных образцов, заключенных в двухмиллилитровые полиэтиленовые контейнеры, от температуры хранения (-196°) до требуемой осуществляли двумя способами: в водяной бане при температуре $+42^\circ$ и в СВЧ-установке. Размораживание СВЧ-энергией проводили по двухэтапной программе от -196° до 0° со средней скоростью 150° в 1 мин и от 0° до 35° со скоростью 200° в 1 мин. Размораживание осуществляли на разрешенной для промышленного применения частоте 2450 мГц в многомодовом резонаторе прямоугольной формы, обеспечивающем большое число резонансных мод, с использованием преселектора, что вызывало равномерное распределение поля в камере нагрева. Для получения равномерного температурного распределения по объему размораживаемого биологического объекта в камере был смонтирован поворотный столик, выполненный из диэлектрика с небольшими потерями, на котором размещали образцы. Одновременно осуществлялось согласование параметров камеры нагрева с генератором в начальной стадии процесса размораживания. Мощность источника СВЧ регулировалась плавно от 200 до 800 Вт. Поскольку связь генератора с резонатором в ходе процесса не изменялась, а изменение диэлектрических свойств объекта вызывало изменение нагрузки резонатора и, как следствие, величины поступающей энергии в резонатор, то скорость нагрева регулировалась изменением мощности генератора.

Результаты экспериментов представлены в таблице, из которой видно, что процент жизнеспособных клеток после размораживания с помощью СВЧ значительно выше, чем при отогреве в водяной бане.

Результаты многочисленных биологических исследований свидетельствуют о сохранении всех клеточных форм, отсутствии структурных изменений клеток и морфологических отклонений от нормы в процессе деконсервации. Исследования, проведенные ранее [3] по нагреву крови от $+4^\circ$ до $+35^\circ$ при частоте 2450 мГц и мощности 1 кВт, показывают, что кровь при этом не повреждается. Данные Восс и его коллег [4]

указывают на то, что при температурах ниже 0° клетки с ядрами устойчивы к воздействию СВЧ. Можно предположить, что используемая нами частота 2450 мГц и кратковременность облучения исключают возможность коммулятивного эффекта при облучении клеток крови. Однако в дальнейшем необходимо провести более широкие исследования с включением методов культуры *in vitro* для выяснения влияния СВЧ-поля на генетический код клеток крови.

Из проведенных экспериментов следует, что СВЧ-энергия может быть использована для равномерного и быстрого размораживания и нагрева биологических объектов с сохранением их жизнеспособности и функциональной активности.

Сравнительная оценка методов отогрева ядросодержащих клеток крови

Метод отогрева	Группа крови					
	0(I)		A(II)		B(III)	
	Количество ЯКК	Суправитальное окрашивание, %	Количество ЯКК	Суправитальное окрашивание, %	Количество ЯКК	Суправитальное окрашивание, %
СВЧ-энергией	4500±15,0	97,0±2,5	4000±12,0	98,0±2,7	4300±17,0	95,0±2,3
	4450±14,6	96,0±0,3	3955±55,3	98,0±0,2	4170±13,3	94,5±0,3
На водяной бане	4500±15,0	97,0±2,5	4000±12,0	98,0±2,7	4300±17,0	95,0±2,3
	4090±16,5	97,0±2,5	3750±30,4	95,0±0,3	4030±22,3	92,0±0,4

Примечание. В числителе — до замораживания, в знаменателе — после отогрева. ЯКК — ядерные клетки крови.

Авторы приносят искреннюю признательность акад. Н. Д. Девяткову за интерес к их работе, а также канд. техн. наук А. С. Зусмановскому за помощь, оказанную при ее выполнении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А. Оценка сохранности клеток лейкоконцентрата при низкотемпературной консервации (—196°) под защитой ПЭО. — Цитология и генетика, 1974, 3, 211.
2. СВЧ-энергетика. М., «Мир», 1971.
3. Restall C. J., Leonard P. F., Taswell H. F., Holaday A. B. Warming of human blood by use of microwaves. — Summ. 4th IMPI Symp. (Univ. of Alberta, Edmonton, Canada, May 21—23, 1969), 1969, 96.
4. Voss W. G., Warby C., Rojotte R., Ashwood-Smith M. Microwave thawing of tissue culture cells. — Cryobiology, 1972, 9, 6, 562.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНСЕРВИРОВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ УМЕРЕННО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

**П. М. Медведев, Т. К. Мамышева, В. И. Теодорович,
И. В. Монахенко, А. А. Раков, Г. Т. Недельский**

В настоящее время наиболее перспективным методом, позволяющим сохранить клетки костного мозга в биологически активном состоянии в течение длительного времени, стал метод консервирования его при ультранизкой температуре —196°.

Однако этот метод консервирования костного мозга связан с использованием сложной дорогостоящей аппаратуры, он требует большого

специально оборудованного помещения и специально подготовленного штата сотрудников, что ограничивает возможность широкого применения его в клинической практике.

В связи с этим в последние годы проводятся исследования, направленные на разработку более простых в техническом отношении методов замораживания костного мозга, в частности, при умеренно низких температурах -40° и -70° , получаемых с помощью электрохолодильников.

Изучение возможности консервирования костного мозга при умеренно низких температурах и явилось целью настоящей работы.

При разработке режима замораживания для оценки жизнеспособности консервированного костного мозга на основании данных литературы был выбран наиболее достоверный из имеющихся в настоящее время методов — метод клонирования. На первом этапе исследования были выполнены в эксперименте на 3180 мышах линии $C_{57}BL$. Костный мозг получали методом вымывания костного мозга из канала бедренной кости глюкозо-сахарозным раствором, содержащим антикоагулянт этилендиамин-тетраацетат натрия и антисептик фурациллин (осмолярность раствора 322 *мосм/л*, pH 6,6).

В качестве криофилактического агента использовали поливинилпирролидон с молекулярным весом 13 860 в 10%-ной конечной концентрации.

Подготовленную к замораживанию костномозговую взвесь помещали в полипропиленовые стандартные герметически закрывающиеся пробирки емкостью 2 *мл*.

Изучены следующие режимы замораживания: 1) при постоянной температуре -40° ; 2) при постоянной температуре -70° ; 3) при программном двухэтапном замораживании до -40° ; 4) при программном двухэтапном замораживании до -70° .

Замораживание костномозговой взвеси при постоянной температуре -40 или -70° и последующее хранение ее при этой температуре производили в ультракриостате № 180 (ГДР). Замораживание по заданной программе осуществляли с помощью аппарата для программного замораживания, созданного сотрудниками лаборатории совместно с Ленинградским научно-исследовательским институтом химического машиностроения [1]. Образцы замороженного костного мозга хранили в ультракриостате в течение одного-двух месяцев.

Во всех наблюдениях температуру костномозговой взвеси измеряли в процессе охлаждения с помощью медь-константановых термопар, погруженных в контрольные пробирки с костным мозгом; показания регистрировали на ленточной диаграмме электронного потенциометра ЭПП-09. Кривые замораживания костномозговой взвеси по указанным выше четырем режимам представлены на рис. 1, а, б.

Оттаивание костного мозга производили на водяной бане при 40° в течение 1,5—2 *мин*.

В образцах костномозговой взвеси мышей до замораживания и после оттаивания через разные сроки хранения (до 29 суток при -40° и до 30—43 суток при -70°) подсчитывали число миелокариоцитов и процентное содержание эозин-резистентных и полноценных, по данным люминесцентной микроскопии, клеток костного мозга.

Оттаянную костномозговую взвесь вводили внутривенно смертельно облученным мышам в дозе 100 000 ядерных клеток в 0,5 *мл* взвеси через 20—24 ч после облучения.

При изучении каждого из указанных ранее режимов замораживания и сроков хранения костномозговой взвеси параллельно с группой облученных животных, которым была произведена пересадка консервированного костного мозга, исследовали группу облученных животных с пересаженным свежим костным мозгом и контрольную группу облу-

ченных мышей, не получавших лечения. На 9-е сутки после пересадки костного мозга мышей забивали, извлекали селезенки, макроскопически подсчитывали число колоний в них, и после этого селезенки подвергали гистологическому исследованию.

Результаты изучения репопуляционной способности и морфологического исследования консервированной костномозговой взвеси мышей позволили выявить определенную зависимость всех указанных показателей от примененной программы замораживания и температурного режима хранения.

Так, замораживание костномозговой взвеси мышей при постоянной температуре -40° обеспечивает сохранность 35,2% стволовых кроветворных клеток, способных к колониеобразованию через 1 сутки хранения взвеси, которые приняты за 100% при пересадке свежезаготовленного костного мозга. При этом в оттаянной костномозговой взвеси остаются эозин-резистентными 31% клеток, а полноценными, по данным люминесцентной микроскопии, — 35% клеток по сравнению с данными этих тестов перед замораживанием.

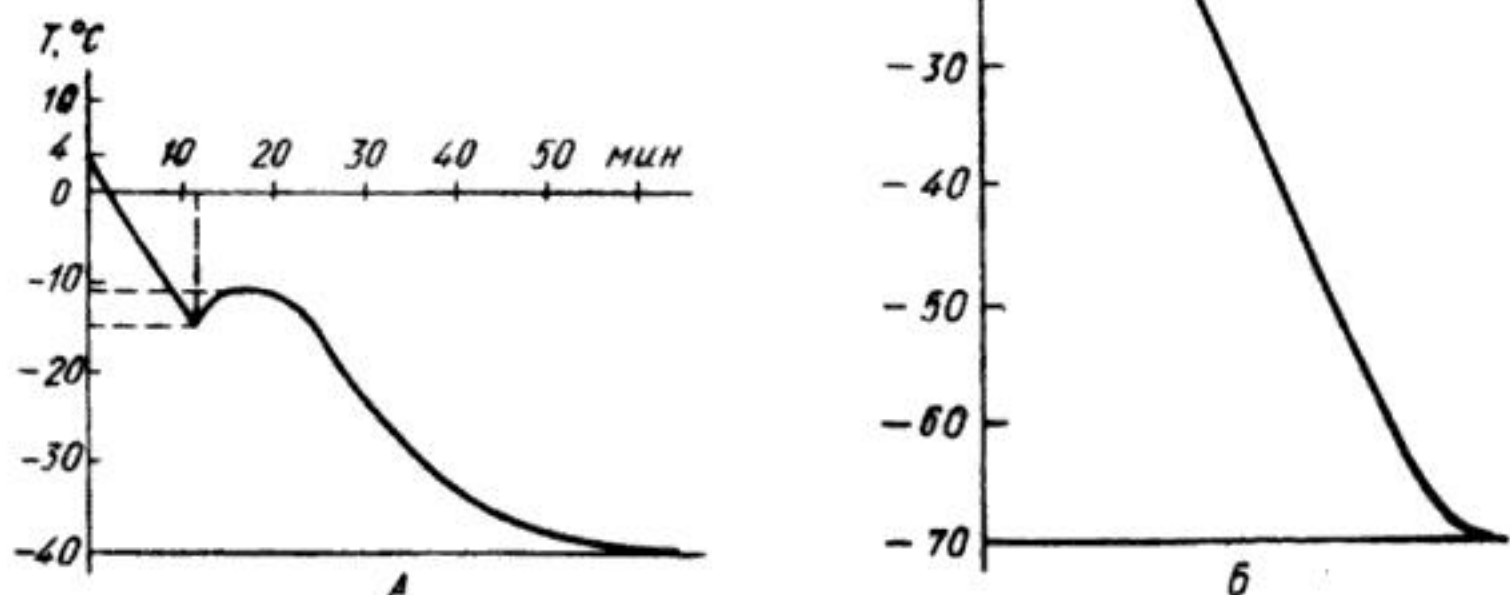


Рис. 1. Кривые замораживания костного мозга в ультракриостате при температуре -40° (А) и -70° (Б).

Осуществление замораживания костномозговой взвеси по заданной программе до -40° приводит к увеличению колониеобразующей способности оттаянной через 1 сутки хранения костномозговой взвеси. Сохранность стволовых клеток при этом увеличивается до 53,9%, содержание эозин-резистентных клеток — до 57%, полноценных при люминесцентной микроскопии клеток — до 48%.

Изучение репопуляционной способности и морфологическое исследование костного мозга мышей, замороженного до -70° , также обнаружило зависимость исследованных показателей от примененного режима замораживания. Достоверные различия в полученных результатах в зависимости от срока хранения костномозговой взвеси в пределах 1 месяца отсутствовали.

Лучшие результаты наблюдали при изучении колониеобразующей способности костномозговой взвеси, замороженной до -70° по заданной двухэтапной программе. В этом случае в течение всего срока наблюдения (до 30—43 суток) обнаруживали способными к колониеобразованию 62,8—61,1% стволовых кроветворных клеток, количество эозин-резистентных и полноценных при люминесцентной микроскопии клеток составляло при этом 65 и 63% соответственно.

При микроскопическом исследовании селезенки во всех наблюдениях также обнаружено преимущество метода программного замораживания костного мозга. В селезенках наблюдались более выраженные явления пролиферации с образованием наряду с индифферентными и эритроидных, и миелоидных колоний, и гиперплазию фолликулов. При пересадке облученным мышам костномозговой взвеси, замороженной при постоянном температурном режиме, в большинстве селезенки преобладали явления атрофии с наличием единичных эритроидных колоний.

Суммируя результаты выполненных исследований, следует сделать заключение, что из всех изученных режимов замораживания мышинного костного мозга оптимальным является замораживание его по заданной программе до -70° (со скоростью $1,1^{\circ}$ в 1 мин до момента кристаллизации, т. е. до $-11 \div -13^{\circ}$, зона кристаллизации при этом занимает 3 мин, далее замораживание идет со скоростью $8,5^{\circ}$ в 1 мин до -70°). Этот способ замораживания обеспечил высокую колониобразующую способность консервированного костного мозга с сохранением в нем свыше 60% способных к колониобразованию кроветворных стволовых клеток и содержание в оттаянной костномозговой взвеси более 60% клеток, полноценных, по данным экспресс-методов определения жизнеспособности, в течение 1 месяца консервирования.

Анализ термограмм, записанных при разных режимах замораживания костного мозга, свидетельствует о том, что найденный оптимальный режим программного замораживания может быть получен и при комбинировании двух постоянных температурных режимов. Как видно из представленных кривых замораживания (см. рис. 1, 2), его можно получить, поместив объект на 12 мин при постоянной температуре -40° для осуществления первого этапа замораживания. Далее костный мозг следует быстро поместить в холодильник при -70°C для хранения.

Исследования консервированной костномозговой взвеси мышей, свидетельствующие о значительно большей сохранности клеток при замораживании по двухэтапному режиму до -70° , послужили основанием для экспериментов по консервированию образцов посмертного костного мозга человека замораживанием его по такой же программе.

Количество костномозговой взвеси, раствор, используемый для взвешивания клеток костного мозга, контейнеры, в которых производили замораживание, режим замораживания, оттаивания и хранения костномозговой взвеси человека были идентичны с примененными для замораживания костномозговой взвеси мышей.

Образцы посмертного костного мозга человека до замораживания и после оттаивания изучали с помощью морфологических и некоторых цитохимических методов.

Результаты морфологического исследования консервированной в течение 1—5 недель посмертной костномозговой взвеси человека показали следующее. В костном мозге через 1 неделю хранения эозин-рези-

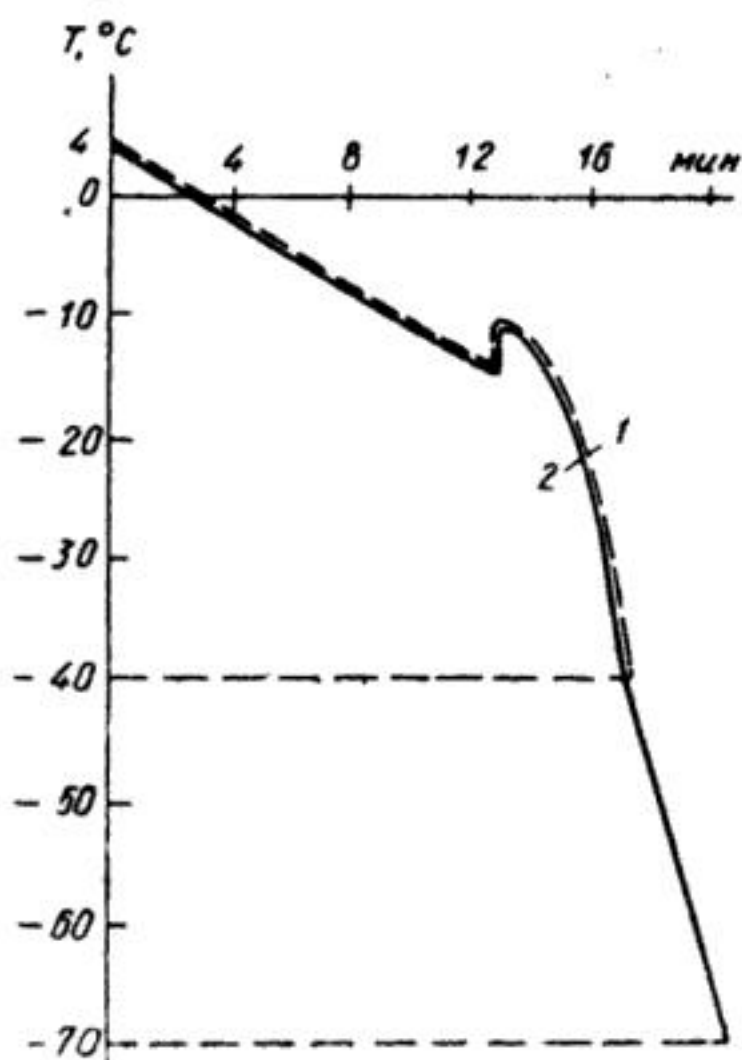


Рис. 2. Кривые замораживания костного мозга на аппарате с программным управлением до -40° (1) и -70° (2).

стентными сохраняются 50,4% клеток, в полноценном состоянии, по данным люминесцентной микроскопии — 68,4%.

С удлинением сроков хранения до 3—4 недель наблюдается постепенное уменьшение сохранившихся полноценными клеток костного мозга, по данным эозиновой пробы — до 30,5%, по данным люминесцентной микроскопии — до 44%.

Значительные изменения при этом обнаруживаются в качественном составе оттаянной костномозговой взвеси. Они выражаются в уменьшении содержания молодых и зрелых клеток гранулоцитарного ростка (до 24,6 и 2,1% соответственно) и возрастании содержания молодых и, в особенности, зрелых клеток эритроидного ростка (до 27 и 36,1% соответственно) и лимфоцитов (до 11,35%). При изучении цитохимических характеристик оттаянной костномозговой взвеси отмечено постепенное уменьшение содержания в клетках гликогена и снижение активности пероксидазы.

Принимая во внимание результаты морфологического и цитохимического исследований консервированного посмертного костного мозга и данные изучения колониеобразующей способности консервированного в тех же условиях костного мозга мышей, следует сделать вывод о возможности комбинированного использования постоянных умеренно низких температур -40° и -70° для консервирования посмертного костного мозга человека в течение 3—4 недель.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков А. Д., Логинов Н. Н., Бабенко Н. И., Медведев П. М. Аппарат для программного замораживания костного мозга конструкции авторов. — Тез. докл. науч. сессии по вопросам трансфузиологии. Л., 1973, 78.
2. Till I. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. — Radiat Res., 1961, 14, 213.

Ленинградский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗНУЮ СИСТЕМУ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

Е. Я. Панков, О. П. Маркова, В. И. Строна

Разработка оптимальных условий для сохранения тканей и органов при низких температурах с последующим полным восстановлением всех физиологических функций невозможна без ясного представления о механизмах криповреждений. Следует отметить, что одним из них является разрушение липопротеиновых систем вследствие действия повышенной концентрации солей [7], что в свою очередь может вызывать грубые изменения проницаемости мембран и энзиматической активности связанных с ним ферментов. Избирательная проницаемость цитоплазматической мембраны обусловлена деятельностью целого ряда ферментов, в частности аденозинтрифосфатазы (АТФазы).

Учитывая, что изучение активности фермента АТФазы в клетках костного мозга, подвергнутых процессу замораживания до температуры -196° под защитой полиэтиленоксида-400 (ПЭО-400) не проводилось, мы исследовали изменение активности этого фермента в миеокарионитах костного мозга крыс.

После декапитации животных получали костный мозг из трубчатых костей на консервирующем растворе ЦОЛИПК-3. Определение

активности АТФазы проводилось в мазках костного мозга по методу Падикула, Герман [2] на различных этапах до и после криоконсервации: в исходном костном мозге, после 30-минутной экспозиции миелокариоцитов с 15%-ным ПЭО-400 и после замораживания по двухэтапной программе до температуры жидкого азота. Отогрев костномозговой взвеси осуществляли в водяной бане при $+42^{\circ}$. Всего проведено 5 серий опытов. Для сравнения полученных данных подсчитывали средний гистохимический коэффициент (СГК) по Астальди и Верга [1].

Проведенные нами исследования показали, что клетки исходного нативного костного мозга имеют довольно высокую активность АТФазы, особенно богаты ферментом зрелые гранулоциты. Максимальная АТФазная активность наблюдается в эозинофильных гранулоцитах и их предшественниках, а также в плазматических клетках, что согласуется с данными других авторов [3]. По степени активности АТФазы клетки распределяли на 4 группы: I группа — реакция в клетках отсутствует; II — слабо выраженная активность фермента; III — умеренная активность; IV — интенсивность реакции высокая. Преобладали клетки I и II групп. Продукт реакции имел вид диффузно расположенных на поверхности клетки гранул, которые сливались, образуя сплошное темное окрашивание цитоплазмы.

Проведенными исследованиями установлено, что незначительное повышение активности АТФазы наблюдается уже после экспозиции клеток костного мозга с ПЭО-400. Вероятно, это объясняется частичным повреждением цитоплазматических мембран в результате действия криофилактического агента: СГК при этом составляет 1,15, тогда как исходного костного мозга — 0,86. Дальнейший процесс замораживания-оттаивания миелокариоцитов вызывает дополнительное повышение активности фермента. СГК возрастает на 57% по сравнению с исходным и становится равным 1,35.

Трудно сказать, является ли повышение активности АТФазы при криоконсервации костного мозга с ПЭО-400 существенным для нормального функционирования клетки, чтобы судить о защитных свойствах ПЭО-400 по отношению к АТФазе клеток костного мозга при криоконсервации с другими криофилактиками. Эта задача послужит темой дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Astaldy G., Verga L. — Цит. по: Терентьева Э. И. Цитохимия элементов кроветворения при лейкозе. М., «Медицина», 1968, 7.
2. Padykula H. A., Herman E. — Цит. по: Берстон М. Гистохимия ферментов. М., «Мир», 1965, 209.
3. Schubert I. C., Rinneberg H. Der zytochemische Nachweis von Adenosintriphosphat spaltenden Fermenten bei pH 7,2 in menschlichen Knochenmarkausstrichen. — Blut, 1962, 8, 5, 282.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ОКИСИ ЭТИЛЕНА НА ЯДЕРНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

В. И. Строна

В работе представлены результаты изучения действия оксиэтилированного пентаэритрита (ОЭП) и полиэтиленоксида (ПЭО-400) на ядро-содержащие клетки костного мозга крыс при эквilibрации от 15 мин до 5 ч.

Эксперимент проводили на беспородных белых крысах-самцах весом 140—160 г. После декапитации животных костный мозг вымывали из трубчатых костей консервирующим раствором ЦОЛИПК-3. Для определения жизнеспособности миелокариоцитов до и после экспозиции с ПЭО-400 или ОЭП применяли следующие экспресс-методы: окраску эозином по Шреку, подсчет ядросодержащих клеток в 1 мкл, а также проводили изучение миелограмм в мазках, окрашенных по Паппенгейму. После определения жизнеспособности миелокариоцитов в исходном образце взвесь клеток костного мозга делили на 40 равных частей и к каждой части добавляли ОЭП и ПЭО-400 в 5%-, 10%-, 15%- и 20%-ной конечной концентрации. Взвесь миелокариоцитов эквилибировали с различными концентрациями указанных выше веществ в течение 15, 30, 60 мин, 3 и 5 ч при комнатной температуре.

Как показали исследования, длительность эквилибрации с упомянутыми концентрациями ОЭП не влияла существенно на количество ядерных клеток ($P > 0,05$) (табл. 1). Процент жизнеспособных клеток

Таблица 1

Количество ядерных клеток после эквилибрации с ОЭП

Концентрация, %	Эквилибрация, мин				
	15	30	60	180	300
5	14500±850	13900±735	14600±1260	12500±1050	13900±935
10	11300±765	11750±708	15400±1050	12500±440	12800±1470
15	13300±1050	14700±900	12300±630	13500±840	14900±1260
20	14500±920	14800±531	11300±1050	14200±1060	13400±1050

также оставался высоким, он снижался не более чем на 5% от исходного уровня ($P > 0,05$) (табл. 2). Однако при 3- и 5-часовой экспозициях взвеси клеток костного мозга с ОЭП наблюдается более существенное снижение жизнеспособности, чем при коротких периодах эквилибрации. Следует отметить, что при экспозиции миелокариоцитов при 4² с ОЭП в 5%-ной конечной концентрации даже в течение 2 суток процент жизнеспособности клеток оставался высоким — 83% (исходный — 99%). Учитывая эти данные, можно сделать вывод, что ОЭП не вызывает гибели миелокариоцитов даже при длительной экспозиции.

Таблица 2

Жизнеспособность (%) миелокариоцитов после эквилибрации с ОЭП

Концентрация, %	Эквилибрация, мин				
	15	30	60	180	300
5	92±1,95	89±2,58	91±2,8	89±3,87	86±6,21
10	90±1,95	92±2,31	93±2,79	85±2,66	87±5,38
15	93±2,15	90±1,95	92±3,22	87±3,2	85±4,3
20	88±2,3	88±3,18	88±2,15	87±2,66	84±3,22

Анализ миелограмм после эквилибрации с ОЭП разной концентрации и сравнение их с исходными данными показали хорошую сохранность молодых и зрелых форм белого и красного ростка. Клетки имели те же размеры и структуру, что и необработанные ОЭП.

Таким образом, можно сделать вывод, что ОЭП не повреждает клетки костного мозга крыс. Эквилибрация с разными концентрациями вещества при разной экспозиции не вызывает достоверного снижения жизнеспособности миелокариоцитов.

Представляет интерес сравнительная оценка влияния ПЭО-400 и ОЭП на ядерные клетки костного мозга крыс. Результаты, полученные при эквилибрации взвеси миелокариоцитов с ПЭО-400 и ОЭП в 5%-, 10%-, 15%- и 20%-ной конечной концентрации в течение 15 мин сви-

детельствуют об одинаковом воздействии этих веществ на ядерные клетки костного мозга: в случае применения ПЭО-400 и ОЭП жизнеспособность клеток после 15-минутной экспозиции не изменялась по сравнению с исходными данными. ПЭО-400 и ОЭП не влияли и на количество ядерных клеток, но, если применяли ОЭП в 5%-ной конечной концентрации, количество ядерных клеток было несколько выше, чем при использовании 5%-ного ПЭО-400 ($P < 0,05$). 30-минутная экспозиция с вышеуказанными веществами несколько снизила жизнеспособность миелокариоцитов (на 2—4%), но это снижение недостоверно ($P > 0,05$). Аналогичные результаты получены и при 60-минутной экспозиции клеток костного мозга крыс с теми же концентрациями веществ, причем и ОЭП и ПЭО-400 снижали жизнеспособность клеток в одинаковой степени. При 3- и 5-часовой экспозициях клеток костного мозга с указанными веществами наблюдается достоверное снижение жизнеспособности (на 5—7%, $P < 0,05$) в случае использования как ПЭО-400, так и ОЭП. Количество ядерных клеток на протяжении всего периода экспозиции (от 15 мин до 5 ч) с ПЭО-400 и с ОЭП не изменялось ($P > 0,05$).

Следовательно, ПЭО-400 и ОЭП не являются веществами, вызывающими гибель клеток костного мозга крыс, и воздействие этих веществ на миелокариоциты аналогично.

Изучение миелограмм показало хорошую сохранность молодых и зрелых форм белого и красного ростка костного мозга после эквивибрации их с ПЭО-400 и с ОЭП. Однако следует отметить, что при 3- и 5-часовой экспозициях с этими веществами лучше сохраняются бластные клетки, особенно эритробласты, плазматические клетки, миелоциты. Зрелые гранулоциты частично разрушаются. Данные миелограмм подтверждают морфологическую сохранность клеток костного мозга крыс при воздействии на них ПЭО-400 и ОЭП.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КРОЛИЧЬЕГО КОСТНОГО МОЗГА В РАЗЛИЧНЫХ АППАРАТАХ

*А. Я. Холодный, Ш. М. Багаутдинов, Г. И. Петренко,
М. В. Киселева, И. Л. Турбина, Н. Н. Руденко*

В настоящее время для низкотемпературного консервирования костного мозга применяются аппараты программного замораживания, в которых используются в основном два принципа ведения программы замораживания: по биологическому продукту и по камере охлаждения. Более оптимальные условия при замораживании создаются в тех случаях, когда программа ведется по биологическому продукту.

С целью сравнительной характеристики процесса криоконсервирования нами изучена сохранность клеток кроличьего костного мозга, замороженного в отечественных аппаратах программного замораживания:

1) замораживателе биологического продукта ЗБ 00.00.00, разработанном Физико-техническим институтом низких температур АН УССР (1973—1974 гг.).

2) аппарате для замораживания биологических продуктов КВ 1519.00.000 ТО.

Показатели костного мозга кролика, замороженного с криофиллактиком ПЭО-400 в аппарате КВ 1519.00.000 ТО

Показатель	Число миеокарион- тов в 1 мкл	Число мегакарион- тов в 1 мкл	Жизнеспособность клеток, по Шреку, %	Клетки с неповреж- денным ядром, %	Клетки с признаками гомогенизации, %	Гомогенизированные клетки, %	Клетки с разрушен- ными ядрами, %
<i>M</i>	$\frac{29300}{26000}$	$\frac{28,8}{12,8}$	$\frac{86}{76,4}$	$\frac{86}{90,4}$	$\frac{5,0}{3,2}$	$\frac{3,2}{1,7}$	$\frac{5,8}{4,7}$
$\sigma \pm$	$\frac{11000}{6700}$	$\frac{11,2}{4,8}$	$\frac{7,0}{1,5}$	$\frac{6,1}{4,6}$	$\frac{2,6}{2,7}$	$\frac{2,8}{2,1}$	$\frac{3,6}{2,45}$
$m \pm$	$\frac{3300}{2000}$	$\frac{2,3}{2,4}$	$\frac{1,5}{0,46}$	$\frac{1,3}{1,4}$	$\frac{0,54}{0,8}$	$\frac{0,6}{0,65}$	$\frac{0,75}{0,74}$

Примечание. Здесь и в табл. 2 в числителе — до замораживания, в знаменателе — после замораживания.

Показатели костного мозга кролика, замороженного с криофиллактиком ПЭО-400 в аппарате ЗБ 00.00.00

Показатель	Число миеокарион- тов в 1 мкл	Число мегакарион- тов в 1 мкл	Жизнеспособность клеток, по Шреку, %	Клетки с неповреж- денным ядром, %	Клетки с призна- ми гомогенизации, %	Гомогенизированные клетки, %	Клетки с разрушен- ными ядрами, %
<i>M</i>	$\frac{29300}{31600}$	$\frac{28,8}{22,2}$	$\frac{86}{61,7}$	$\frac{86}{75,3}$	$\frac{5,0}{8,13}$	$\frac{3,2}{9,7}$	$\frac{5,8}{6,9}$
$\Sigma \pm$	$\frac{11000}{3000}$	$\frac{11,2}{7,7}$	$\frac{7,0}{16,6}$	$\frac{6,1}{8,6}$	$\frac{2,6}{12,9}$	$\frac{2,8}{4,9}$	$\frac{3,6}{2,1}$
<i>m</i> ±	$\frac{3300}{1100}$	$\frac{2,3}{2,3}$	$\frac{1,5}{5,0}$	$\frac{1,3}{2,6}$	$\frac{0,54}{3,9}$	$\frac{0,6}{1,5}$	$\frac{0,75}{0,65}$

Взятие костного мозга от 12 кроликов осуществляли методом компрессии костей с соблюдением правил асептики. Костный мозг смешивали с консервантом ЦОЛИПК-3 в соотношении 1:2, затем центрифугировали, отсасывали надосадочную жидкость и к клеточному субстрату добавляли криопротектор полиэтиленоксид (ПЭО-400) до 15%-ной конечной концентрации. Затем костный мозг помещали в 24 алюминиевых контейнера емкостью 50 мл и подвергали программному замораживанию. Одновременно в каждом аппарате замораживали по шесть контейнеров.

Программа замораживания осуществлялась в два этапа: охлаждение -1° в 1 мин до точки кристаллизации биологического продукта, затем контейнеры погружали в жидкий азот и хранили их при температуре -196° в течение 1—2 месяцев. По окончании срока хранения контейнеры размораживали при температуре 41° в размораживателе биопродукта РБ 00.00.00 ТО, разработанном Физико-техническим институтом низких температур АН УССР.

Биологическую полноценность костного мозга определяли до замораживания и после размораживания по таким показателям: числу миелокариоцитов и мегакариоцитов в 1 мкл, проценту жизнеспособных клеток (по Шреку) и морфологической структуре клеток, определяемой методом люминесцентной микроскопии. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики.

Результаты исследований костного мозга, замороженного на аппарате КВ 1519.00.000 ТО, представлены в табл. 1, а на ЗБ 00.00.00 — в табл. 2.

Из табл. 1 видно, что после размораживания костного мозга клеточный состав сохраняется на том же уровне. Однако количество жизнеспособных клеток несколько снижается (на 12%). Данные люминесцентной микроскопии позволили обнаружить, что большинство клеток (более 90%) с неповрежденным ядром. Характерные повреждения ядра (начало гомогенизации, гомогенизация или разрушение ядра) по сравнению с исходными данными в костном мозге определялись с такой же частотой.

Из табл. 2 видно, что при замораживании в аппарате, изготовленном в Физико-техническом институте низких температур АН УССР, число миелокариоцитов и содержание мегакариоцитов в размороженном костном мозге по сравнению с данными до замораживания также не изменилось. Однако процент жизнеспособных клеток был существенно ниже (на 39%), чем при криоконсервировании костного мозга в аппарате ЗБ 00.00.00. При люминесцентной микроскопии отмечено увеличение числа клеток с повреждениями ядра (на 76%) и усиление процесса гомогенизации ядра.

Полученные данные о биологической сохранности клеток при программном замораживании в указанных аппаратах статистически достоверны ($P < 0,01$).

Анализируя особенности конструкции датчиков температур обоих аппаратов, мы пришли к выводу, что датчик температур аппарата ЗБ 00.00.00 не позволяет измерять температуру в середине контейнера, так как он короткий. Прибор регистрирует показатели начала кристаллизации биологического продукта только в верхних слоях. Это приводит к тому, что скорость замораживания изменяется не в момент кристаллизации, ибо в середине продукта она еще не началась. Вероятно, именно поэтому нами получены несколько худшие показатели биологической сохранности костномозговых клеток в процессе криоконсервирования на аппарате ЗБ 00.00.00. Аппарат КВ 1519 00.00.00 ТО имеет датчик, позволяющий измерять температуры в более глубоких слоях взвеси костного мозга в контейнере. Разница в расположении чувствительных датчиков в контейнере имитатора этих аппаратов составляет 40 мм.

Таким образом, по техническим характеристикам оба аппарата могут быть рекомендованы для использования в практической работе по криоконсервированию ядросодержащих клеток, однако в аппарате ЗБ 00.00.00 необходимо удлинить остов датчика температуры до 8—10 см.

Военно-медицинская Академия
им. С. М. Кирова

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДОВ НА КИСЛОРОДНУЮ ЕМКОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Л. П. Бредихина, В. Г. Лубяный

Оценка степени функциональной сохранности консервированного биологического объекта представляет значительные трудности. Это связано с отсутствием единого критерия изменений, происходящих в биологических объектах в процессе консервирования. Показатели состояния жизнеспособности в каждом отдельном случае включают многие морфологические и функциональные характеристики, причем преобладание тех или иных зависит от вида объекта.

Представление о сохранившейся после консервирования жизнеспособности эритроцитов можно составить только по комплексу морфологических и функциональных показателей, среди которых ведущее место занимает оценка состояния основной функции эритроцитов — способности транспортировать кислород.

Все эти вопросы приобретают особое значение при получившем в настоящее время практическое применение низкотемпературном консервировании, которое эритроциты переносят достаточно хорошо. Эффективными методами низкотемпературного консервирования могут быть только те, которые сохраняют жизнеспособность эритроцитов и поддерживают высокий уровень их кислородно-транспортной функции, что обеспечивает нормальное снабжение тканей кислородом при переливании крови [3, 4].

Одним из факторов, определяющих оптимальный уровень газообмена в тканях организма, является кислородная емкость крови [КЕ], т. е. максимальное количество кислорода, которое может быть связано кровью. КЕ зависит от количества содержащегося в крови гемоглобина и до недавнего времени рассматривалась как стабильная величина. Согласно константе Гюфнера было принято считать, что 1 г гемоглобина при полном насыщении кислородом способен присоединять 1,33—1,34 мл кислорода [6, 12]. Исследования последних лет показали, что КЕ может изменяться в ту или иную сторону от величины константы Гюфнера в норме у здоровых людей и при различных патологических состояниях, таких, как сердечно-сосудистые заболевания, острые гипоксические состояния, анемии, и между концентрацией гемоглобина и его КЕ в нормальных условиях могут наблюдаться обратные взаимоотношения [7].

В литературе имеются указания на изменение КЕ крови под влиянием различных веществ, прежде всего фармакологических средств. Так, после введения эуфиллина значительно улучшается газовый состав и повышается КЕ крови [2]. Барбитураты и фосфорорганические инсектициды уменьшают КЕ венозной крови [1]. При применении в гематологической практике тиофосфамида и циклофосфана отмечена тенденция к снижению оксигенации крови [5].

Однако эти исследования проводились при введении испытуемых веществ непосредственно в кровяное русло человека или лаборатор-

ных животных, и на результаты влияли гемодинамика, микроциркуляция, ферментативный статус организма.

Имеются единичные сообщения об изменениях КЕ эритроцитов после низкотемпературного консервирования [13], но в них не изучено действие на этот показатель криопротектора, в данном случае — глицерина.

Так как в процессе низкотемпературного консервирования первым обязательным этапом является контакт с криопротектором, нас заинтересовал вопрос о влиянии на КЕ эритроцитов активных криопротекторов — полимеров окиси этилена, которые всесторонне изучаются в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР.

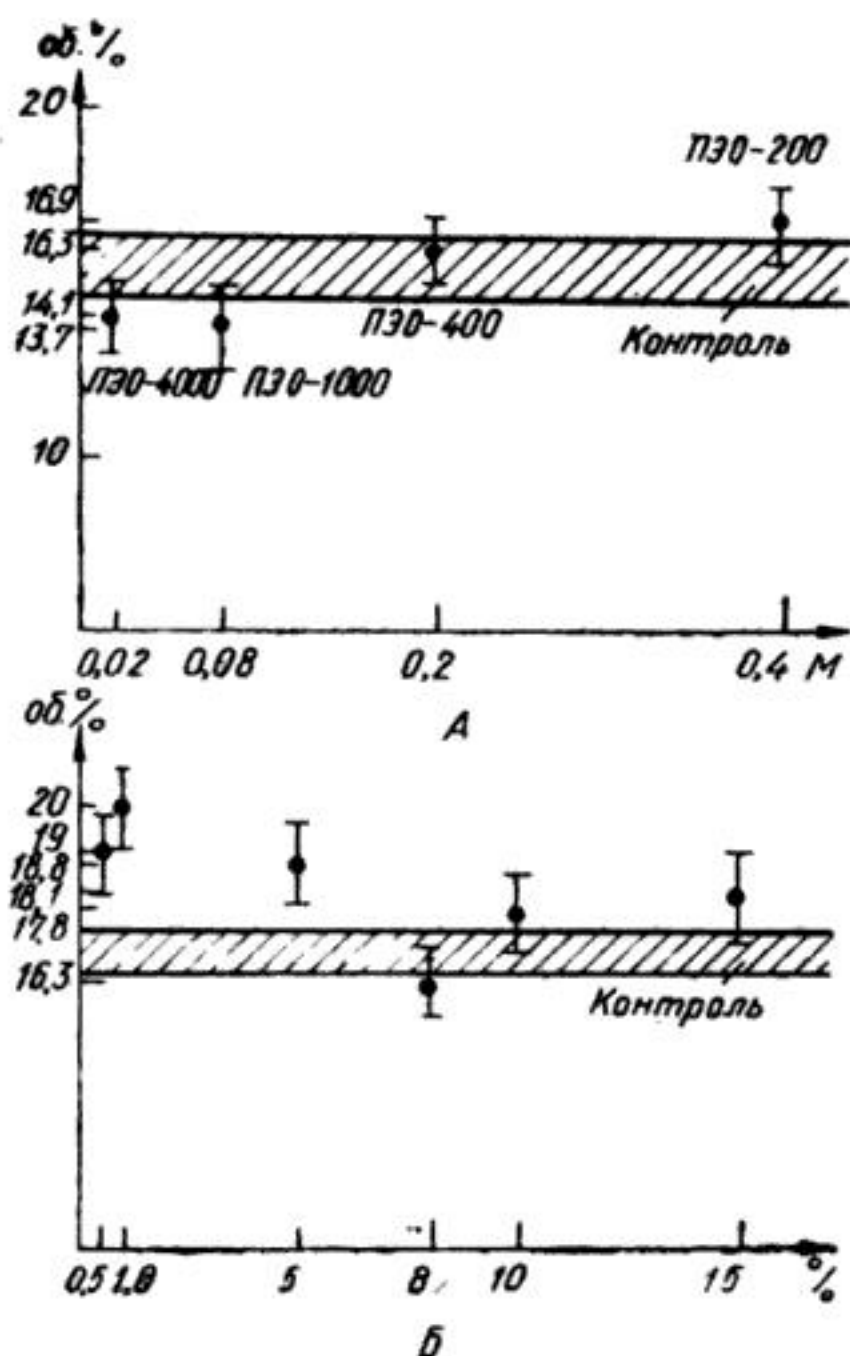
В наших исследованиях изучали полиэтиленоксиды (ПЭО) различных молекулярных весов и разного характера действия: эндоцеллюлярный ПЭО-200, эндо-, экзоцеллюлярный ПЭО-400 и экзоцеллюлярные ПЭО-1000 и ПЭО-4000 [11].

Условия опытов максимально стандартизовали. Для исследований использовалась одна и та же донорская кровь (до 5 суток) на консерванте ЦОЛИПК-7⁶. Применение одной и той же крови исключало влияние рН на результаты опытов. Растворы ПЭО в различных концентрациях добавляли к эритроцитарной массе в отношении 1:1. Пробы эквилибрировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем интенсивно встряхивали на воздухе в течение 10 мин для полного насыщения крови кислородом. В качестве контроля служила эритроцитарная масса той же крови с прибавленным к ней в отношении 1:1 физиологическим раствором, прошедшая те же этапы подготовки.

КЕ взвесей определялась по методу Ван Слайка на аппарате АГК-2 [10].

Целью исследования было изучение влияния на КЕ эритроцитов: 1) ПЭО в зависимости от молекулярного веса; 2) ПЭО в различных концентрациях.

В первой серии опытов ПЭО добавляли к эритроцитарной массе в разных молярных концентрациях с таким расчетом, чтобы получить в растворах приблизительно одинаковое количество оксиэтильных групп. Так, ПЭО-200 создавал 0,4 М конечную концентрацию в эритроцитарной массе, ПЭО-400 — 0,2 М, ПЭО-1000 — 0,08 М и ПЭО-4000 — 0,02 М (рисунок, А). Результаты исследования показали, что КЕ эритроцитов под влиянием этих концентраций ПЭО не изменяется в значительной степени. После контакта с низкомолекулярными ПЭО-200 и ПЭО-400 КЕ эритроцитов имеет тенденцию к некоторому



Кислородная емкость эритроцитов (об. %) после контакта с полиэтиленоксидами различных молекулярных весов (А) и ПЭО-400 различной концентрации (Б).

повышению. Снижение КЕ под влиянием ПЭО-1000 и ПЭО-4000 не превышает 0,8—1,0 об. %.

Влияние различных концентраций ПЭО-400 на КЕ эритроцитов показано на рисунке (Б). Установлено некоторое повышение КЕ, однако уловить зависимость между концентрациями криопротектора и повышением КЕ эритроцитов не удалось.

Собственная КЕ растворов ПЭО, изучаемых молекулярных весов и концентраций, не превышала 0,5 об. %, что не могло оказывать особого влияния на величины КЕ эритроцитарных взвесей.

Одновременно пробы исследовали на содержание свободного гемоглобина в надосадочной жидкости по методике М. А. Рождественской [9]. Во всех пробах выход свободного гемоглобина не превышал 25 мг %, что свидетельствует о том, что эритроциты в ходе эксперимента не разрушались.

Таким образом, добавление растворов ПЭО не оказывает отрицательного воздействия на КЕ эритроцитов человека, не препятствует диффузии кислорода в клетки. Отмечена тенденция к некоторому повышению КЕ. Причина этого явления еще не расшифрована и, возможно, оно связано с особенностями структуры молекулы ПЭО ($\text{HOCH}_2-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$), имеющей полярный кислород, способный взаимодействовать с клеточными структурами и устанавливать связь с ними за счет донорно-акцепторных взаимодействий [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бордюг О. Ф. Газы крови при острых отравлениях барбитуратами и фосфорорганическими инсектицидами. — Врач. дело, 1968, 11, 124.
2. Будкевич Ю. Б. Изменение газов крови под влиянием зуфиллина. — Тер. архив, 1962, 34, 1, 61.
3. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И., Семенова Н. В., Сухова А. Г., Гальская И. Н., Кудряшова С. Н., Обшивалова Н. Н. Криоконсервирование эритроцитов и их функциональная полноценность (хранение в жидком азоте до 7 лет). — Пробл. гематол., 1973, 9, 3.
4. Виноград-Финкель Ф. Р., Дервиз Г. В., Андреева А. Г., Дмитриева М. Г., Гинзбург Ф. Г., Кудряшова С. Н., Обшивалова Н. Н., Цибульская Л. М., Иванов Ю. Г., Полякова А. С. Метаболическая активность и дыхательная функция крови, консервированной на кислых глюкозоцитратных растворах, и пути усовершенствования этих растворов. — Пробл. гематол., 1974, 7, 3.
5. Ефименко А. М. Влияние циклофосфана и тиофосфамида на белки крови и насыщение ее кислородом. — Фармакол. и токсикол., 1966, 29, 2, 215.
6. Коржув П. А. Гемоглобин. М., «Наука», 1964.
7. Лауэр Н. В., Куликов М. А., Середенко М. М. О расчете кислородной емкости крови по концентрации гемоглобина. — В кн.: Механизмы нейро-гуморальной регуляции вегетативных функций. Л., «Наука», 1970. 37.
8. Пушкарь Н. С., Калугин Ю. В., Николов О. Т., Степин Д. Д., Фарбер М. С., Бабийчук Г. А. Донорные свойства некоторых криозащитных веществ. Харьков, 1972.
9. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови. — В кн.: Актуальные вопросы переливания крови, 4. Л., Медгиз, 1955, 55.
10. Сыркина П. Е. Газовый анализ в медицинской практике. М., Медгиз, 1956.
11. Шраго М. И. Замораживание эритроцитов в растворах полиэтиленоксида. — Пробл. гематол., 1971, 6, 17.
12. Jalowayski A., Layterbach R., Smith B., Modell J. H. A computer method for determination of acid-base and oxygenation variables in adult and infant blood samples. — J. Lab. Clin. Med., 1968, 71, 2, 328.
13. Valeri C. R., Leroulis C. Rejuvenation and freezing of outdated stored human red cells. — New Engl. J. Med., 1972, 287, 26, 1307.

Институт проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ НА СОХРАННОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

А. М. Воротилин, С. Д. Корчиков, Л. В. Гордиенко

Интерес к использованию высокого давления при криоконсервировании биологических объектов обусловлен наличием у воды аномальных свойств: с повышением внешнего давления температура замерзания воды понижается [3].

Минимальная температура плавления льда -22° достигается при давлении 2115 атм. Дальнейшее понижение температуры приводит к образованию тетрагональной структуры льда III с плотностью $1,14 \text{ г/см}^3$, т. е. большей, чем у воды и обычного льда I.

Температура замерзания водных растворов понижается с увеличением их концентрации вплоть до эвтектической точки. При наличии внешнего давления эта зависимость смещается в область более низких температур [6]. Экспериментальные данные и теоретические рассуждения приводят к выводу, что при возрастании внешнего давления: 1) сокращается температурный интервал опасной для клеток зоны ($0^{\circ} \div 40^{\circ}$), где клетки подвергаются действию концентрированных солевых растворов и процессы рекристаллизации интенсивны; 2) понижается концентрация солевого раствора, окружающего клетки в процессе замораживания и размораживания; 3) исчезает возможность разрыва клеток кристаллами льда в случае образования его модификаций, отличных от льда I; 4) можно использовать для быстрого и равномерного по объему размораживания, поскольку энергия давления распределяется по образцу равномерно.

С повышением давления несколько увеличиваются вязкость и теплопроводность растворов, что способствует образованию мелкокристаллической структуры льда и более равномерному отогреву образца по объему.

Основанием использования внешних давлений для разработки методов криоконсервации служат также данные по влиянию их на биологические объекты при положительных температурах.

Продолжительность действия давления, темп нарастания его и сброса, состав среды, ее рН и температура влияют на резистентность клеток к давлению. Этим объясняется, по-видимому, то, что имеющиеся данные по использованию внешнего давления для криоконсервирования биологического материала носят противоречивый характер. Так, Лорант и др. [7] приходят к выводу о невозможности хранения эритроцитов при пониженных температурах под давлением, а Шварц [9] запатентовал метод и аппаратуру для длительного хранения цельной крови при температуре -13° под давлением свыше 400 атм.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2—7-дневную кровь донора центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. После удаления плазмы эритроциты в соотношении 1:1 смешивали с раствором криопротектора на физиологическом растворе. Полиэтиленовые ампулы емкостью 1 мл наполняли взвесью и плотно закрывали пробками из того же материала. Образцы помещали в камеру высокого давления. Каждый опыт повторяли 4—5 раз.

Для получения высокого давления были использованы метод «ледовой бомбы» [3] и термические свойства этилового спирта [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ

При замораживании взвеси эритроцитов с использованием ледового метода было установлено, что (таблица) экстрацеллюлярные криофилактики [8] в условиях давления лучше защищают клетки от разрушения, чем один криофилактик. (Во всех случаях, кроме ПЭО-4000, $P <$

$<0,05$). Наибольший защитный эффект давления проявляется при взвешивании клеток в растворах сахарозы от 5 до 30%-ной концентрации и в поливинилпирролидоне (ПВП). Наименьший эффект отмечен при использовании полиэтиленоксида (ПЭО).

При замораживании эритроцитов с эндоцеллюлярными криофилактиками [8] в условиях давления гемолиз клеток возрастает по сравнению с замораживанием без давления. Так, в 15—20%-ных растворах глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО), а также в 20%-ном пропи-

Т а б л и ц а

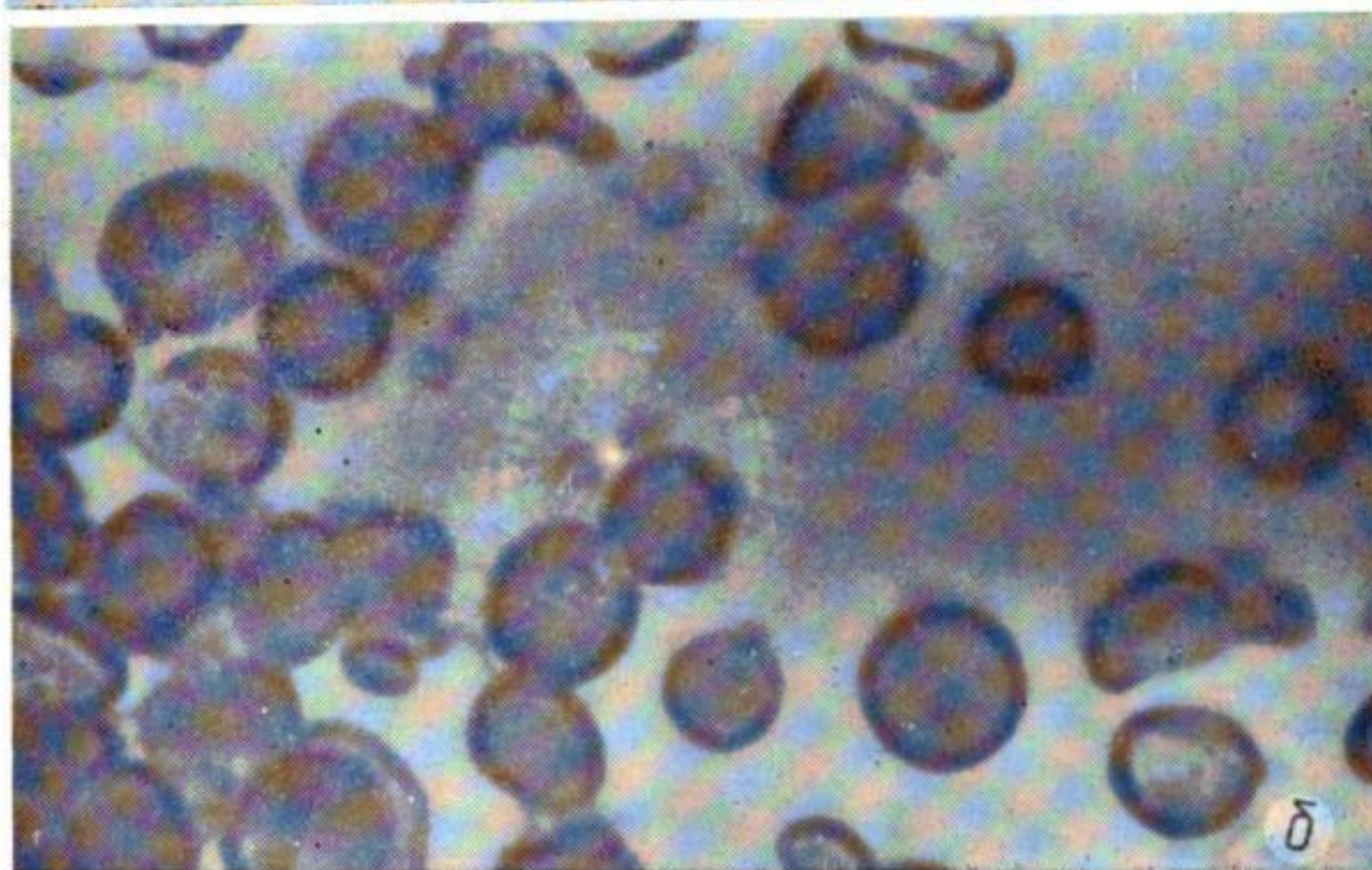
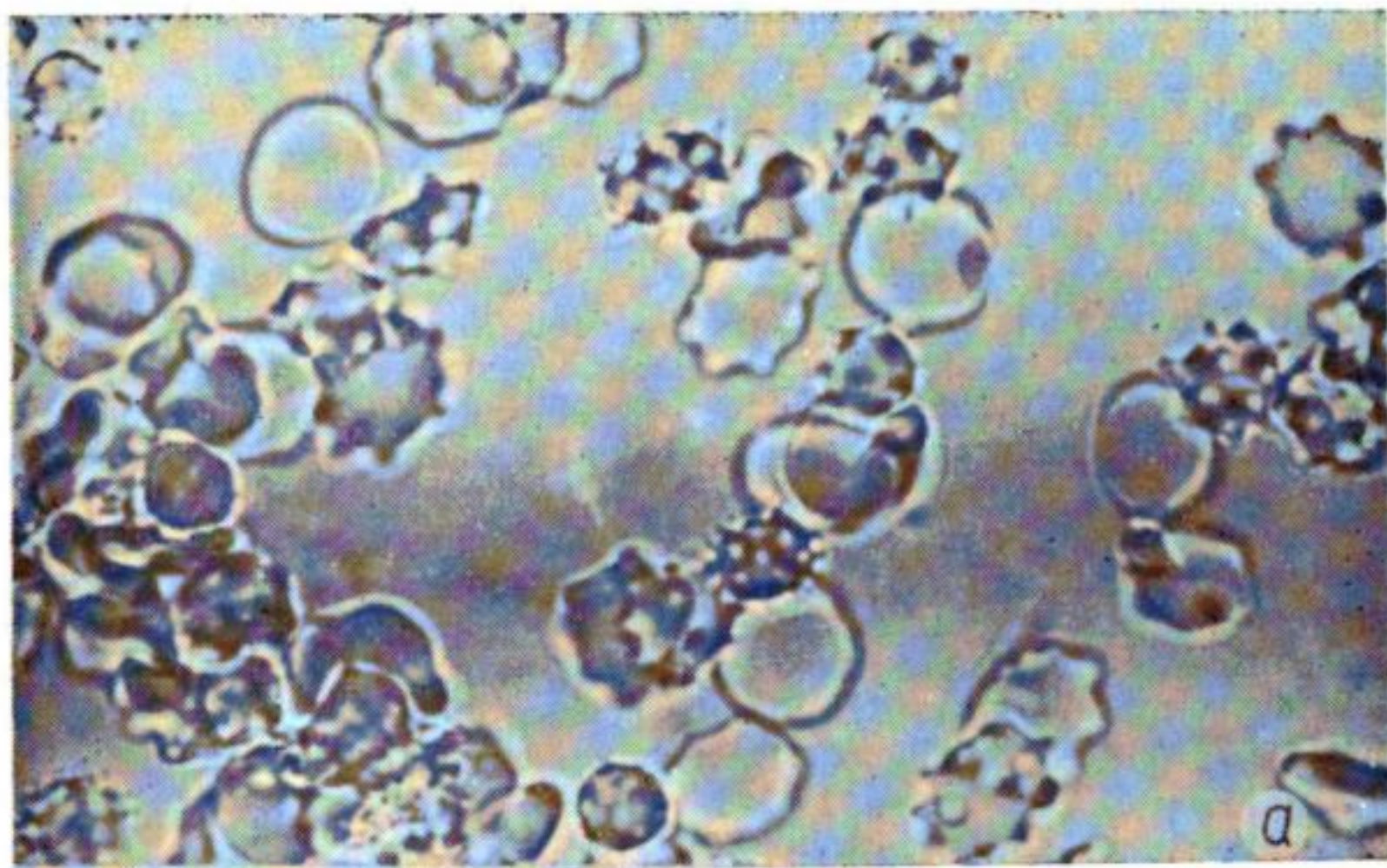
Влияние криоконсервирующей среды на защитный эффект давления

Криофилактик	Концентрация, %	Гемолиз, %	
		под давлением	без давления
Экстрацеллюлярные			
ПЭО-400	15	$9,5 \pm 0,2$	$17,0 \pm 0,7$
ПЭО-4000	15	$7,3 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,2$
Сахароза	20	$2,6 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,7$
	5	$21,0 \pm 0,8$	$51,0 \pm 4,3$
	10	$14,0 \pm 0,4$	$22,0 \pm 1,0$
	20	$10,0 \pm 0,4$	$18,0 \pm 1,0$
	30	$9,0 \pm 0,4$	$22,0 \pm 2,8$
ПВП-19900	10	$33,0 \pm 1,6$	$53,2 \pm 4,2$
ПВП-44000	10	$6,0 \pm 0,4$	$14,5 \pm 0,4$
Полиглюкин (6%-ный раствор декстрана)		$12,5 \pm 0,6$	$17,0 \pm 0,4$
Эндоцеллюлярные			
Глицерин	15	$22,6 \pm 0,9$	$11,8 \pm 0,6$
	20	$59,2 \pm 5,3$	$13,7 \pm 2,2$
ДМСО	15	$18,5 \pm 1,0$	$9,9 \pm 0,6$
	20	$31,8 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,2$
Аммоний уксусно-кислотный	15	$11,1 \pm 0,7$	$19,1 \pm 0,8$
Ацетамид	15	$15,1 \pm 0,2$	$15,6 \pm 0,5$
Пропиленгликоль	10	$45,0 \pm 2,9$	$30,0 \pm 0,82$
	20	$39,0 \pm 3,4$	$17,0 \pm 0,82$

ленгликоле гемолиз клеток под давлением возрастает более чем в 2 раза. При замораживании эритроцитов в растворах ацетамида эффект давления незначителен ($P > 0,05$).

При микроскопическом исследовании мы не наблюдали заметных изменений формы клеток после 5-минутного воздействия давления 1600 атм при комнатной температуре. После сброса давления гемолиз отсутствовал. Такая картина наблюдалась при взвешивании клеток во всех указанных выше растворах. Понижение степени гемолиза при замораживании эритроцитов под давлением в присутствии экстрацеллюлярных криопротекторов обусловлено, видимо, изменениями теплофизических свойств растворов криопротекторов. Понижение температуры замерзания раствора, понижение концентрации раствора между кристаллами льда, а также повышение вязкости и теплопроводности — таковы возможные факторы, способствующие понижению степени гемолиза клеток при замораживании под давлением.

При замораживании эритроцитов в растворах эндоцеллюлярных криофилактиков увеличение гемолиза под давлением может быть связано с более интенсивным проникновением криопротектора в клетки. При достаточно быстром сбросе внешнего давления не все проникнувшие в клетку молекулы успевают ее покинуть и она разрушается от избыточного внутреннего давления. Подтверждением этому могут служить работы по замораживанию эритроцитов под давлением 10—100 атм [5]. После отогрева эритроцитов авторы наблюдали в них множество пу-



Микрофотографии эритроцитов в 15%-ном ПЭО-4000, не подвергавшихся воздействию давления (а) и в 15%-ном ПЭО-4000 после воздействия давления 2500 атм (б). Ув. 1800.

зырьков газа. Аналогичным явлением объясняют разрушение некоторых твердых тел после резкого сброса действовавшего на них давления газа 500—10000 атм [1].

При повышении внешнего гидростатического давления до 2500—2700 атм эритроциты принимают сферическую форму.

На рисунке (а, б) представлены микрофотографии эритроцитов в 15%-ном растворе ПЭО-4000 до и после воздействия давления 2500 атм. Подобную картину наблюдали и другие авторы [4]. В 5—15%-ных растворах ПЭО-4000 и глицерина лишь иногда наблюдали следы гемолиза. В 5—15%-ных растворах ДМСО гемолиз клеток после воздействия давления достигал 6—12%. Клетки подвергались давлению при комнатной температуре. Давление повышали со скоростью 50—100 атм/мин. Экспозиция под давлением составляла 5—10 мин. Сбра-

сывали давление со скоростью 100—150 атм/мин. После более быстрого подъема и сброса давления (соответственно 250 и 500 атм/мин) и экспозиции в течение нескольких секунд при 2500 атм в 15%-ном растворе ПЭО-4000 наблюдались лишь незначительные изменения в морфологии клеток. Гемолиз эритроцитов при этом не наблюдался. Медленный сброс давления от 2500 до 1200 атм, а затем резкий сброс до 1 атм не вызывали гемолиза клеток в 20%-ном растворе ПЭО-4000, но интенсивный гемолиз наблюдается у эритроцитов, находившихся под давлением в физиологическом растворе. Первые результаты по замораживанию эритроцитов под давлением 2000—2500 атм оказались неудовлетворительными. После отогрева под давлением наблюдался интенсивный гемолиз.

Таким образом, наши исследования показали, что в средах с криопротекторами защитный эффект давления при замораживании клеток и их устойчивость к давлению зависят от величины приложенного давления, скорости его подъема и сброса, продолжительности действия давления и состава среды. Получены первые обнадеживающие результаты, требующие дальнейших исследований в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бриджмен П. В. Физика высоких давлений. М.—Л., ИЛ, 1935.
2. Кондорф П. В. Техника физико-технических исследований при высоких давлениях. М.—Л., Гостеххимиздат, 1952.
3. Лазарев Б. Г., Кан Л. Использование аномальных свойств воды при замерзании для получения высокого давления. — ЖЭТФ, 1944, 14, 10—11, 439.
4. Ebbecke V. Über sphärocytenbildung und Submikroskopische Feinstruktur der roten Blutkörperchen. — Archiv Ges. Physiol., 1937, 239, 533.
5. Haas G. J., Prescott H. E. Freezing under gas pressure: effect on cells and mechanism. — Cryobiology, 1971, 8, 4, 38.
6. Lamna A. The influence of high pressure on the freezing point of the water solutions. — Wien. Ber., 1902, 111, 2A, 316.
7. Lorant A., Lorant A. J., Angrist A., Kopman R. Storage of blood below 0°C in liquid state. — Journ. Clin. Invest., 1953, 32, 10, 1005.
8. Lovelock J. E. Protective action on neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. — Biochem. Journ., 1954, 56, 2, 265.
9. Schwartz R. E. Method for extending the useful storage period of biological substances such as blood. — Патент США № 3677022 от 18 июля 1972, кл. 62—56 (с. 12 К 1/60).

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИМОЦИТОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ (—196°)

**В. Н. Васильченко, Э. Н. Иванов,
В. С. Леонтьев, Н. С. Васильченко**

Большая роль Т-клеток в иммунитете [3, 4] предопределяет интерес к методам их выделения и длительного сохранения в жизнеспособном состоянии вне организма, в частности в связи с этим в условиях глубокого замораживания. По данным литературы [1, 9], лимфоциты крови, подвергнутые низкотемпературной консервации, сохраняют жизнеспособность и морфофункциональные свойства. Возможность низкотемпературной консервации тканевых лимфоцитов, в том числе тимоцитов, слабо отражена в литературе, что побудило нас заняться исследованием этой проблемы.

В качестве тестов функциональной активности замороженных (-196°) тимоцитов определяли: а) способность реконсервированных тимоцитов стимулировать образование эндоколоний в селезенке сублётально облученных реципиентов; б) способность реконсервированных мышинных тимоцитов обеспечивать кооперативное взаимодействие с В-клетками в иммунной реакции.

Исходные клеточные суспензии, полученные общепринятым методом из тимусов мышей СВА 6—10-недельного возраста (питомник Академии медицинских наук, Рапполово, Ленинградская область), имели жизнеспособность 82—96%. Жизнеспособными считали клетки, не окраши-

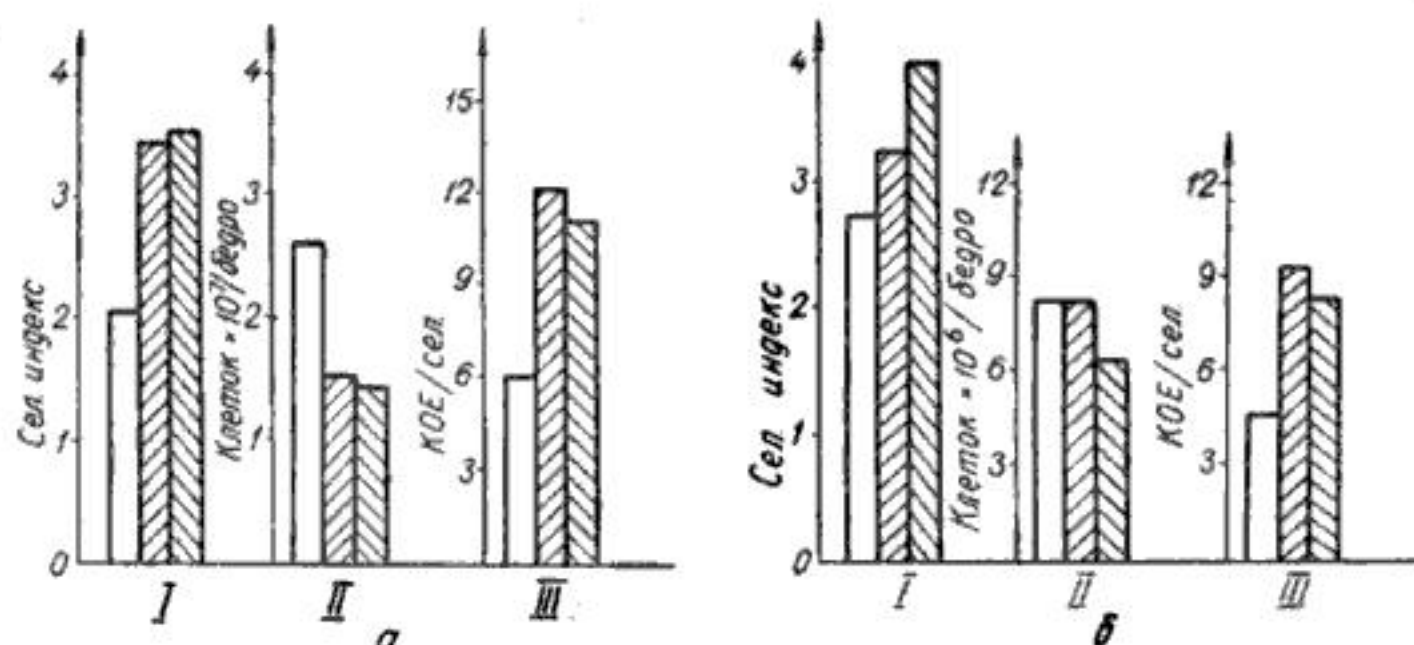


Рис. 1. Селезеночный индекс (I), содержание клеток костного мозга в бедренной кости (II) и колониеобразующих клеток в селезенке (КОЕ/сел) (III) на 9-е сутки после введения нативных и консервированных (-196°) тимоцитов нормальным (а) и тимэктомированным (б) сублётально облученным мышам СВА.

вающиеся при проведении теста с трипановым синим (0,1%-ный раствор). Неотмытый криофилактик может препятствовать проникновению красителя в мертвые клетки, что искажает результаты теста [6], поэтому жизнеспособность реконсервированных тимоцитов всегда определяли только после отмывания клеток средой Игла с желатиной и гомологичной сывороткой.

Из всех изученных методик низкотемпературной консервации клеток наиболее подходящей для тимоцитов оказалась методика быстрого охлаждения этих клеток с 5%-ным раствором диметилсульфоксида по методу Фарранта [5].

Наилучшие результаты получены при продолжительности закаливания 8—15 мин и температуре от -28° до -30° . Использование этих условий при консервации тимоцитов глубоким замораживанием позволило получить выход жизнеспособных тимоцитов до 73—75%.

Опыты по изучению влияния реконсервированных тимоцитов на эндогенное колониеобразование проводились на нормальных и тимэктомированных мышах СВА. Доза тимоцитов, введенных внутривенно сублётально облученным (425—500 p) сингенным мышам, варьировала в отдельных опытах от $1,6 \times 10^7$ до $3,6 \times 10^7$, но количество живых клеток, введенных опытным и контрольным животным, всегда было одинаковым. Вскрытие мышей-реципиентов проводилось на 9-е сутки после облучения.

Как видно из рис. 1, на котором представлены результаты опытов, введение нормальным сублётально облученным мышам (рис. 1, а) как нормальных, так и реконсервированных тимоцитов вызывает повышение селезеночного индекса, стимуляцию колониеобразования в селезенке и снижение количества костномозговых клеток в бедренных костях. У тимэктомированных мышей (рис. 1, б) стимуляция тимоцитами пролиферативных процессов в селезенке и колониеобразования выражена

так же, как у нормальных животных, но заметного выброса костномозговых клеток из бедренных костей не наблюдается, что можно объяснить особенностями гемопоэтических процессов у этих животных.

При изучении кооперативного взаимодействия в иммунной реакции В-клеток и мышинных тимоцитов, подвергнутых низкотемпературной консервации, реципиентов мышей СВА весом 18—20 г облучали дозой 750 р. Иммунизировали мышей отмытыми эритроцитами барана ($1-2 \times 10^8$). В качестве источника В-клеток применяли суспензию сингенных костномозговых клеток, полученных вымыванием бедренных костей.

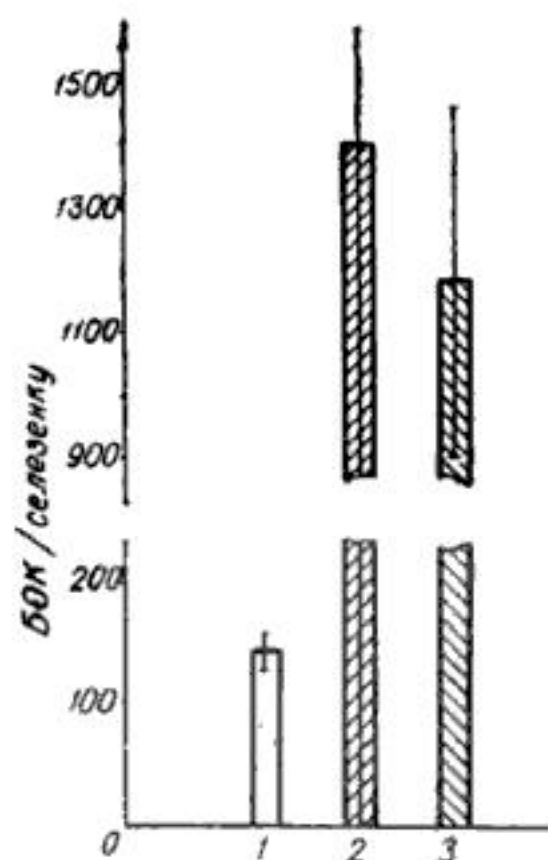


Рис. 2. Содержание гемолизинообразующих клеток в селезенке летально облученных мышей СВА на 10-й день после введения им эритроцитов барана и костного мозга сингенных мышей (1) или смеси этих клеток с нативными (2) или консервированными (3) тимоцитами. БОК — бляшкообразующие клетки.

Мышам-реципиентам одновременно с эритроцитами барана вводили костномозговые клетки, нормальные тимоциты или смесь костномозговых клеток с нормальными или реконсервированными тимоцитами в разных количественных соотношениях. Количество введенных жизнеспособных тимоцитов опытным и контрольным мышам всегда было одинаковым. В части опытов на 5-й день после первой инъекции клеток дополнительно вводили мышам смеси костномозговых клеток и эритроцитов барана. Вскрытие реципиентов проводили на 9—10-е сутки после облучения. Величину иммунной реакции определяли по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке, выявленных методом Иерне-Нордина [7]. Результаты наиболее характерной серии опытов представлены на рис. 2.

Как видно, трансплантация мышам одних костномозговых клеток приводит к появлению в селезенке $143 \pm 13,9$ АОК. При одновременном введении реципиентам смеси костномозговых клеток и тимоцитов как нормальных, так и реконсервированных происходит значительное накопление АОК. Кратность увеличения выхода АОК по сравнению с содержанием АОК у мышей-реципиентов одних костномозговых клеток более 8, что свидетельствует об эффективности взаимодействия Т- и В-клеток.

Различия в выраженности иммунной реакции у контрольных и опытных мышей статистически значимы при $P < 0,01$.

Таким образом, нами выявлено, что консервированные глубоким охлаждением тимоциты способны стимулировать эндогенное колониеобразование в селезенке сублетально облученных мышей и обеспечивать кооперативный эффект в иммунной реакции. Способность тимоцитов влиять на гемопоэтические стволовые клетки была показана Лордом и соавт. [8]. По данным этих авторов, стимулирующая активность присуща только живым тимоцитам. В наших опытах не наблюдалось резко выраженного различия в активности нормальных и реконсервированных тимоцитов. Это позволяет заключить, что низкотемпературная консервация не влияет на способность тимоцитов осуществлять контроль за процессами пролиферации стволовых кроветворных клеток у сублетально облученных животных.

Кооперативный эффект в иммунной реакции при взаимодействии с В-клетками тимоциты осуществляют за счет содержащихся в них Т-клеток. Хотя природа этого взаимодействия еще полностью не выяснена [3], несомненно, что только живые и функционально активные клетки могут осуществлять кооперативные процессы. В наших экспериментах по моделированию кооперативного эффекта консервированные ти-

моциты обеспечивали почти такое же накопление АОК в селезенках, как нативные тимоциты. Это позволяет заключить, что глубокое охлаждение тимоцитов до -196° , проводимое по измененной методике Фарранта, не влияет на их биологическую организацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Щербак Г. М., Обозный Э. П. Влияние низкотемпературной консервации на поверхностные свойства лимфоцитов крови. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974, 67.
2. Михайлова А. А., Петров Р. В. Гуморальные факторы клеточного иммунитета. — Мед. реф. журн., 1975, 21, 1, 11.
3. Петров Р. В., Чередеев А. Н. Т- и В-лимфоциты. — Успехи соврем. биол., 1974, 77, 1, 90.
4. Claman H. N., Chaperon E. A., Triplett R. Thymus — marrow cell combinations. Synergism in antibody production. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 122, 1167.
5. Farrant J., Knight S. C., McGann L. E., O'Brien J. Optimal recovery of lymphocytes and tissue culture cells following rapid cooling. — Nature, 1974, 249, 5456, 452.
6. Harris L. W., Griffiths J. B. The effect of cooling on cellular changes during the freeze-thaw cycle. — Cryobiology, 1974, 11, 1, 80.
7. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque-formation in agar by single antibody-producing cells. — Science, 1963, 140, 3565, 405.
8. Lord B. I., Schofield R. The influence of thymus cells in hemopoiesis: stimulation of hemopoietic stem cells in a syngeneic in vivo situation. — Blood, 1973, 42, 3, 395.
9. Thomson A. E., O'Connor T. W. Observations on cryopreservation of lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemic and normal human lymphocytes. — Scand. J. Haematol., 1971, 8, 425.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР
Физико-технический институт
низких температур АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

СОСТОЯНИЕ ВОДЫ В ПОЧКЕ, ПЕРФУЗИРОВАННОЙ РАСТВОРАМИ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА С МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВЕСОМ 400

*В. К. Дворцовой, В. И. Митасов,
А. Л. Марковский, В. А. Моисеев*

Трансплантация жизненно важных органов зависит не только от хирургической техники, но и от разработки эффективных методов получения и консервации жизнеспособных трансплантатов. Роль консервации особенно возрастает при пересадках трупных органов.

В последние годы достигнут определенный прогресс в низкотемпературной консервации тканей с использованием криопротекторных веществ. Применение криопротекторных веществ основано на предположении, что одним из проявлений их защитного действия является увеличение дегидратации тканей, которое приводит к ослаблению процессов кристаллизации и связанным с ним проявлением влияния различных экстремальных факторов, обусловленных действием низких температур.

В настоящей работе произведено изучение диэлектрической проницаемости (ϵ') ткани почки, перфузированной при 37° криопротектором полиэтиленоксидом с молекулярным весом 400 (ПЭО-400).

В диапазоне сверхвысоких частот (СВЧ выше 1 ГГц) в диэлектрическую проницаемость основной вклад вносит свободная вода. Уменьшение ориентационной подвижности воды в системе, переход ее в свя-

занное состояние, приводит к уменьшению диэлектрической проницаемости. Измерение высокочастотного декремента позволяет определить количество связанной воды в системе.

Исследования проводили на почках кролика. Под гексеналовым наркозом производили срединную лапаротомию. В области почечных сосудов рассекали париентальную брюшину, выделяли и канюлировали почечные сосуды. Почки извлекали из организма и помещали в термостатируемую камеру, а затем подключали к перфузионному аппарату. Время ишемии 5—8 мин. Изолированные почки перфузировали пульсирующим потоком растворов Хэнкса и ПЭО-400 в концентрациях 5%-, 10%-, 15%-, 20%-, 30%- и 40%-ной в течение 30, 60 и 120 мин. Перфузионное давление поддерживали на уровне 60 мм рт. ст.; объем перфузии — 15 мл в 1 мин.

Измерение диэлектрической проницаемости резонаторным методом на частоте 10 ГГц проводили, используя ткань почки после перфузии (при температуре 25° в процессе измерения).

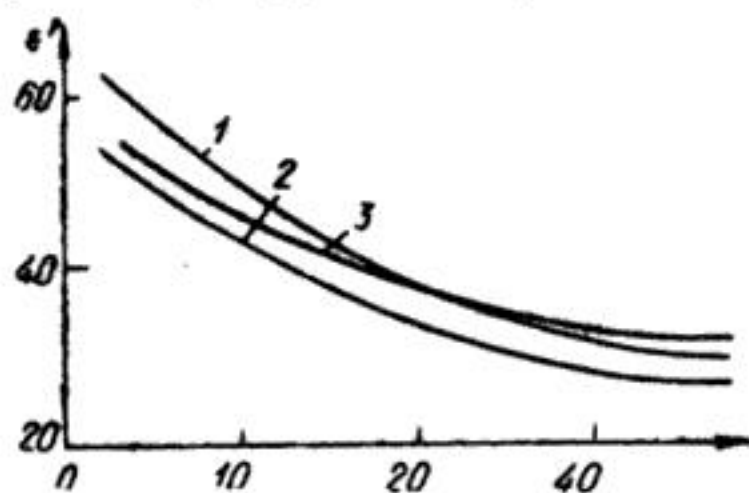


Рис. 1. Зависимость диэлектрической проницаемости (ϵ') ткани почки от концентрации ПЭО-400 и времени перфузии:

1 — 30 мин; 2 — 60 мин; 3 — 120 мин.

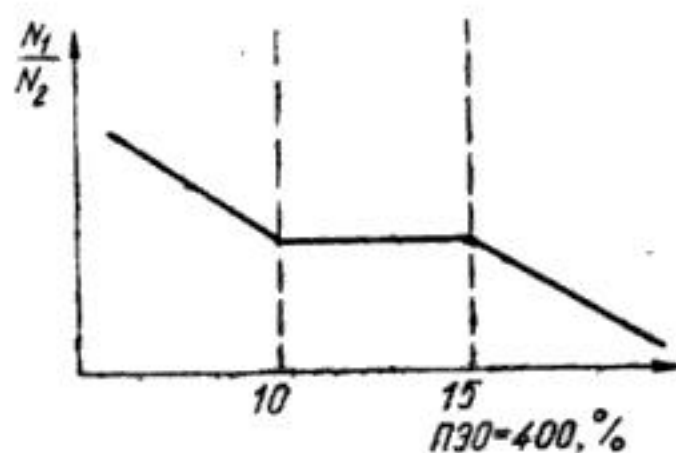


Рис. 2. Соотношение свободной (N_1) и связанной (N_2) воды в ткани почки, перфузированной различными концентрациями ПЭО-400.

Величинами, необходимыми для определения диэлектрической проницаемости, являются собственная частота и добротность резонатора с пустым капилляром и капилляром, заполненным исследуемой средой. Параметры резонатора в используемом диэлектрометре определяли на основе анализа резонансных кривых. Точность относительных измерений ϵ' составляла 0,1%.

Результаты исследования ткани нативной и перфузированной почки в зависимости от концентрации ПЭО-400 в перфузате и времени перфузии представлены на рис. 1. Увеличение концентрации ПЭО-400 в перфузате уменьшает ϵ' ткани, а время перфузии существенно не изменяет ее диэлектрическую проницаемость.

Расчет содержания связанной воды в ткани почки производился по формуле

$$N_2 = N_1 \left(1 - \frac{\epsilon_2}{\epsilon_1} \right),$$

где N_1 — количество свободной воды в почке, ϵ_1 — диэлектрическая проницаемость воды, ϵ_2 — диэлектрическая проницаемость ткани почки.

Зависимость соотношения свободной (N_1) и связанной (N_2) воды в ткани перфузированной почки от концентрации криопротектора в перфузате представлена диаграммой (рис. 2), из которой видно, что на первом этапе перфузия раствором Хэнкса и 5%-ным ПЭО-400 вызывает увеличение свободной воды в ткани почки, свидетельствующее о развивающемся отеке; на втором этапе в области 10—15%-й концентрации ПЭО-400 в перфузате соотношение свободной и связанной воды в ткани почки не изменяется по сравнению с нативной почкой; на третьем этапе при концентрации ПЭО-400 в перфузате больше 15%-ной количество свободной воды в ткани почки уменьшается.

Таким образом, применение СВЧ-диэлектрометрии позволяет оценить динамику состояния воды в ткани почки, перфузированной ПЭО-400.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в январе 1975 г.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОЧЕК НА ПЕРВЫХ ЭТАПАХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

В. Ф. Козлова, В. К. Дворцовой

Решение проблемы криоконсервации почки зависит от тщательной отработки режимов замораживания-оттаивания и, прежде всего, от успешного проведения предварительного этапа — перфузии органа с эффективным криопротектором.

Перфузируя почки кроликов такими криопротекторами, как глицерин, диметилсульфоксид и этиленгликоль, Пэгг [3] установил, что они оказывают токсическое действие, особенно диметилсульфоксид. Наилучшие результаты были получены им при гипотермической перфузии почек глицерином. Однако применение последнего в качестве криозащитного агента осложняется необходимостью удаления его перед пересадкой органа.

Н. С. Пушкарь и др. [2], учитывая эффективность криопротекторных свойств и малую токсичность полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400), предполагают возможность применения его в качестве криофилика при низкотемпературной консервации почек.

Задачей настоящего исследования явилось изучение особенностей микроскопического строения почек, перфузированных при разных температурных условиях растворами, содержащими ПЭО-400.

Материалом для исследования служили 18 почек кроликов, подвергнутых изолированной нормо- и гипотермической (24—25°) пульсирующей перфузии 10%-ным ПЭО-400 на растворе Хэнкса в течение 30 мин. В качестве контроля использованы 16 почек кроликов, перфузированных в тех же условиях раствором Хэнкса, и 7 интактных почек. Фиксация материала проводилась в 10%-ном растворе нейтрального формалина; окраска парафиновых срезов — гематоксилин-эозином, по Ван Гизон; определение кислых и нейтральных белково-углеводных комплексов, входящих в состав базальных мембран и других структурных элементов почки, — комбинированным методом (альциановый синий + PAS-реакция) по Моури [1].

При гистологическом и гистохимическом исследовании установлено, что в интактных почках кроликов строение нефронов обычное.

В почках кроликов, подвергнутых нормо- и гипотермической изолированной пульсирующей перфузии раствором Хэнкса в течение 30 мин, отмечается в основном удовлетворительное выведение крови из сосудистого русла и сохранность структуры нефронов. Большинство сосудистых клубочков лишены крови, стенка их наружной капсулы растянута, истончена, полость капсулы увеличена. Некоторые клубочки отечны. Часть эпителия извитых канальцев имеет признаки зернистой и гидропической дистрофии. Полости многих прямых канальцев и собирательных трубок содержат альциановильную жидкость. Структура тонкой части петли и дистального отдела нефронов хорошо сохранена. В ряде случаев перфузия препятствовала развитию аутолитических процессов в эпителии проксимальных извитых канальцев. Базальные мембраны стенки канальцев без повреждений и дают четкую PAS-положительную реакцию; соединительнотканная основа органа сохраняет

тинкториальные свойства. Крупные кровеносные сосуды как коркового, так и мозгового вещества лишены крови, имеют растянутые, несколько разрыхленные стенки, эндотелий местами поврежден. В почках, подвергнутых гипотермической перфузии раствором Хэнкса, по сравнению с нормотермической перфузией, кровеносные сосуды характеризуются относительной целостностью.

Морфологическое исследование почек кроликов, подвергнутых нормотермической перфузии 10%-ным раствором ПЭО-400 в среде Хэнкса, в большинстве случаев показало удовлетворительное выведение крови из сосудистой сети почки. Сосудистые клубочки и система канальцев почки сохраняют общий план строения, однако заметно их обезвоживание: местами наблюдается сжатие клубочков, истончение их наружной капсулы и увеличение полости, уплощение эпителиальной выстилки канальцев при сохраненных базальных мембранах. Структура ткани мозгового вещества хорошо сохранена. Не изменены тинкториальные свойства стромы органа.

В единичных случаях неудовлетворительно проведенной перфузии кровь не полностью выведена из сосудистого русла. В таких почках варьируют размеры сосудистых клубочков — одни нередко сжаты, другие отечны. Значительные патологические изменения наблюдаются в эпителии извитых канальцев: зернистая и гидропическая дистрофии, набухание, отек, десквамация клеток. Просветы канальцев заполнены белковыми массами и десквамированными клетками. Эндотелий сосудов поврежден. Изложенное выше свидетельствует о необходимости тщательного вымывания крови при перфузии почек.

В почках, подвергнутых изолированной гипотермической пульсирующей перфузии 10%-ным ПЭО-400 на среде Хэнкса, наблюдалось удовлетворительное выведение крови из сосудов коркового и мозгового вещества и сохранение основных структурных элементов паренхимы и стромы. Паренхима органа умеренно обезвожена. Относительной целостностью характеризуется интима сосудов. Базальные мембраны без повреждений, PAS-положительны. Тинкториальные свойства стромы почек сохранены.

На основании изложенного можно сделать следующее заключение. 1. Применяемые методы перфузии в основном обеспечивают удовлетворительное выведение крови из сосудистой системы, препятствуют развитию аутолитических процессов в нефроне, но способствуют развитию некоторых дистрофических изменений в эндотелии сосудов. 2. Применение ПЭО-400 в составе перфузата не вызывает изменения основных структурных элементов нефронов и приводит лишь к некоторому уплощению эпителия канальцев, по-видимому, связанному с его дегидратирующим действием. Эффект дегидратации клеток является необходимым этапом криозащиты при действии низких температур и может рассматриваться как подготовка ткани к криоконсервации. 3. По данным микроскопического исследования почек, гипотермическая перфузия с ПЭО-400 обладает более щадящим воздействием, чем нормотермическая перфузия, проводимая при тех же условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. М., «Мир», 1969.
2. Пушкарь Н. С., Калугин Ю. В., Шенберг М. Г., Карева Л. В., Суббота Н. П., Михайличенко З. П. О распределении полиэтиленоксида в органах и скорости его выделения. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974, 86.
3. Pegg D. E. Perfusion of rabbit kidneys with cryoprotective agents. — *Cryobiology*, 1972, 9, 5, 411.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в январе 1975 г.

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М. Г. Шенберг

Анализ морфологических проявлений секреторного цикла щитовидной железы дает возможность получить довольно существенную информацию о состоянии органа [3].

Задачей настоящей работы явилось гистологическое исследование трансплантатов щитовидной железы, подвергнутых замораживанию-оттаиванию и пересаженных тиреоидэктомированным животным. Контролем служили трансплантаты нативных щитовидных желез, изъятые из организма тиреоидэктомированных животных-реципиентов.

Опыты проводили на белых крысах-самцах весом 140—160 г. Щитовидные железы крыс-доноров перфузировали *in situ* раствором Хэнкса, содержащим 30% ПЭО-400, и замораживали в полиэтиленовых ампулах по двухэтапной программе до -196° с последующим отогревом при 37° [2, 4, 6].

Трансплантаты пересаживали под кожу передней брюшной стенки реципиентов через 20 дней после тиреоидэктомии (эксперименты проводились сотрудниками отдела трансплантации Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР).

Нативные трансплантаты изучали через 10, 20 и 30 дней, а криоконсервированные — через 20, 30 и 60 дней после пересадки. Материал фиксировали в 10%-ном формалине и Ценкер-формоле. Окраска парафиновых срезов производилась гематоксилин-эозином, по Ван-Гизон, азаном, по Маллори—Гейденгайну, альциановым синим — ШИК по Моури. Всего исследовано 87 нативных и криоконсервированных трансплантатов щитовидных желез.

Нативные трансплантаты. Через 10 дней после пересадки в 9 из 15 исследованных трансплантатов были обнаружены фолликулы разной величины, часть которых имела морфологические признаки функциональной активности — призматический фолликулярный эпителий, коллоид, содержащий резорбционные вакуоли (таблица). Наряду с тканью,

Т а б л и ц а
Наличие признаков морфологической активности
в фолликулах аллотрансплантатов щитовидных желез
в зависимости от сроков после пересадки

Срок после пересадки	Нативные трансплантаты		Криоконсервированные трансплантаты	
	Всего	С признаками активности	Всего	С признаками активности
10 дней	15	9	—	—
20 "	15	0	23	0
30 "	20	2	10	0
60 "	—	—	4	3
Итого	50	11	37	3

частично сохранившей нормальную дифференцировку, встречаются мононуклеарные клетки, расположенные диффузно либо в виде скоплений. В остальных 6 трансплантатах железистая паренхима замещена мононуклеарами и волокнистой соединительной тканью.

Через 30 дней после пересадки примерно половина железистой паренхимы в 15 трансплантатах была замещена или находилась в процессе замещения волокнистой соединительной тканью и мононуклеарами, среди которых преобладали лимфоидные клетки. Остальная часть трансплантатов содержала фолликулы, стенки которых состояли из уплощенных, реже кубических, тиреоцитов. Коллоида было мало, наблюдалась десквамация эпителия.

Через 30 дней после имплантации щитовидных желез в 10 трансплантатах из 20 отмечалось полное замещение железистой паренхимы мононуклеарными клетками и прослойками коллагеновых волокон. В других 10 трансплантатах наблюдалась разная степень сохранности фолликулов, в которых высота тиреоцитов и консистенция интрафолликулярного коллоида варьировали: от плоских и кубических клеток и густого коллоида до высокопризматических тиреоцитов и коллоида с резорбционными вакуолями (морфологически активные фолликулы встречались только в двух трансплантатах). Во всех препаратах много десквамированных тиреоцитов.

Криоконсервированные трансплантаты. Через 20 дней после пересадки щитовидных желез при гистологическом исследовании 23 трансплантатов было обнаружено, что они состоят из мононуклеарных клеток, среди которых встречались тучные и плазматические клетки; много мелких кровеносных сосудов, в просвете которых отмечены лимфоидные клетки. Через 30 дней после имплантации в 10 исследованных трансплантатах также отметили отсутствие фолликулов. Под хорошо развитой соединительнотканной капсулой, от которой вглубь шли тонкие прослойки, находились лимфоидные клетки.

Через 60 дней после пересадки было исследовано четыре трансплантата. В трех из них на периферии наблюдались сравнительно крупные фолликулы, стенка которых состояла из высоких тиреоцитов с куполообразным выпячиванием на апикальном конце. Интерфолликулярный коллоид вакуолизирован, в центре его — ядра тиреоцитов. Капилляры, опоясывающие фолликулы, инъецированы кровью. Мелкие фолликулы содержали более густой коллоид; кроме того, наблюдались вновь образованные фолликулы, лишенные коллоида.

Наряду с морфологическими признаками гиперфункции отмечали деструкцию ряда фолликулов с десквамацией эпителия. В центральной части трансплантатов имелись лимфоидные инфильтраты. В одном трансплантате этого срока произошло полное замещение железистой ткани мононуклеарными клетками.

Таким образом, при пересадке нативных щитовидных желез наблюдается их деструкция, связанная с иммунологической реакцией организма реципиентов на аллогенную ткань. Следует отметить, однако, что в отдельных случаях в 30-дневных трансплантатах появляются участки с морфологическими признаками функциональной активности ткани. Они могут свидетельствовать либо об адаптации организма к аллотрансплантатам, либо о большей совместимости ткани донора и реципиента в этих экспериментах.

В условиях криоконсервации, как видно из приведенных данных (таблица), в щитовидной железе могут сохраняться участки железистой ткани, клетки которой способны к пролиферации, в результате чего на более поздних стадиях (60 дней) в трансплантатах происходит регенерация и новообразование фолликулов, способных к активной выработке гормонов. В литературе имеются указания на то, что структурные единицы щитовидной железы устойчивы к воздействию низких температур [5, 7]. Известно также, что криоконсервированные ауто- и аллотрансплантаты щитовидных желез нет смысла исследовать ранее, чем через 20 дней после их имплантации [5]. В исследованном нами материале исход трансплантации осложнился иммунологическим конфликтом, в результате чего у реципиентов происходило замещение железистой ткани лимфоидными клетками. Аналогичные результаты трансплантации приводит Л. И. Беличенко [1], замораживавший щитовидные железы под защитой поливинилпирролидона. Наличие морфологических признаков активности фолликулов в ряде нативных 30-дневных и криоконсервированных 60-дневных аллотрансплантатов свидетельствует о необходимости проведения подобных экспериментов на инбредных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беличенко Л. И. Ауто- и гомопластика как критерий эффективности консервирования щитовидной железы замораживанием. — В кн.: Гематология и переливание крови, вып. 8. Киев, «Здоров'я», 1973, 97.
2. Брук Г. З., Даценко Б. М., Емец Б. Г., Калугин Ю. В., Леонов Б. Н., Моисеев В. А., Наконечный А. А., Степин Л. Д. Количественная оценка степени насыщения органа криопротектором при гипотермической перфузии. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Материалы VI Всесоюз. конф. Рига, 1972, 419.
3. Васильев Г. А., Медведев Ю. А., Хмельницкий О. К. Щитовидная железа. — В кн.: Эндокринная система при кислородном голодании. Л., «Наука», 1974, 50.
4. Даценко Б. М., Чуйко В. А., Брук Г. З., Пышкина Т. А., Алюшина А. А. Трансплантация щитовидной железы, консервированной замораживанием (-196°). — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974, 49.
5. Мицкевич М. С. Восстановление функциональной активности ткани щитовидной железы после глубокого охлаждения (-196°). Известия АН СССР, сер. биол., 1958, 2, 149.
6. Пушкарь Н. С., Калугин Ю. В., Даценко Б. М., Степин Л. Д., Емец Б. Г., Онищенко Н. А., Брук Г. З. Влияние полиэтиленоксида на состояние воды в органах и тканях. Харьков, 1972.
7. Смит О. Щитовидная железа и паращитовидные железы. — В кн.: Биологическое действие замораживания и переохлаждения. М., ИЛ, 1963, 247.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

РЕАКЦИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ НА ГОМОТРАНСПЛАНТАЦИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ — СВЕЖЕЙ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ (-196°)

В. А. Чуйко, Г. А. Онуфриева, В. И. Митасов

Изучение реакции организма на пересаживаемую ткань приобретает особый смысл в случае использования криоконсервированного биологического материала, т. е. ткани, подвергшейся интенсивному действию таких факторов, как насыщение криопротекторами и замораживание-оттаивание.

В настоящей работе проводилась сравнительная оценка влияния гомотрансплантации свежей и криоконсервированной щитовидной железы на кору надпочечников — одно из важнейших звеньев защитно-приспособительной и гомеостатической деятельности организма [1].

Опыты проводились на крысах-самцах линии Вистар (вес 125—140 г). Щитовидные железы пересаживали под кожу, в карман передней складки брюшка животным с предварительно удаленной щитовидной железой. Низкотемпературная консервация щитовидных желез проводилась по известной методике с применением криопротектора полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 [2].

Реакция коры надпочечников на трансплантацию оценивалась по изменению уровня 11-ОКС в крови [5]. Наблюдения проводили в сроки — 6, 12, 18, 30 и 45-е сутки. При проведении опытов с функциональной нагрузкой АКГГ (доза — 15 ед/кг веса) исследования проводились на 12, 18 и 30-е сутки после трансплантации.

Результаты исследований представлены на рис. 1 и 2, из которых следует, что тиреоидэктомия уже на 6-е сутки сопровождается снижением содержания 11-ОКС в крови.

Восстановление нормального уровня и дальнейшее повышение содержания 11-ОКС у тиреоидэктомизированных животных отмечается между 18- и 30-ми сутками. На 30-е сутки после тиреоидэктомии содержание 11-ОКС на 15% превышает исходный уровень. Трансплантация щитовидной железы тиреоидэктомизированным животным как свежей, так и криоконсервированной приводит к более раннему восстановлению уровня 11-ОКС в крови. На 6-е сутки после трансплантации

уровень 11-ОКС незначительно отличается в группах с пересадкой свежей и консервированной железы и достигает исходных значений и даже превышает их. К 12-м суткам в обеих группах отмечается значительное превышение исходного уровня 11-ОКС (на 50%).

К 18-м суткам содержание 11-ОКС в группе с трансплантацией криоконсервированной щитовидной железы составляет 60 мкг/100 мл крови, что в 3 раза больше значения в контрольной группе. В то же время максимальный уровень 11-ОКС в группе с трансплантацией свежей щитовидной железы наблюдается на 12-е сутки, причем содержание гормонов превышает исходные значения на 50% (см. рис. 1).

Таким образом, пересадка криоконсервированной щитовидной железы приводит к значительно более выраженному повышению уровня 11-ОКС в крови, чем пересадка

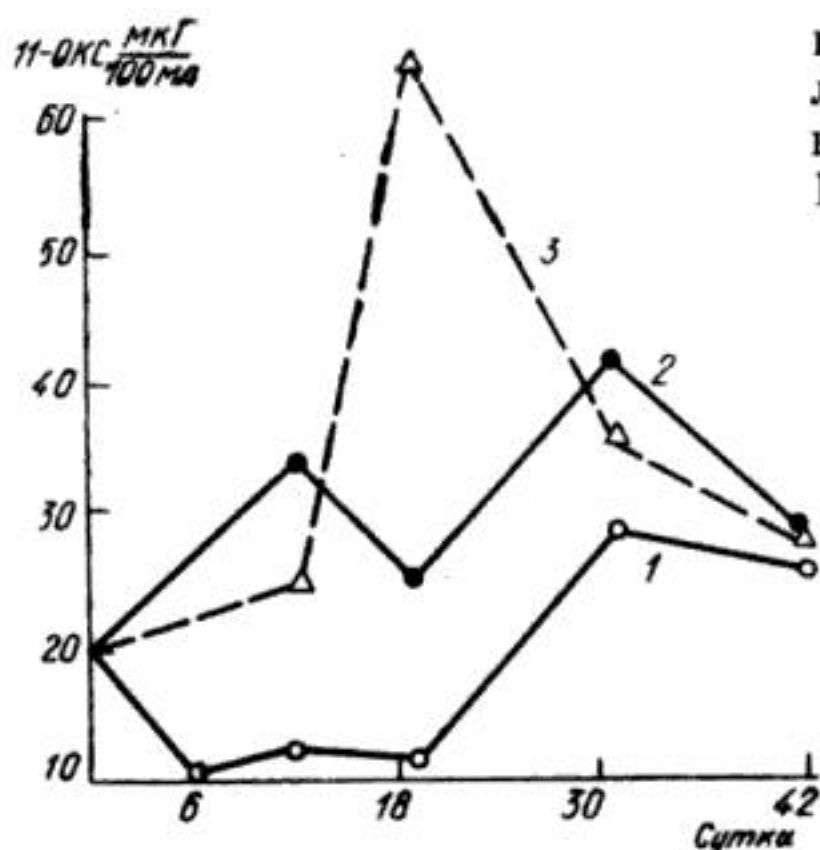


Рис. 1. Содержание 11-ОКС в плазме периферической крови тиреоидэктомизированных крыс после трансплантации им свежей и криоконсервированной (-196°) щитовидной железы:

1 — тиреоидэктомия; 2 — тиреоидэктомия и трансплантация свежей щитовидной железы; 3 — тиреоидэктомия и трансплантация замороженной щитовидной железы.

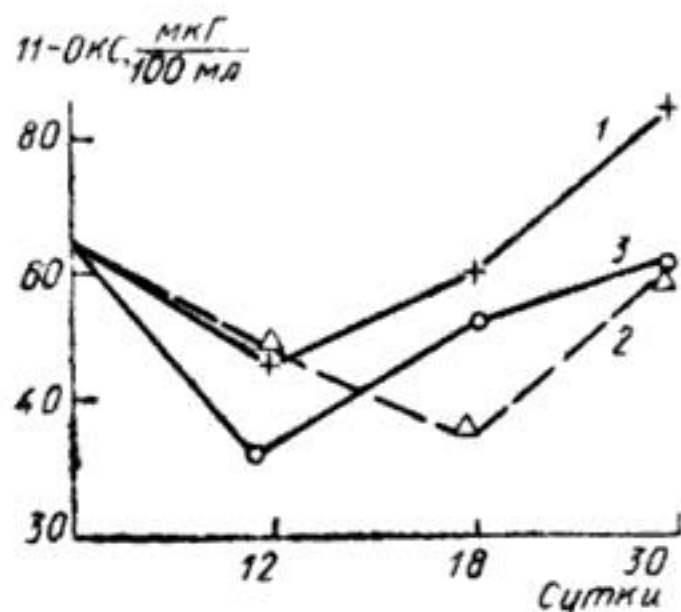


Рис. 2. Содержание 11-ОКС в плазме периферической крови тиреоидэктомизированных крыс после трансплантации им свежей и криоконсервированной (-196°) щитовидной железы при введении АКТГ:

1 — тиреоидэктомия; 2 — тиреоидэктомия, трансплантация свежей щитовидной железы и введение АКТГ; 3 — тиреоидэктомия, трансплантация замороженной щитовидной железы и введение АКТГ.

свежей щитовидной железы. Обращает внимание различие между исследуемыми группами в характере развития реакции коры надпочечников. При пересадке консервированной железы стимуляция коры надпочечников носит несколько замедленный характер (максимум — на 18-сутки), однако она гораздо более выражена в количественном отношении (200% против 50% при трансплантации свежей железы).

При исследовании чувствительности коры надпочечников к АКТГ в группах животных с трансплантацией щитовидных желез обнаруживается определенная депрессия исследуемой реакции, что, по-видимому, является следствием тиреоидэктомии. Наиболее отчетливо это проявляется на 12-е сутки. К 18-м суткам отмечено восстановление чувствительности коры надпочечников к АКТГ во всех группах, хотя при пересадке свежей железы эта реакция выражена несколько меньше. К 30-м суткам восстановление чувствительности коры надпочечников к АКТГ обнаруживается у всех исследуемых животных, причем качественные различия между группами отсутствуют.

Таким образом, тиреоидэктомия приводит к угнетению реакции коры надпочечников на АКТГ. Трансплантация щитовидной железы как свежей, так и криоконсервированной сопровождается восстановлением чувствительности данного органа к АКТГ.

Можно допустить, что повышение уровня 11-ОКС является либо результатом иммунологической реакции организма на чужеродную ткань [4], либо выражением наличия взаимозависимых функциональных связей между гипофизарно-адреналовой и гипофизарно-тиреоидной системами [3].

Вполне допустимо, что в основе активирующего влияния гомотрансплантации щитовидной железы на кору надпочечников лежит комбинированное действие рассмотренных выше факторов — иммунных реакций и особенностей межэндокринных отношений.

Различия в характере реакции коры надпочечников на трансплантацию свежей и криоконсервированной щитовидной железы следует объяснять особенностями структурно-функциональных изменений, возникающих в тканях при их замораживании-оттаивании. Некоторая замедленность реакции коры надпочечников на трансплантацию зависит, по-видимому, от более позднего по сравнению с нативным трансплантатом восстановления метаболической активности криоконсервированной ткани [2].

Причиной более выраженной реакции на криоконсервированный трансплантат является, возможно, раздражающее действие освобождающихся в значительных количествах под влиянием замораживания-оттаивания белковых соединений — некоторых лизосомальных и цитоплазматических ферментов [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Беличенко Л. И. Ауто- и гомопластика как критерий эффективности консервирования щитовидной железы замораживанием. — В кн.: Гематология и переливание крови. Киев, «Здоров'я», 1973, 97.
2. Даценко Б. М., Чуйко В. А., Пышкина Т. А., Брук Г. З., Алюшина А. А. Трансплантация щитовидной железы, консервированной замораживанием (-196°C). — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974, 49.
3. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М., «Медицина», 1960.
4. Семенов В. Ф., Молотков О. В. Уровень кортикостерона у инбредных мышей и проявление иммунологической реакции на слабые трансплантационные антигены. — ДАН СССР, 1974, 214, 6, 1437.
5. Усватова И. Я., Панков Ю. А. Флюориметрические методы определения кортикостероидов в плазме крови. — В кн.: Современные методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях. М., «Медицина», 1963, 38.
6. Jouan P. Recherches sur les relations thyro-carcicosurrenales. Thèse présent des sciences de l'Université de Rennes pour obtenir le grade de docteur des sciences naturelles. — Lons-le-Saunier, 1961.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в ноябре 1974 г.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА С МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВЕСОМ 400 И ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМА ИНКУБАЦИИ НА СИНТЕЗ БЕЛКА И ПОТРЕБЛЕНИЕ КИСЛОРОДА ТКАНЬЮ КСЕНОКЛАПАНОВ АОРТЫ

**Ю. И. Пономарев, А. К. Гулевский,
Э. П. Обозный, В. П. Чеканов**

Широкое применение протезирования сердечных клапанных пороков биологическими трансплантатами, в частности алло- и ксеноклапанами аорты [1], выявило недостатки и преимущества метода и определило пути дальнейших исследований. Центральным вопросом этой проблемы остается способ консервации аортальных клапанов.

Существующие методы консервации: обработка 1%-ным раствором бета-пропиолактона с последующим хранением в среде Хэнкса,

хранение в 4%-ном формальдегиде, гамма-облучение и хранение в глицерине при температуре -79° , приводят к развитию поздней недостаточности трансплантата [7], тогда как протезирование нативными гомотрансплантатами значительно уменьшает вероятность возникновения поздней недостаточности клапана и увеличивает процент выживания больных в отдаленном периоде [4].

Литературные данные и опыт криоконсервации различных биологических объектов свидетельствуют, что применение сверхнизких температур с криопротекцией может быть использовано для долгосроч-

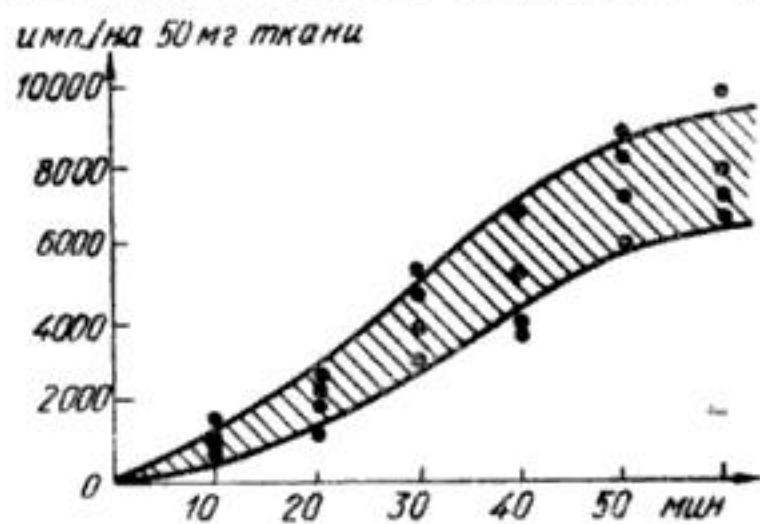


Рис. 1. Зависимость включения C^{14} -аминокислот в клетки ксеноаортального клапана от времени инкубации. По оси ординат — уровень синтеза белка.

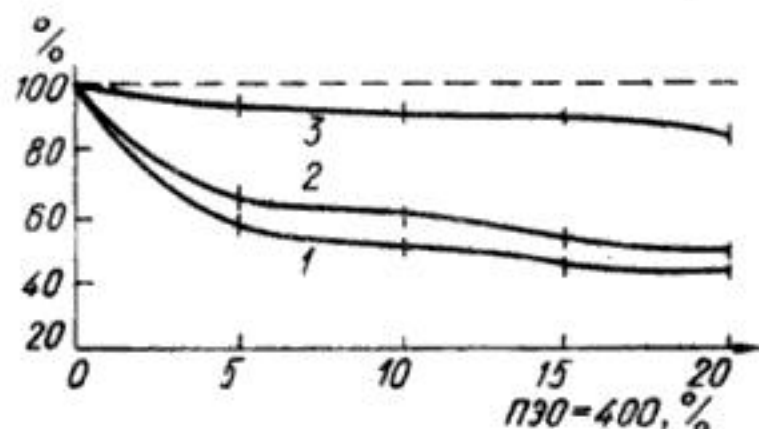


Рис. 2. Влияние температурного режима инкубации с ПЭО-400 на синтез белка в ткани ксеноаортального клапана:

1 — нормотермическая инкубация без отмывки; 2 — нормотермическая инкубация с отмывкой; 3 — гипотермическая инкубация с отмывкой. Здесь и на рис. 3 уровень синтеза белка в нативной ткани принят за 100% (по оси ординат).

ной консервации аортальных клапанов с сохранением их биологической полноценности.

Известно, что применение криопротекторов вследствие осмотических явлений [5] и взаимодействия с некоторыми макромолекулами может влиять на жизнеспособность ткани клапана. Показано, что токсическое действие криопротекторов снижается при эквilibрации в гипотермических условиях [6].

Целью данной работы явилось изучение влияния криопротектора полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) и температурного режима инкубации на жизнеспособность ткани ксеноклапанов аорты, которую оценивали по состоянию уровня белкового синтеза и тканевого дыхания.

Синтез белка в клетках ксеноаортального клапана определяли с помощью C^{14} -аминокислот (нитролизат белков хлореллы). Навеску створки клапана (50 мг) инкубировали с C^{14} -аминокислотами в 1 мл среды Хэнкса, содержащей 0,5 мкюри радиоактивной метки, в течение 1 ч; после окончания инкубации реакцию останавливали путем помещения проб в ледяную баню и добавления 10%-ной трихлоруксусной кислоты, затем пробы гомогенизировали и обработку белков проводили по методу Шнайдера [3]. Фильтры с радиоактивными белками просчитывали на сцинтилляционном счетчике SL-40 (Франция) в толуольном сцинтилляторе.

Дыхание клеток ксеноаортального клапана изучали на микрореспирометре конструкции В. Г. Шахбазова [2]. Навеску ткани клапана (500 мг) помещали в ячейку и измеряли потребление кислорода при температуре 37° за 15 мин, с последующим пересчетом на потребление кислорода 1 г ткани за 1 ч инкубации.

Как видно из рис. 1, максимальное включение аминокислот в ткань ксеноаортального клапана наступает к 60-й минуте, это и определило время инкубации в последующих экспериментах.

Анализируя данные, представленные на рис. 2, можно отметить резкое снижение включения аминокислот по мере увеличения концентрации ПЭО-400 в инкубационной среде при нормотермической инкубации. Исходя из литературных данных, этот эффект можно объяснить либо замедлением проникновения метки в силу повышения осмотического давления в экстрацеллюлярной среде [5], либо непосред-

ственным ингибированием процессов белкового синтеза. Последующее нормотермическое отмывание криопротектора раствором Хэнкса лишь частично восстанавливает уровень белкового синтеза.

Иная картина наблюдается при гипотермической ($+4^{\circ}$) инкубации и отмывке: удаление криопротектора из инкубационной среды приводит к практически полной нормализации уровня белкового синтеза в ткани клапана, предварительно инкубированного с ПЭО-400 в 5—15%-ной концентрации. При гипотермической инкубации с 20%-ным ПЭО-400 и последующей отмывкой намечается некоторое падение уровня белкового синтеза.

Рис. 3 показывает, что гипотермическая инкубация с ПЭО-400 в концентрациях 5—20% с последующей гипотермической отмывкой приводит к незначительному снижению уровня поглощения кислорода.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что гипотермия при инкубации с ПЭО-400 благоприятствует сохранению жизнеспособности клеток ксеноаортального клапана.

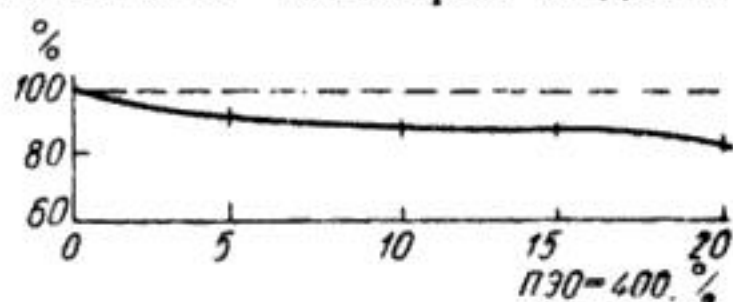


Рис. 3. Уровень поглощения кислорода тканью ксеноаортального клапана после гипотермической инкубации с ПЭО-400.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петровский Б. В., Зубарев Р. П., Козлов В. А. Многоклапанное протезирование при сочетанных ревматических пороках сердца. — Грудная хирургия, 1972, 5, 3.
2. Шахбазов В. Г. Методика изучения дыхания семян. М., «Колос», 1964.
3. Шнайдер В. К. Определение радиоактивности белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1970, 142.
4. Barrat-Boyes B., Roch A., Agnew T. M. Homograft valves. — J. Med. Austral., 1972, 2, spec. suppl., 38.
5. Chrispeels M. I. Mechanism of osmotic regulation of hydrolase synthesis in aleurone cells of barley: inhibition of protein synthesis. — Biochem. Biophys. News, Comm., 1973, 53, 99.
6. Meryman H. T. Cryoprotective agents. — Cryobiology, 1971, 8, 173.
7. Ross D., Ross I. K. Mitral valve replacement with stored inverted pulmonary homograft valve. — Thorax, 1972, 27, 583.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в феврале 1975 г.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ РОГОВОЙ ОБОЛОЧКИ ЧЕЛОВЕКА И НЕКОТОРЫХ ЖИВОТНЫХ

Т. М. Шарлай

В последние годы пересадка роговой оболочки стала использоваться не только с оптической целью, но и как метод хирургического лечения многих воспалительных и дистрофических процессов роговицы, а также для исправления недостатков рефракции глаза. Поэтому для кератопластики требуется все большее количество биологически полноценного донорского материала.

Наиболее распространен способ консервации роговой оболочки при температуре $2-4^{\circ}$, предложенный В. П. Филатовым в 1934 г. При этом удается сохранить роговицу до 6 суток. Несмотря на ведущиеся на протяжении многих лет поиски, проблема длительного хранения роговой оболочки еще не решена.

Низкотемпературная консервация биологических объектов базируется на использовании разных криофилактиков. Число их ограничено, что объясняется комплексом требований, предъявляемых к указанной группе соединений.

На успешное применение глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО) при низкотемпературной консервации роговицы указывают А. И. Протасов, Н. С. Савушкина и др. [1, 4, 7, 9, 10, 12].

Однако эти криофилактики не являются универсальными для всех слоев роговицы. Так, по мнению Смит [12], глицерин не предохраняет клетки эндотелия, а ДМСО оказывает токсическое действие на эндотелиальные клетки в процессе замораживания-оттаивания.

Исследованиями Н. С. Пушкаря и др. [3] показано, что полиэтиленоксид молекулярного веса 400 (ПЭО-400) обладает выраженным криозащитным действием по отношению к клеткам крови и костного мозга, консервированным при температуре -196° . В офтальмологической литературе мы не встретили сообщений об использовании ПЭО-400 для консервации тканей глаза. Это побудило нас провести исследование, результаты которого являются предметом данного сообщения.

В предыдущих исследованиях мы изучили влияние ПЭО-400 в различной концентрации на дыхательную функцию роговиц свиньи и нашли, что лучшее криозащитное действие на роговицу оказывает ПЭО-400 10%-ной концентрации [5]. Задачей данной работы явилось изучение дыхания нативных трупных роговых оболочек человека, кролика и свиньи, а также сравнительная оценка интенсивности потребления кислорода этими роговицами после низкотемпературной консервации до -196° под защитой ПЭО-400 10%-ной концентрации.

Объектом исследования служили трупные роговицы человека, взятые через 12—24 ч после смерти, роговицы кролика и свиньи, взятые через 1—2 ч после забоя. Всего исследовано 73 роговых оболочки.

Для замораживания роговицу, помещенную в полиэтиленовый контейнер, погружали в жидкий азот. Охлаждение проводилось по двухэтапной программе со скоростью 1° в 1 мин до точки кристаллизации и далее $300-400^{\circ}$ в 1 мин до -196° . Размораживание осуществлялось в водяной бане при температуре $+40^{\circ}$ в течение 1 мин.

В качестве теста для оценки функционального состояния роговицы в процессе ее низкотемпературной консервации мы избрали тканевое дыхание, так как дыхательная активность ткани служит интегральным показателем многих обменных процессов.

Интенсивность потребления кислорода определяли манометрическим методом с помощью микрореспирометра В. Г. Шахбазова [6].

Из исследуемой роговицы трепаном ФМ-4 иссекали одинаковые по размерам диски, которые взвешивали на торзионных весах и помещали в манометрические сосуды микрореспирометра. На дно камер наливали 0,2 мл 10%-ной щелочи. Через 10 мин после выравнивания температуры камер и термостатной ванны начинали отсчет. Ткань роговицы инкубировали при температуре $+37^{\circ}$ в течение 15 мин. Интенсивность потребления кислорода измеряли в микролитрах за 1 ч на 100 мг сырого веса. Полученные данные обрабатывали статистически.

Первым этапом работы явилось изучение дыхательной функции нативных трупных роговых оболочек человека и животных. Результаты исследований представлены в таблице.

Как видно из таблицы, нативная роговая оболочка человека потребляет $72,5 \pm 5,7$ мкл кислорода, роговица кролика — $161 \pm 9,4$ мкл, а роговица свиньи — $96,2 \pm 2,9$ мкл. Полученные результаты согласуются с данными авторов, которые показали, что интенсивность дыхания уменьшается с увеличением толщины роговицы (роговица человека в 2 раза толще роговицы кролика) [8, 11].

По нашим данным, потребление кислорода роговицами свиньи происходит несколько интенсивнее, чем трупными роговыми оболочками человека. Это, видимо, можно объяснить тем, что потребление кислорода роговицами свиньи измеряли через 2—3 ч после энуклеации, а трупные роговые оболочки человека невозможно исследовать ранее чем через 12—24 ч.

Следующим этапом явилось изучение изменения дыхательной функции роговых оболочек человека и животных после низкотемпературной консервации под защитой ПЭО-400 10%-ной концентрации.

Несмотря на достоверное снижение интенсивности дыхания после замораживания-оттаивания ($P < 0,05$), потребление кислорода роговицей остается на достаточно высоком уровне (роговицы человека — $58,6 \pm 1,8$ мкл, кролика — $126 \pm 11,1$ мкл, свиньи — $80,4 \pm 3,7$ мкл).

Т а б л и ц а

Интенсивность потребления кислорода трупными роговицами человека, свиньи и кролика до и после низкотемпературной консервации (-196°), мкл на 100 мг сырого веса

Объем исследования	До консервации		После замораживания-оттаивания		P
	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	
Роговица человека	12	$72,5 \pm 5,7$	11	$58,8 \pm 1,8$	$< 0,05$
Роговица кролика	10	$161 \pm 9,4$	10	$126 \pm 11,1$	$< 0,05$
Роговица свиньи	19	$96,2 \pm 2,9$	11	$80,4 \pm 3,7$	$< 0,05$

Наибольшее снижение интенсивности дыхания после замораживания-оттаивания отмечается в роговицах кролика (23%). Это может быть связано, как полагают некоторые авторы, с видовой чувствительностью роговиц кролика к действию низких температур [2, 4].

Таким образом, проведенные опыты показали, что процент снижения потребления кислорода трупными роговыми оболочками человека, кролика и свиньи после замораживания-оттаивания существенно не отличаются.

Так как роговица человека является дефицитным и дорогостоящим материалом, можно для экспериментальных исследований, где требуется значительное количество материала, предложить использовать роговицы этих животных и результаты учитывать при дальнейших исследованиях на трупных роговицах человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Протасов А. И. Пересадка роговицы, длительно консервированной глубоким замораживанием. Автореф. канд. дис. Куйбышев, 1969.
2. Протасов А. И., Зималонг Г. М., Палнашвили В. Б. Влияние глубокого замораживания на ткань роговицы человека. — В кн.: Актуальные вопросы офтальмологии. Куйбышев, 1972, 145.
3. Пушкарь Н. С., Шенберг М. Г., Симонова Л. И., Наконечный А. А., Цуцаева А. А., Обозная Э. И., Дроздова О. А., Остановова Л. В., Бодня В. М., Карева Л. В., Михайличенко З. П., Гайсенюк Л. А. Ограждающее действие полиэтиленоксидов на клетки при глубоком замораживании. — Проб. гематол., 1972, 63, 303.
4. Савушкина Н. С. Пересадка роговой оболочки, сохраненной при низких температурах. — Вестник офтальм., 1962, 2, 36.
5. Чередищенко В. М., Шарлай Т. М., Обозная Э. И. Влияние полиэтиленоксида-400 на дыхательную функцию роговицы до и после ее глубокого охлаждения (-196°). — Вестник офтальм., 1973, 6, 69.
6. Шахбазов В. Г. Методика изучения дыхания семян. М., «Колос», 1964.
7. Eastcott H. H., Cross A. G., Leigh A. G., North D. P. Preservation of corneal grafts by freezing. — Lancet, 1954, 1, 237.
8. Muller F. O. Techniques for full-thickness keratoplasty in rabbits using fresh and frozen corneal tissue. — Brit. J. Ophthalm., 1964, 48, 377.
9. Polack F. M., Kudo, T., Takahashi, G. H. — Viability of Human eye bank cornea. — Arch. Ophth. (Chicago), 1968, 79, 205.
10. Polack F. M. Cryopreservation of corneas for penetrating keratoplasty. — Amer. J. Ophthalm., 1971, 71, 505.

11. Rycroft B. W. Three unusual corneal grafts. — Brit. J. Ophthalm., 1957, 41, 759.
12. Smith, A. U. Problem of prolonged storage of the cornea. — Int. Ophthalm. Clin., 1962, 2, 731.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ НА ИММУНОГЕННЫЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА АЛЛОТРАНСПЛАНТАТОВ КОЖИ

*К. К. Калмыков, Н. П. Лобасенко,
Г. С. Тупчиенко, Г. Г. Медведева*

Интенсивное внедрение методов низкотемпературной консервации для длительного хранения биологических объектов, используемых в трансплантологии, требует исследования особенностей взаимодействия деконсервированных трансплантатов с организмом реципиента и их иммунобиологических свойств, что представляет не только теоретический, но и практический интерес [1—6].

Целью данной работы явилось сравнительное изучение иммуногенных и антигенных свойств деконсервированных и нативных кожных лоскутов.

Донорами кожных лоскутов были мыши линии BALB/c, реципиентами — СВА. Лоскуты кожи для консервирования и трансплантации снимали со спины мыши-донора под гексеналовым наркозом, консервировали при -196° с применением криопротектора ПЭО-400.

Деконсервированные и нативные трансплантаты размером $0,5 \times 1$ см пересаживали на спину мыши-реципиента. На трансплантат помещали марлевую салфетку, края которой фиксировали к коже реципиента медицинским клеем БФ-6. Вторая трансплантация кожных лоскутов производилась с интервалом 14, 18 или 27 дней после первой пересадки кожи.

Мышам I группы нативные лоскуты кожи пересаживали двукратно. Животным II группы пересаживали нативные, а затем деконсервированные кожные лоскуты. Мышам III группы пересаживали деконсервированные кожные лоскуты, а вторыми трансплантатами служили нативные лоскуты кожи. Мышам IV группы трансплантацию деконсервированных кожных лоскутов производили дважды.

Полученные данные приведены в таблице. При интервале между пересадками первого и второго лоскута кожи, равном 14 дням, время выживания второго трансплантата (ВВВТ) у мышей I группы составляло $7,28 \pm 0,36$ дня, II группы — $9,3 \pm 1,45$, III группы — $10,0 \pm 0,53$ и IV — $8,5 \pm 0,5$ дня. У животных III группы ВВВТ было достоверно больше, чем у животных I группы ($P < 0,002$).

При 18-дневном интервале между пересадками кожи ВВВТ у мышей I группы равнялось $6,6 \pm 0,67$ дня, II группы — $8,75 \pm 0,79$, III группы — $10,0 \pm 0,58$ и IV — $6,6 \pm 0,4$ дня. При указанном интервале ВВВТ у животных III группы было достоверно больше, чем у животных как I, так и IV групп ($P < 0,01$).

С увеличением интервала между пересадками до 27 дней обнаруживаются различия во ВВВТ у мышей II и I групп: вторые трансплантаты деконсервированной кожи у мышей, примированных пересадкой нативного кожного лоскута, выживают дольше ($9,5 \pm 0,29$ дня), чем вторые нативные трансплантаты ($5,5 \pm 0,29$ дня), ВВВТ у животных III группы также превышало время выживания второго трансплантата у мышей I группы ($P < 0,02$).

Следует отметить, что ВВБТ у мышей I и IV групп сокращалось при увеличении интервала между пересадками кожи. Так, у животных этих групп при интервале 27 дней оно было меньше, чем при интервале 14 дней ($P < 0,05$). У животных II и III групп такой зависимости не выявлено. ВВБТ у мышей, которым двукратно пересаживали нативные лоскуты кожи, не отличалось от ВВБТ у мышей, которым производили двукратную трансплантацию деконсервированной кожи, независимо от интервала между пересадками.

Время выживания вторых трансплантатов деконсервированной и нативной кожи мышей

Группа животных	Промежутки между первой, второй и третьей пересадками кожи, дни								
	14(a)			18(б)			27(в)		
	$\bar{x}$	$\pm S \bar{x}$	P	$\bar{x}$	$\pm S \bar{x}$	P	$\bar{x}$	$\pm S \bar{x}$	P
I	7,28	0,36	C I _б > 0,5 C I _в < 0,01 C II _а > 0,05 C III _а < 0,002 C IV _а > 0,1	6,6	0,67	C I _в > 0,05 C II _б > 0,05 C III _б > 0,01	5,5	0,29	C II _в < 0,01 C III _в < 0,02 C IV _в > 0,1
II	9,3	1,45	C II _б > 0,5 C II _в > 0,5 C IV _а > 0,5	8,75	0,79	C II _в > 0,25	9,5	0,29	
III	10,0	0,53	C III _в > 0,1 C IV _а > 0,1	10,0	0,79	C III _в > 0,25 C IV _б < 0,001	8,0	1,52	C IV _в > 0,25
IV	8,5	0,5	C IV _в < 0,05	6,6	0,4	C IV _в > 0,5	6,25	0,52	

Примечание. Обозначения типа «C I б» следует читать — «по сравнению с данными по группе I, интервал б (18 дней)».

Отмеченные различия во ВВБТ у животных III и I групп, независимо от интервала между пересадками кожи, могут свидетельствовать о снижении иммуногенности кожных лоскутов под влиянием низких температур и криофилактика ПЭО-400. Больше ВВБТ у животных II группы, чем у животных I группы, по-видимому, свидетельствует об отсутствии полной эквивалентности в антигенных свойствах деконсервированных и нативных кожных лоскутов.

Результаты аналогичных исследований [1, 3, 5, 6] не выявили различий в антигенной стимуляции реципиента деконсервированными и нативными трансплантатами кожи. Однако эти исследования проведены на иных животных (кролики, крысы), а условия консервирования лоскутов кожи отличались от применявшихся нами. Зависимость результатов исследования от интервала между первой и второй пересадкой кожи не могла быть выявлена, поскольку в указанных работах был принят один интервал — 14 дней. Следует отметить, что при этом интервале и по нашим результатам не выявлялись различия в сроках отторжения вторых трансплантатов деконсервированных и нативных кожных лоскутов у животных, примированных нативными трансплантатами кожи.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости углубления исследований по этой проблеме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капичников М. М. Иммунологический анализ трансплантационных антигенов кожи, консервированной при низких температурах. — Тезисы XIV науч. сессии Ин-та хирургии им. А. В. Вишневского. М., 1962, 59.
2. Коваленко П. П., Демичев Н. П. Антигенные свойства консервированных тканей и иммунологические реакции при их гомотрансплантациях. — В кн.: Восстановительная хирургия. Сб. науч. тр., посвящ. Н. А. Богоразу. Ростов-на-Дону, 1967, 329.

3. Меерсон Е. М. Иммунологические данные об активности трансплантационных антигенов кожных гомотрансплантатов, консервированных в жидком азоте. — II Всесоюз. конф. по пробл. тканев. несовм., консерв. и трансплантации тканей и органов. Материалы докладов. Одесса, 1961, 61.
4. Светловидова В. И. Влияние консервации на антигенные свойства кожи. II Всесоюз. конф. по пробл. тканев. несовм., консерв. и трансплантации тканей и органов. Материалы докладов. Одесса, 1961, 67.
5. Сушко Н. Г., Меерсон Е. М. Влияние консервирования на антигенные свойства кожи. — III Всесоюз. конф. по пересадке тканей и органов. Материалы докладов. Ереван, 1963, 95.
6. Appel S., Hamilton P. The relative antigenicity of frozen-preserved and fresh skin homografts. — Cryobiology, 1970, 6, 5, 416.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТОКСИЧЕСКИХ ПРОТИВОСТОЛБНЯЧНЫХ СЫВОРОТОК ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И КРИОФИЛАКТИКА ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА 400

А. А. Цуцаева, В. М. Маркова, М. Д. Петренко

Широкое применение низких температур для консервации биологических объектов обуславливает необходимость всестороннего и глубокого изучения механизма их повреждающего действия, выявления криолабильных структур и систем, изучения степени обратимости процессов, изыскание способов криозащиты.

Целью настоящей работы является исследование характера воздействия низких температур на специфическую активность иммунных глобулинов в зависимости от концентрации ПЭО-400 и сроков хранения.

Эксперименты проведены на иммунных антитоксических противостолбнячных сыворотках. В качестве криофилактика служил полиэтиленоксид молекулярного веса 400 (ПЭО-400).

Сохранность количества иммунных глобулинов оценивали в реакции нейтрализации *in vivo*. Кроме того, изучали влияние замораживания и ПЭО-400 на антигенный спектр, авидность и скорость накопления и выведения из организма деконсервированных сывороток. Контролем служили сыворотки, хранившиеся при температуре $+4^{\circ}$ и -196° без криофилактика.

Замораживание проводили в полиэтиленовых ампулах объемом 1 мл со скоростью охлаждения на первом этапе 20° в 1 мин в интервале температур от $+20^{\circ}$ до -5° для сывороток с ПЭО-400 5%-ным, до -7° — с 10%, до 8° — с 15%-ным, до -2° — без ПЭО-400; на втором этапе — около 400° в 1 мин — до -196° . Деконсервирование производили на водяной бане при температуре $+41^{\circ}$ через 2 года хранения в жидком азоте (табл. 1).

Зависимость степени снижения титра противостолбнячных

Условия хранения	Степень снижения титра антитоксина				
	0,5			1,0	
	$\bar{x}$	$\pm S_{\bar{x}}$	P	$\bar{x}$	$\pm S_{\bar{x}}$
$+4^{\circ}$	7,79	0,8708		9,98	1,253
-196° без ПЭО-400	4,8	0,7314	C 1 > 0,01	9,1	1,773
-196° с 5%-ным ПЭО-400	0,79	0,3048	C 1 > 0,5 C 2 < 0,001	1,8	0,4525
-196° с 10%-ным ПЭО-400	0			0	
-196° с 15%-ным ПЭО-400	0			0	

Примечание. C₁, C₂ — сравнение с данными при $+4^{\circ}$ (1) и -196° (2).

Антигенный спектр деконсервированных противостолбнячных сывороток в реакции двойной диффузионной преципитации в агаре (по Оухтерлони) не отличался от контрольных образцов (хранение при $+4^{\circ}$). Во всех случаях сыворотки образовывали две дуги преципитации со столбнячным анатоксином (рисунок). Под влиянием низких температур и криофилактика отмечалось изменение авидности деконсервированных сывороток (табл. 2).

Таблица 2

Скорость связывания столбнячного токсина с антитоксином противостолбнячных сывороток, хранившихся в разных условиях

Условия хранения	Время контакта токсина с антитоксином (мин) $t=+37^{\circ}$				
	5	10	15	30	45
$+4^{\circ}$	82,5	83,7	84,6	90,8	100
-196° без ПЭО-400	84,5	86,4	87,9	93,4	100
-196° с 5%-ным ПЭО-400	85,6	86,3	88,5	92,0	100
-196° с 10%-ным ПЭО-400	87,7	88,9	92,0	92,0	100
-196° с 15%-ным ПЭО-400	88,8	91,3	92,4	94,9	100

Примечание. Показатели нейтрализации токсина антитоксином даны в %.

Как видно из представленных данных, после 5-минутного контакта токсина с сыворотками при температуре $+37^{\circ}$ антитоксин сывороток, хранившихся под защитой 10—15%-ного ПЭО-400, нейтрализовал соответственно 97,7 и 88,8% токсина, за этот период нейтрализация сывороток, хранившихся при температурах $+4^{\circ}$ и -196° без криофилактика и с 5%-ным ПЭО-400, составила соответственно 82,5, 84,5 и 85,6%. Заметные различия с деконсервированными сыворотками в скорости связывания токсина с антитоксином сывороток, хранившихся при температуре $+4^{\circ}$, отмечены и через 10, 15 и 30 мин контакта с токсином.

Для определения динамики накопления и выведения противостолбнячного антитоксина деконсервированных сывороток в организме животных ставили опыты на кроликах породы шиншилла весом 3 кг. С этой целью лечебную дозу деконсервированной сыворотки вводили внутримышечно (2 тыс. МЕ на 1 кг веса).

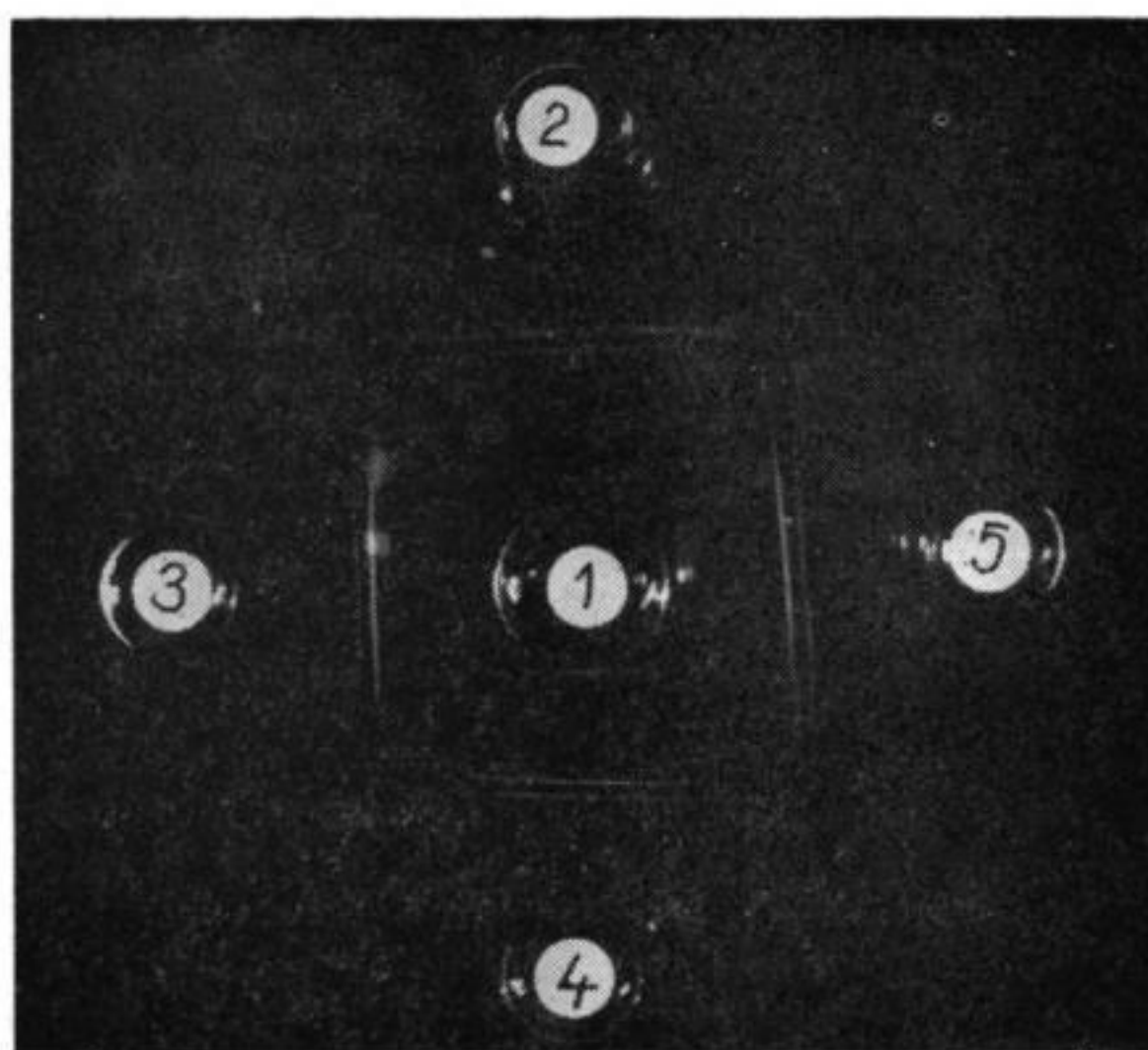
В опыт были взяты противостолбнячные сыворотки, которые хранились параллельно в следующих условиях: при температуре $+4^{\circ}$, при -196° без криофилактика и с 15%-ным ПЭО-400. Кровопускание производили через 24 и 48 ч, а затем на 4, 5, 7 и 11-е сутки после введения.

Таблица 1

сывороток от условий их хранения

в процессе хранения, годы

Р	1,5			2,0		
	$\bar{x}$	$\pm S_{\bar{x}}$	Р	$\bar{x}$	$\pm S_{\bar{x}}$	Р
С 1 $> 0,5$	20,7	1,428	С 1 $> 0,5$	21,1	1,612	С 1 $> 0,5$
С 1 $< 0,001$	13,6	2,18	С 1 $= 0,001$	15,9	2,54	С 1 $< 0,001$
С 2 $> 0,001$	2,5	0,7956	С 2 $= 0,001$	7,1	1,204	С 2 $> 0,001$
	0			0		
	0			0		



Антигенный спектр противостолбнячной сыворотки, хранившейся в течение двух лет в жидком азоте, в реакции двойной диффузионной преципитации в агаре.

В лунках: 1 — столбнячный анатоксин; 2 — противостолбнячная сыворотка, хранившаяся при -196° без криофиликта; 3 — противостолбнячная сыворотка, хранившаяся при -196° с 10%-ным ПЭО-400; 4 — противостолбнячная сыворотка, хранившаяся при -196° с 15%-ным ПЭО-400; 5 — противостолбнячная сыворотка, хранившаяся при $+4^{\circ}$.

Таблица 3

Динамика уровня (МЕ) противостолбнячного антитоксина в крови кроликов после внутримышечного введения лечебной дозы противостолбнячной сыворотки

Условия хранения сыворотки	Серия экспериментов	Сроки после введения сыворотки, дни					
		1	2	4	5	7	11
$+4^{\circ}$	1	9	12	14	6	2	0
	2	9	17	12	4	3	0
	3	9	15	13	4	0	0
	4	9	11	11	5	3	0
	5	9	17	17	4	0	0
	6	9	14	13	4	0	0
-196° без ПЭО-400	1	9	17	13	7	3	0
	2	9	10	10	4	0	0
	3	9	15	13	7	2	0
	4	9	16	14	6	2	0
	5	9	11	12	5	0	0
	6	9	17	16	7	7	0
-196° с 15%-ным ПЭО-400	1	9	17	12	6	2	0
	2	9	12	11	4	1	0
	3	9	15	12	4	0	0
	4	9	16	13	4	2	0
	5	9	17	12	6	3	0
	6	9	17	12	5	2	0

Сыворотку титровали по общепринятой методике на белых мышах. Данные титрации представлены в табл. 3.

По данным, представленным в табл. 3, видно, что при введении сывороток, хранившихся в указанных выше условиях, уже через 24 ч после введения уровень антитоксина в крови был равен 9 МЕ, затем он

нарастал, достигая максимума (в отдельных сериях) на 2—5-е сутки (до 17 МЕ), после чего отмечалось достаточно быстрое снижение содержания противостолбнячного антитоксина в крови животных, на 11-е сутки они уже не обнаруживались.

Достоверных различий в динамике накопления и выведения противостолбнячных антител в зависимости от условий консервации не обнаружено.

После деконсервации сыворотки выборочно были проверены на стерильность. При посеве образцов на скошенный агар, мясопептонный бульон с прибавлением 0,5% глюкозы, на среду Сабуро рост микрофлоры не отмечен как при температуре $+37^{\circ}$, так и при температуре $+22^{\circ}$.

Исходя из изложенного выше, можно сказать, что криофилактик ПЭО-400 в концентрациях 10 и 15% оказывает стабилизирующий эффект на свойства иммунных глобулинов при низкотемпературной консервации. Полученные в работе данные позволяют дать рекомендации по разработке метода низкотемпературной консервации иммунных сывороток на определенных этапах производства бактериальных препаратов.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР
Завод бакпрепаратов ХНИИМВС
им. Мечникова

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

КРИОХИРУРГИЧЕСКИЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРИБОРА КМ-6

В. И. Сипитый, Е. М. Медведев, Б. Н. Муринец

В настоящее время криохирургический метод лечения нашел применение в нейрохирургической клинике для лечения паркинсонизма, хорей и других заболеваний. Криохирургическое лечение опухолей головного мозга пока не внедрено широко в нейрохирургическую клинику из-за отсутствия необходимого для этого специального криохирургического инструментария. Имеются лишь отдельные сообщения, указывающие на перспективность использования низких температур для криовоздействия на опухоли головного мозга. При этом отмечается, что замораживание опухолей головного мозга вызывает задержку роста и размножения опухолевых клеток или их анатомическое разрушение.

Наше сообщение основано на анализе 56 больных опухолями больших полушарий мозга, оперированных криохирургическим методом.

Для удаления опухолей применялся специальный криохирургический прибор КМ-6 (рис. 1), который работал в режиме криозонда и одновременно мог быть использован как криокоагулятор.

Криохирургический прибор состоит из сифонного устройства с расположенной внутри его трубкой подачи, на наружный конец которой одеваются сменные наконечники (рис. 2). Во время подачи хладагента к наконечнику количество его можно регулировать. В случае повышения допустимого давления внутри резервуара сифонное устройство производит сброс газообразного хладагента в окружающую среду.

Операции производились после предварительно выполненной костно-пластической трепанации с проведением криокоагуляции сосудов, питающих опухолевую ткань, последующим криовоздействием на опухолевую ткань и удалением опухоли при помощи криохирургического инструментария.

В случае обширных интрацеребральных опухолей с диффузным характером роста при невозможности их радикального удаления осуще-

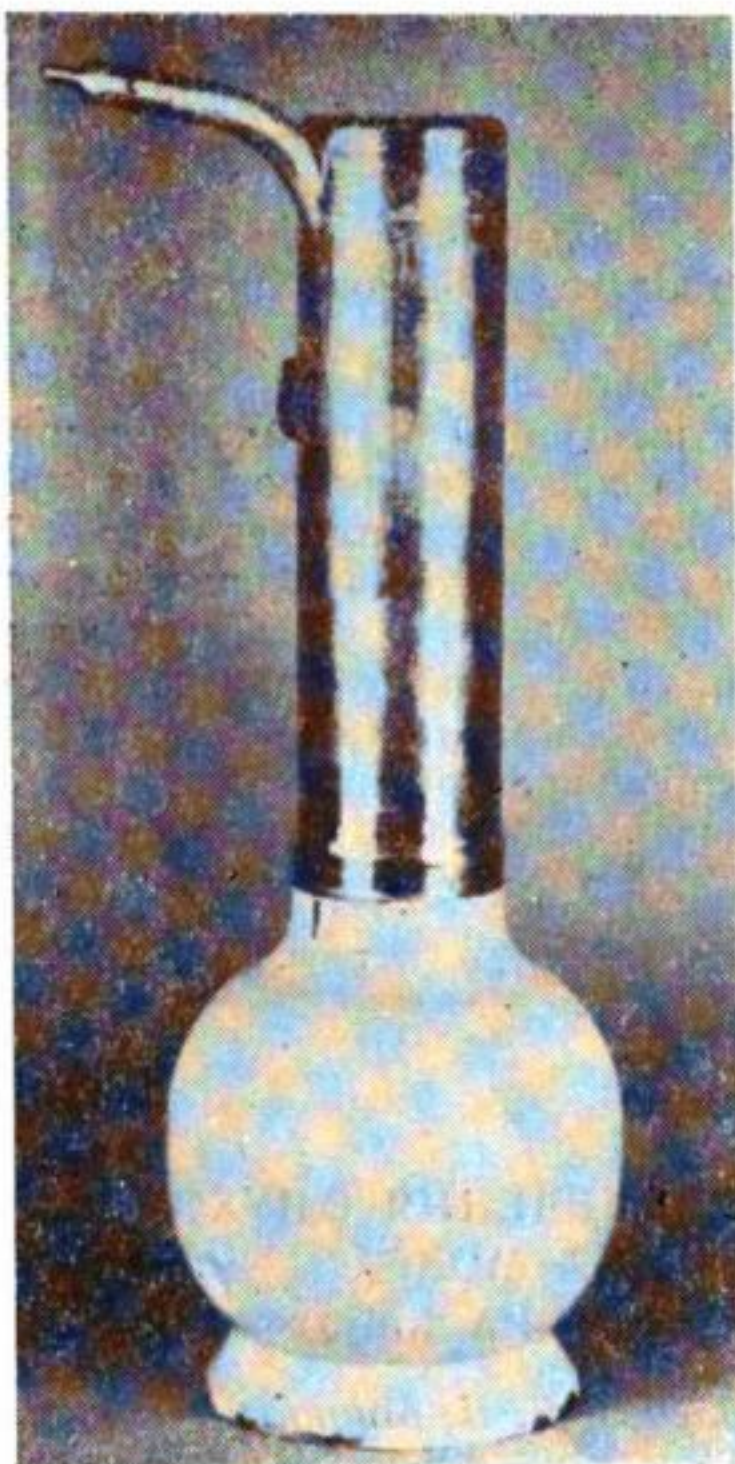


Рис. 1. Общий вид прибора КМ-6, применяемого для удаления опухолей больших полушарий мозга.



Рис. 2. Сменные наконечники криохирургического прибора КМ-6.

ствлялась по возможности криодеструкция оставшейся части опухолевой ткани.

Из 56 больных, оперированных криохирургическим методом, выздоровление наступило у 32, улучшение у 21, умерло — 3 больных.

Послеоперационный период протекал гладко, ухудшения состояния больных не наблюдалось. Общее состояние больных улучшилось в первые дни послеоперационного периода. Восстановление нарушенных функций (парезы, расстройство чувствительности, афатические нарушения и т. д.) можно было наблюдать на 2—3-й день после операции. Эти данные указывают на отсутствие выраженных явлений послеоперационного отека — набухания мозга, а также расстройств кровообращения, что подтверждено данными патоморфологического исследования.

При гистологическом исследовании ткани нейроэктодермальных опухолей, удаленных при помощи криохирургического метода (астроцитомы, дедифференцированные астроцитомы, эпендимомы) можно условно выделить три зоны криохирургического воздействия.

I. Зона некроза, где отмечается полный некроз опухолевой ткани. Последняя представляется гомогенной, бесструктурной. Однако среди опухолевой ткани кое-где заметны контуры стенок сосудов, также в состоянии некроза.

У больных, подвергшихся операции повторно, обнаруживались контуры подвергшихся некрозу соединительнотканых волокон и их пучков.

II. Зона некробиоза. В этой зоне большая часть опухоли была также в состоянии некроза и некробиоза. Однако сосуды, а также соединительнотканые волокна в основном сохранялись. Кроме того, вокруг сосудов в некоторых наблюдениях (при дедифференцированных астроцитомах и эпендимомах) обнаружены кольцевидные участки сохранившейся опухолевой ткани, состоящие из компактно расположенных опухолевых клеток с явлениями атипии и обычно с крупными гиперхромными ядрами.

У больных, оперированных повторно, отмечена сохранность соединительнотканых волокон, тяжей, пучков. Среди соединительной ткани обнаруживались сохранившиеся опухолевые клетки, группы последних, а иногда — участки опухолевой ткани.

III. Зона перифокальных изменений, где отмечены лишь отдельные участки опухолевой ткани с явлениями некробиоза. В этой зоне наблюдались явления некоторого отека, в отдельных случаях вплоть до образования структур типа Status spongiosus. Экстравазаты, геморрагии отсутствовали.

При криохирургическом воздействии на опухоли типа арахноидэндотелиом, арахноидэндотелиосарком зона некроза при тех же условиях криохирургического воздействия представлялась меньшей. В последней можно было проследить контуры соединительнотканых волокон, тяжей опухолевых клеток. В зоне некробиоза опухолевые клетки были с явлениями набухания, гомогенизации структуры.

Таким образом, при выполнении криохирургических операций по поводу удаления опухолей больших полушарий мозга применение специального криохирургического аппарата КМ-6 дает возможность удалять опухоли больших полушарий мозга с незначительной травматизацией окружающего мозгового вещества и отсутствием нарушений мозгового кровообращения.

Гистологическое исследование удаленной опухоли при помощи аппарата КМ-6 позволило обнаружить наличие крионекроза и некробиоза в опухолевой ткани, что указывает на целесообразность проведения криодеструкции интрацеребральных опухолей в случае невозможности проведения радикальной операции. Применение криохирургического метода для удаления опухолей больших полушарий мозга способствует быстрому восстановлению нарушенных функций мозга в послеоперационном периоде.

Харьковский медицинский институт

Поступила в редколлегию
в феврале 1975 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МАЛОЙ МОЩНОСТИ НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

К. П. Скибенко, А. А. Цуцаева, Л. А. Дудник

В последнее время появилось большое количество работ, посвященных изучению характера действия лазерного света на биологические объекты [1, 2]. Однако основное внимание в них уделялось тепловому повреждающему действию [3].

Изучение сочетанных действий на опухолевые клетки когерентного света лазера и низких температур представляет как теоретический, так и практический интерес. В частности, изучение скорости синтеза нуклеиновых кислот в клетках опухоли, облученных *in vitro* лазером с $\lambda = 6238 \text{ \AA}$, интактных и после воздействия низких температур, возможно,

позволит выяснить характер изменения метаболических процессов и установить зависимость этих факторов от патогенности злокачественных клеток.

В первой серии наших исследований сочетанного действия низких температур и монохроматического излучения представлены результаты по изучению действия данного излучения на интактные клетки адено-

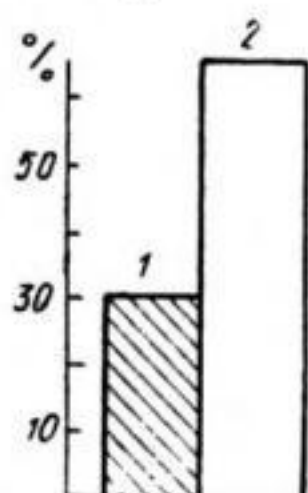


Рис. 1. Количество клеток, включивших H^3 -тимидин на 100 клеток:

1 — контроль ($30 \pm 7,0\%$), 2 — опыт ($65 \pm 5,0\%$).

карциномы Эрлиха. Десятидневные асцитные клетки аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) облучали *in vitro* гелий-неоновым лазером с $\lambda = 6328 \text{ \AA}$. Мощность светового потока была 30 мвт, время экспозиции определялось условиями опыта, его подбирали таким образом, чтобы исключить повышение температуры в образцах. Количество энергии, подводимое к клетке, варьировало от 25 до 200 мкдж. В облученных образцах определяли содержание жизнеспособных клеток, их прививаемость и активность синтеза ДНК с помощью метода гистоавтографии с использованием H^3 -тимидина. Последний вводили опытным и контрольным животным внутрибрюшинно на 7-й день от момента инокуляции им соответственно облученной и необлученной клеточной взвеси АКЭ. H^3 -тимидин вводили мышам за 3 ч до декапитации.

В опыте использованы мыши линии BALB/c, которых разбили на две подгруппы. Одной подгруппе животных инокулировали облученную клеточную взвесь внутрибрюшинно по 1 мл с концентрацией клеток АКЭ $5 \cdot 10^6$, другой — подкожно по 0,3 мл той же концентрации. Контрольной группе животных вводили интактные клетки АКЭ в аналогичных концентрациях.

Облучение лазером не оказывало влияния на жизнеспособность клеток, количество жизнеспособных клеток после облучения не отли-

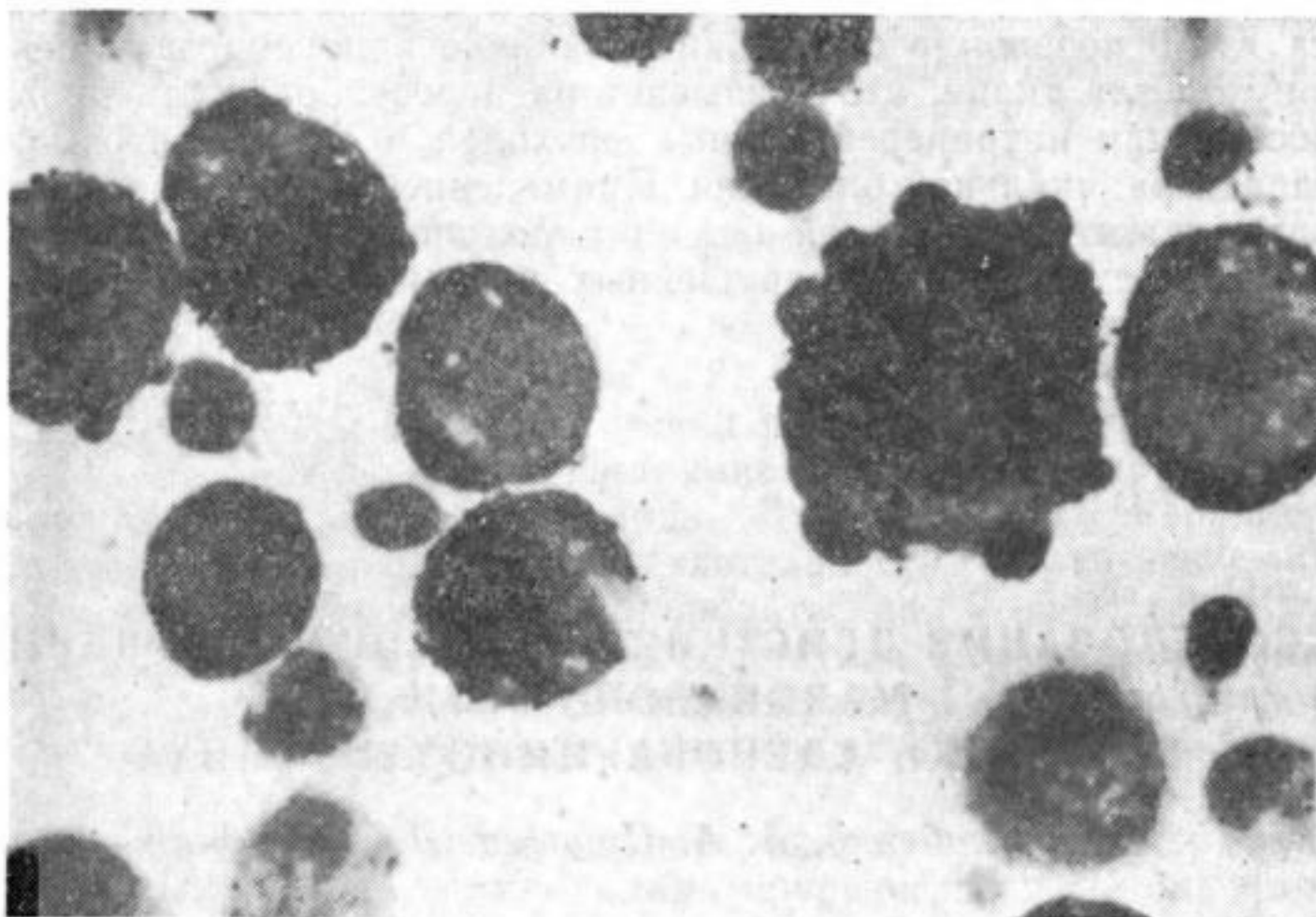


Рис. 2. Интенсивность включения H^3 -тимидина облученными гелий-неоновым лазером клетками карциномы Эрлиха на 7-й день после облучения.

чалось от показателей жизнеспособности в контроле и составляло 96—98%. При морфологическом исследовании цитоплазма облученных клеток окрашивалась менее интенсивно, чем интактных. Чаше наблюдался класматоз, вакуолизация.

О синтезе ДНК в клетках АКЭ судили по интенсивности включения радиоактивной метки — H^3 -тимидина. Облученные *in vitro* клетки АКЭ,

выросшие у животных опытных и контрольных групп, интенсивно включали радиоактивную метку. У животных опытной группы на 7-й день количество меченых асцитных клеток на 100 составляло $65 \pm 5,0$, а у контрольных — $30 \pm 7,0$ (рис. 1). Следует отметить, что интенсивность включения H^3 -тимидина клетками асцитной опухоли была также значительно выше при имплантации животным облученных клеток, чем

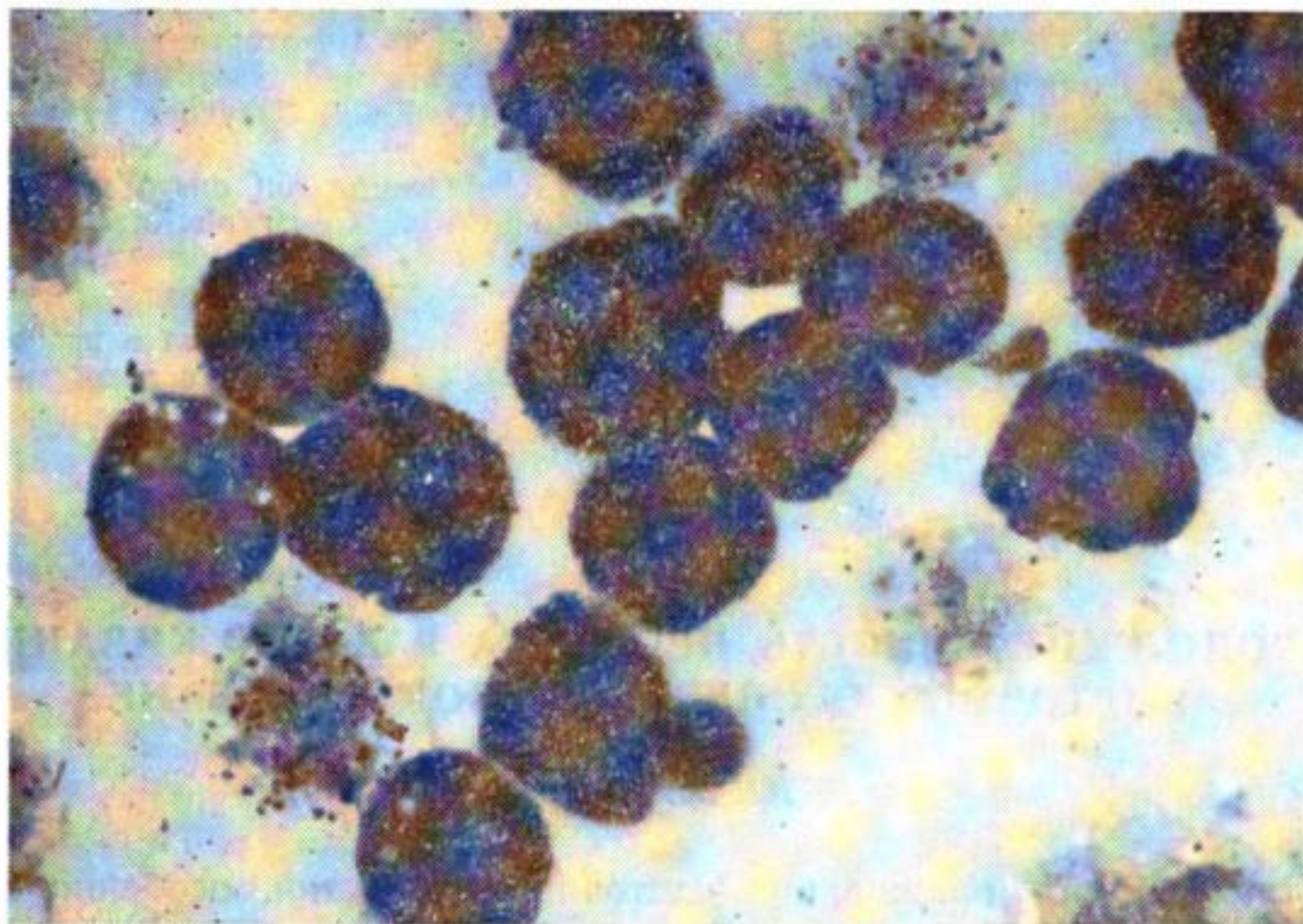


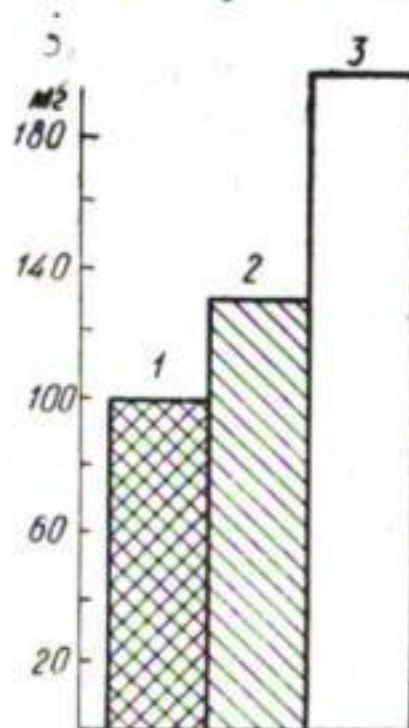
Рис. 3. Включение H^3 -тимидина интактными клетками асцитной карциномы Эрлиха на 7-й день после облучения.

клеток опухоли, выросшей у животных контрольной группы. В цитогамме асцитной опухоли, выросшей после имплантации облученных клеток, на 7-й день преобладали клетки с базофильной цитоплазмой, ядра которых интенсивно включали H^3 -тимидин, отмечался усиленный класматоз, вакуолизация (рис. 2). Интенсивность включения радиоактивной метки клетками АКЭ в контрольной группе была значительно ниже, метка в ядрах — в виде небольших скоплений-гранул или же отдельных зерен, клетки небольших размеров (рис. 3).

Солидные опухоли развивались у животных как контрольной, так и опытной группы, но вес опухолей в опыте был достоверно выше, чем в контроле, и нарастал по мере увеличения дозы

Рис. 4. Вес солидных опухолей карциномы Эрлиха, выросших после облучения *in vitro* асцитных клеток светом гелий-неонового лазера:

1 — контроль ($97 \pm 7,0$ мг); 2 — в течение 10 мин ($129 \pm 11,0$ мг); 3 — 40 мин (187 ± 15 мг).



облучения (рис. 4). Самый большой вес опухолей отмечен у животных, привитых клетками, которые облучались в течение 40 мин. У животных этой группы опухоли с трудом вылущивались, они были спаяны с подлежащими тканями, часто прорастали в брюшную полость.

На основании экспериментальных данных можно сделать следующий вывод: облучение *in vitro* асцитных клеток аденокарциномы Эрлиха светом гелий-неонового лазера с $\lambda = 6328 \text{ \AA}$ усиливает скорость синтеза ДНК и рост солидных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. И н ю ш и н а Т. Ф., И н ю ш и н В. М. О действии лазерного света на эритропоэз. — В кн.: Некоторые вопросы теоретической и практической биологии. Алма-Ата, 1967, 113.
2. И н ю ш и н В. М. О биоэнергетических аспектах действия световой энергии на организм животных. — В кн.: Некоторые вопросы теоретической и прикладной биологии. Алма-Ата, 1967, 67.
3. К а в е ц к и й Р. Е., Ч у д а к о в В. Г., Г а м а л е я Н. Ф. Некоторые результаты изучения биологического действия луча лазера в опытах на животных и культурах тканей. — В кн.: Годичная науч. конф. КНИИЭКО. Киев, «Наукова думка», 1966, 39.
4. Mester E., Sellyei M., Tota J. Laserstrahlenwirkung auf das Wachstum der Erlichschen Aszitestumors Verläfge. — Mitteilung Arch. Geschwulstforsch., 1968, 32, 3, 201.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР
Физико-технический институт

Поступила в редколлегию
в декабре 1974 г.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПРОЦЕССА РАЗМОРАЖИВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ В ВОДЯНОЙ БАНЕ

Ю. М. Рудько

Процессу размораживания клеточных суспензий, особенно кроветворных тканей, придается все большее значение, в связи с чем создание специальной размораживающей аппаратуры является актуальной задачей.

Настоящее исследование посвящено определению временного диапазона отогрева биологического материала от -196° до 0° , в зависимости от температуры теплоносителя (40° или 50°), материала контейнера и его объема, характера механического воздействия.

Характеристика применяемых контейнеров и условий отогрева представлена в таблице. Температуру измеряли медь-константановой термопарой, смонтированной в игле с использованием электронного потенциометра ЭПП-09. Термопару вводили в центральную часть контейнера. Размораживание биологического материала проводилось в водяных банях различных конструкций.

1. Камера для отогрева, тип УНК, разработанная в 1968 г. Физико-техническим институтом низких температур АН УССР совместно с Проблемной лабораторией Украинского института усовершенствования врачей МЗ СССР, обеспечивает заданный подогрев теплоносителя и размораживание неподвижно установленных в бане контейнеров при постоянном перемешивании воды активатором.

2. Ванна для ультрабыстрого размораживания КВ 6502000, разработанная в 1963 г. Центральным ордена Ленина институтом переливания крови МЗ СССР, снабжена, кроме подогревающего устройства для теплоносителя, механизмом для покачивания отогреваемых контейнеров (амплитуда 300 мм, частота 200 колебаний в 1 мин).

3. Размораживатель биоматериалов, тип РБ, разработанный совместно Физико-техническим институтом низких температур АН УССР и Институтом криобиологии и криомедицины АН УССР в 1972 г. Обеспечивает подогрев теплоносителя и покачивание контейнеров с биоматериалом при амплитуде до 150 мм и частоте 46, 70 и 84 колебаний в 1 мин.

4. Вибрационный размораживатель биоматериалов, тип ВРБ, который можно устанавливать на баню размораживателя РБ или приме-

Нять самостоятельно при наличии термостатирующего устройства. Обеспечивает колебания обогреваемых контейнеров при частоте около 50 гц и амплитудах 0,5; 1,5 и 2,5 мм.

Измерения температуры теплоносителя в водяных банях ртутным термометром с ценой деления 0,1° показали, что при погружении в теплоноситель замороженных контейнеров отклонение от заданных значений составляло $\pm 1,5^\circ$. Точность измерения времени ± 2 сек.

Продолжительность (в сек) размораживания биологического материала от -196° до 0°

Аппарат	Условия отогрева		Тип контейнера и объем, см ³					
			Алюминиевый гофрированный			Пластмассовый		
			50	75	160	2	170	180
УНК	Контейнеры неподвижны		$\frac{75}{70}$	$\frac{68}{63}$	$\frac{63}{—}$	$\frac{115}{—}$	$\frac{300}{—}$	$\frac{200}{—}$
КВ	Покачивание контейнеров		$\frac{15}{13}$	$\frac{15}{13}$	$\frac{15}{13}$	—	$\frac{130}{—}$	—
РБ	Частота покачивания контейнеров, колеб/мин	46	$\frac{60}{45}$	$\frac{51}{42}$	$\frac{39}{35}$	—	$\frac{220}{200}$	—
		70	$\frac{30}{23}$	$\frac{42}{37}$	$\frac{35}{32}$	—	$\frac{210}{190}$	$\frac{80}{32}$
		84	$\frac{25}{20}$	$\frac{39}{35}$	$\frac{30}{25}$	—	$\frac{180}{165}$	—
ВРБ	Амплитуда вибрации контейнеров, мм	2,5	$\frac{23}{18}$	$\frac{23}{20}$	$\frac{20}{—}$	$\frac{50}{—}$	$\frac{140}{—}$	—
		1,5	$\frac{32}{27}$	$\frac{27}{23}$	—	$\frac{63}{—}$	—	—
		0,5	$\frac{50}{43}$	$\frac{52}{48}$	—	$\frac{73}{—}$	$\frac{195}{—}$	—

Примечание. В числителе — значение времени в секундах при температуре 40° , в знаменателе — при 50° .

На основании данных, приведенных в таблице, можно сделать следующие выводы:

1. Повышение температуры теплоносителя не приводит к значительному уменьшению продолжительности размораживания клеточных суспензий.

2. Интенсификация внутреннего теплообмена, которая достигается покачиванием или вибрацией контейнера с биологическим материалом, в 2—5 раз уменьшает продолжительность размораживания.

3. Водяная баня с приспособлениями, интенсифицирующими отогрев, может применяться для программного размораживания материала с изменением температуры теплоносителя и времени, в течение которого контейнеры с биологическим материалом находятся в теплоносителе.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию *
в феврале 1975 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А., Шенберг М. Г., Лобынцева Г. С., Луговой В. И. Актуальные проблемы криоконсервирования костного мозга	3
● Панков Е. Я., Друзь В. А. К анализу общих закономерностей действия низких температур на биологический объект	16
Нардид О. А., Моисеев В. А., Лемешко В. В. Эффекты комплексования полиэтиленоксидов с «биометаллами»	19
Иткин Ю. А., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. Условия роста кристаллов в растворе. I. Постановка задачи	21
Кулешова Л. Г., Моисеев В. А., Иткин Ю. А. Кристаллизация водных растворов некоторых криопротекторов	27
Шраго М. И., Калугин Ю. В., Кочуровская Г. Г., Матвиец Н. М., Моисеев В. А., Марковский А. Л., Воротилин А. М., Карева Л. В., Бредихина Л. П. Влияние оксигенирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина	31
Лемешко В. В., Бондаренко В. А., Суббота Н. П., Белоус А. М. Криповреждения и криопротекция митохондрий <i>in vitro</i> и <i>in situ</i>	33
Гулевский А. К. Влияние низких температур на биосинтез белков в бесклеточной системе печени крыс	37
● Лакиза Б. С., Морозов И. А., Комлик П. В., Кононов Ю. В., Трунов Н. П. Наш опыт заготовки костномозгового трансплантата человека	39
Обозная Э. И., Маркова О. П., Морозов И. А. Фосфолипиды криоконсервированного костного мозга человека	42
Тимошенко Ю. П., Пахомова И. С. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. I. Диэлектрические характеристики крови и ее фракций в диапазоне СВЧ	44
Тимошенко Ю. П., Гаврилова И. И. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. II. Термодинамические свойства крови при ее размораживании	47
Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. III. Размораживание консервированной крови	49
Медведев П. М., Мамышева Т. К., Теодорович В. И., Монахенко И. В., Раков А. А., Недельский Г. Т. Разработка методов консервирования костного мозга при умеренно низких температурах	52
Панков Е. Я., Маркова О. П., Страна В. И. Влияние низких температур на аденозинтрифосфатазную систему клеток костного мозга крыс	56
Страна В. И. Действие производных окиси этилена на ядерные клетки костного мозга крыс	57
Холодный А. Я., Багаутдинов Ш. М., Петренко Г. И., Киселева М. В., Турбина И. Л., Руденко Н. Н. Сравнительная оценка процесса криоконсервирования кроличьего костного мозга в различных аппаратах	59
Бредихина Л. П., Лубяный В. Г. К вопросу о влиянии полиэтиленоксидов на кислородную емкость эритроцитов человека	62
● Воротилин А. М., Корчиков С. Д., Гордиенко Л. В. Влияние высокого давления на сохранность клеток крови при замораживании	65
Васильченко В. Н., Иванов Э. Н., Леонтьев В. С., Васильченко Н. С. Функциональная активность тимоцитов, подвергнутых низкотемпературной консервации (—196°)	68
Дворцовой В. К., Митасов В. И., Марковский А. Л., Моисеев В. А. Состояние воды в почке, перфузированной растворами полиэтиленоксида с молекулярным весом 400	71
● Козлова В. Ф., Дворцовой В. К. Морфологическая оценка почек на первых этапах криоконсервации	73

Шенберг М. Г. Морфологическое исследование криоконсервированных трансплантатов щитовидной железы	75 ●
Чуйко В. А., Онуфриева Г. А., Митасов В. И. Реакция коры надпочечников на гомотрансплантацию щитовидной железы — свежей и криоконсервированной (—196°)	77
Пономарев Ю. И., Гулевский А. К., Обозный Э. П., Чеканов В. П. Влияние полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 и температурного режима инкубации на синтез белка и потребление кислорода тканью ксеноклапанов аорты	79
Шарлай Т. М. Сравнительная оценка действия низкотемпературной консервации на дыхательную функцию роговой оболочки человека и некоторых животных	81
Калмыков К. К., Лобасенко Н. П., Тупчиенко Г. С., Медведева Г. Г. Влияние низкотемпературной консервации на иммуногенные и антигенные свойства аллотрансплантатов кожи	84
Цуцаева А. А., Маркова В. М., Петренко М. Д. Специфическая активность антитоксических противостолбнячных сывороток после воздействия низких температур и криофилактика полиэтиленоксида молекулярного веса 400	86
Сипитый В. И., Медведев Е. М., Муринец Б. Н. Криохирургический метод лечения опухолей больших полушарий мозга с применением прибора КМ-6	89
Скибенко К. П., Цуцаева А. А., Дудник Л. А. Исследование действия лазерного излучения малой мощности на клетки аденокарциномы Эрлиха	91
Рудько Ю. М. Продолжительность процесса размораживания клеточных суспензий в водяной бане	94 ●

• УДК 57:536.48.047

Актуальные проблемы криоконсервирования костного мозга. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А., Шенберг М. Г., Лобынцева Г. С., Луговой В. И. — В кн.: Криобиология и криомедицина. вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 3—16.

Представлен обзор литературы, а также изложены результаты собственных исследований по вопросам заготовки костного мозга, консервирования его при положительных и низких температурах под защитой различных криопротекторов. Наряду с данными по использованию стандартных защитных веществ приводятся материалы по криопротекторному действию полиэтиленоксидов, главным образом молекулярного веса 400. Намечены основные направления дальнейших исследований для усовершенствования метода криоконсервации костного мозга с целью улучшения сохранности всех видов миелиоцитозов и повышения его репопуляционных свойств.

Библиогр. 69. Табл. I.

УДК 532.78:547.426

К анализу общих закономерностей действия низких температур на биологический объект. Панков Е. Я., Друзь В. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 16—18.

• Анализ общих закономерностей взаимодействия биологического объекта и низких температур дан, исходя из моделируемых взаимоотношений самоусложняющегося элемента (биологического объекта), среды и действующего фактора (низкие температуры). Показано, что самоусложняющиеся элементы в биологической системе создают условия распределения их по нормальной кривой. Исходя из неравномерности распределения элементов по их качественной характеристике, произведен анализ изменения качества системы от силы и времени действия фактора и представлена поверхность, которая отражает эти отношения.

Рис. 2.

УДК 541.49:537.635:539.124:576.311:612.014.043

Эффекты комплексования полиэтиленоксидов с «биометаллами». Нардид О. А., Моисеев В. А., Лемешко В. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 19—21.

Методом электронного парамагнитного резонанса изучена возможность образовывать комплексы полиэтиленоксида с биологически важными катионами: двухвалентным железом и двухвалентным марганцем. На примере ингибирования дыхания полиэтиленоксидом НАД-Н-дегидрогеназного звена дыхательной цепи субмитохондриальных частиц строится предположение об образовании комплексов полиэтиленоксида с негемовым железом НАД-Н-дегидрогеназного участка дыхательной цепи.

Библиогр. 5. Рис. 2.

УДК 57:536.48.047:615.387

Условия роста кристаллов в растворе. I. Постановка задачи. Иткин Ю. А., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 21—27.

Обсуждаются обычно используемые при решении задач, связанных с ростом кристаллов, условия совместности на движущейся границе раздела фаз и выводятся более общие граничные условия. Обсуждается сама постановка задачи о росте кристалла и намечаются пути дальнейшего исследования.

Библиогр. 7. Рис. 7.

УДК 57:536.48.047:548.0:661.073.585

Кристаллизация водных растворов некоторых криопротекторов. Кулешова Л. Г., Моисеев В. А., Иткин Ю. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 27—31.

Приведен краткий обзор классической теории зарождения и роста кристаллов. Изучено влияние различных концентраций на особенности кристаллизации водных растворов некоторых криопротекторов. Показано, что изменение дисперсности структуры может быть связано с поверхностной активностью растворенного вещества.

Библиогр. 8. Табл. 1.

УДК 57:536.48.043:678.048

Влияние оксиэтилирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина. Шраго М. И., Калугин Ю. В., Кочуровская Г. Г., Матвиенко Н. М., Моисеев В. А., Марковский А. Л., Воротилин А. М., Карева Л. В., Бредихина Л. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев; «Наукова думка», 1976, с. 31—33.

В сравнительном плане представлены данные о вязкости, влиянии на поверхностно-активные свойства, осмотическое давление, структуру воды растворов глицерина и его оксиэтильных производных. Установлено, что по мере повышения степени полимеризации осмотическое давление растворов оксиэтилированных глицеринов снижается. Включение 5 оксиэтильных звеньев (ОЭГ, $n=5$) и более несколько понижает осмотическое давление, замена растворов ОЭГ на изоосмотическую среду не вызывает разрушения клеток. Оксиэтилирование, изменяя физико-химические свойства глицерина, оказывает влияние на его биологические эффекты, что может иметь значение при использовании оксиэтильных производных в качестве ингредиентов биологических сред.

Библиогр. 3. Табл. 3.

УДК 57:536.48.047.576.347

Криповреждения и криопротекция митохондрий *in vitro* и *in situ*. Лемешко В. В., Бондаренко В. А., Суббота Н. П., Белоус А. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 33—37.

Изучено влияние различных режимов замораживания изолированных митохондрий, срезов печени и коры почек крыс на сопряженность дыхания с синтезом АТФ и характер разобщения дыхания и фосфорилирования. Показана принципиальная возможность сохранения основной функции митохондрий — синтеза АТФ после замораживания-оттаивания *in vitro* и *in situ* под защитой ПЭО-400 и ДМСО.

Библиогр. 7. Табл. 2. Рис. 3.

УДК 57:536.48.047.612.014.1:547.96

Влияние низких температур на биосинтез белков в бесклеточной системе печени крыс. Гулевский А. К. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 37—39.

Изучали белоксинтезирующую активность постмитохондриального супернатанта, подвергнутого быстрому замораживанию до температуры -196° , либо выделенного из замороженной ткани и гомогената. Показано резкое снижение синтеза после замораживания-оттаивания ткани и гомогената. Изменения отсутствовали при замораживании-оттаивании постмитохондриального супернатанта.

Библиогр. 5. Рис. 2.

УДК 57:536.48.047

Наш опыт заготовки костномозгового трансплантата человека. Лакиза Б. С., Морозов И. А., Комлик П. В., Кононов Ю. В., Трунов Н. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 39—42.

В работе представлены некоторые организационные и научно-практические аспекты заготовки донорского и посмертного костного мозга. Показано, что в заготовке биологически полноценного костномозгового трансплантата принципиально важно тесное сотрудничество врачей скорой медицинской помощи, судебно-медицинских экспертов, отделов заготовки посмертных органов и тканей и низкотемпературных тканевых банков. Установлено также, что максимальное количество стерильного биологически полноценного посмертного костного мозга следует заготавливать комбинированным аспирационно-фрагментационно-компрессионным методом.

Библиогр. 4.

УДК 57:536.48.047.611—018.46.1.577.15

Фосфолипиды криоконсервированного костного мозга человека. Обозная Э. И., Маркова О. П., Морозов И. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 42—44.

Изучали содержание фосфолипидов в ядросодержащих клетках криоконсервированного костного мозга. Показано резкое уменьшение содержания фосфолипидов в клетках костного мозга после глубокого охлаждения без предварительной защиты. После замораживания-оттаивания клеток по двухэтапной программе с применением полиэтиленоксида молекулярного веса 400 содержание фосфолипидов в значительной степени зависело от жизнеспособности размороженных клеток; при относительно высокой жизнеспособности клеток по золиновой пробе (75—70%) отмечено низкое содержание фосфолипидов, при жизнеспособности 100—90% содержание фосфолипидов не отличалось от исходных проб.

Полученные результаты, надо полагать, свидетельствуют о высокой чувствительности метода к действию низких температур. Сопоставление данных по изучению содержания фосфолипидов с активностью окислительно-восстановительных ферментов позволило сделать предположение о возможном механизме действия низких температур на цитохромоксидазную систему переноса электронов, включая ее компоненты — ацетальфосфатиды, лецитины и фосфосерины.

Библиогр. 1. Рис. 1.

УДК 57:536.48.047:612.014.424.5

Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. I. Диэлектрические характеристики крови и ее фракций в диапазоне СВЧ. Тимошенко Ю. П., Пахмова И. С. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 44—47.

В работе приведены данные по измерению диэлектрических характеристик крови и ее фракций без криопротекторов и с добавлением глицерина и ПЭО-400 при температурах +25° и —25°. Показано, что диапазон частот от 500 до 5000 мГц характеризуется слабой частотной зависимостью ϵ и является удобным для СВЧ-размораживания. Проведены исследования температурной зависимости диэлектрической проницаемости эритроцитов с глицерином 10 и 20%-ной концентрации на 9000 мГц.

Библиогр. 6. Рис. 3.

УДК 57:536.48.047:612.014.424.5

Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. II. Термодинамические свойства крови при ее размораживании. Тимошенко Ю. П., Гаврилова И. И. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 47—49.

В работе приводятся результаты исследований температурной зависимости от —196° до 0° теплоемкости и теплопроводности лейкомаcсы донорской крови. Резкие изменения этих свойств наблюдаются в диапазоне температур от —21° до 0°. Ход температурной зависимости теплофизических свойств существенно изменяется при добавлении в суспензию клеток криопротектора (ПЭО-400).

Библиогр. 4. Рис. 2.

УДК 57:536.48.047:612.014.424.5

Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. III. Размораживание консервированной крови. Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 49—52.

В работе изложены физические основы процесса размораживания биологических объектов, характерным параметром которого является темп нагрева. Представленные результаты по размораживанию и нагреву ядерных клеток крови, консервированных низкими температурами (—196°) в присутствии криопротектора ПЭО-400, свидетельствуют об отсутствии отклонений от нормы.

Библиогр. 4. Табл. 1. Рис. 1.

УДК 57:536.48.047

Разработка методов консервирования костного мозга при умеренно низких температурах. Медведев П. М., Мамышева Т. К., Теодорович В. И., Мс-нахенко И. В., Раков А. А., Недельский Г. Т. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 52—56.

Работа посвящена изучению возможности консервирования костного мозга при умеренно низких температурах (-40° и -70°). В эксперименте на мышах линии С₅₇ВГ с помощью клонирования установлено, что оптимальным из изученных режимов является двухэтапное замораживание костного мозга до -70° с последующим хранением его при данной температуре. Этот режим обеспечивает сохранение колониеобразующей способности 61% стволовых кроветворных клеток на протяжении 1 месяца консервирования.

Результаты изучения посмертного костного мозга человека, замороженного по указанному режиму, свидетельствуют о возможности консервирования его при -70° в течение 3—4 недель.

Библиогр. 2. Рис. 2.

УДК 57:536.048.047

Влияние низких температур на аденозинтрифосфатазную систему клеток костного мозга крыс. Панков Е. Я., Маркова О. П., Строна В. И. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 56—57.

В статье дана характеристика АТФазной системы клеток крови и костного мозга в норме и в результате действия низких температур (-196°). Установлено, что низкотемпературная консервация миелокариоцитов костного мозга крыс под защитой ПЭО-400 вызывает повышение активности АТФазы, что, вероятно, является следствием разрушения цитоплазматических мембран в результате действия низких температур.

Библиогр. 3.

УДК 57:536.048.047

Действие производных окиси этилена на ядерные клетки костного мозга крыс. Строна В. И. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 57—59.

Изучалось действие двух производных окиси этилена — полиэтиленоксида-400 (ПЭО-400) и оксиэтилированного пентаэритрита (ОЭП) на миелокариоциты костного мозга крыс. На основании проведенных исследований установлено, что эти вещества не вызывают гибели клеток костного мозга при времени эквilibрации до 5 ч в условиях комнатной температуры. Этот факт дает основание более углубленно изучить влияние ОЭП на морфофункциональные свойства миелокариоцитов.

Табл. 2.

УДК 57:536.48.047

Сравнительная оценка процесса криоконсервирования кроличьего костного мозга в различных аппаратах. Холодный А. Я., Багаутдинов Ш. М., Петренко Г. И., Киселева М. В., Турбина И. Л., Руденко Н. Н. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 59—62.

На 24 образцах кроличьего костного мозга проведена сравнительная оценка процесса криоконсервирования на аппаратах программного замораживания: 1) замораживателе биопродукта ЗБ 00.00.00, разработанном ФТИНТ АН УССР; 2) аппарате для замораживания биопродуктов КВ 1519 00.000 ТО. Обнаружено, что конструктивные особенности датчика температур биопродукта аппарата ЗБ 00.00.00 АН позволяют регистрировать показатели начала кристаллизации биопродукта только в верхних слоях его, что обуславливает более низкую биологическую сохранность взвеси костного мозга после оттаивания.

Табл. 2.

УДК 57:536.048.47:612.127.2

К вопросу о влиянии полиэтиленоксидов на кислородную емкость эритроцитов человека. Бредихина Л. П., Лубяный В. Г. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 62—64.

Приведены результаты исследования влияния активных криопротекторов — полиэтиленоксидов на кислородную емкость эритроцитов донорской крови в зависимости от их молекулярного веса и концентрации. Установлено, что добавление растворов полиэтиленоксидов не оказывает отрицательного влияния на кислородную емкость эритроцитов, не препятствует диффузии кислорода в клетки. Опыты подтверждают, что эритроциты после контакта с полиэтиленоксидами не теряют способности связывать кислород. Следовательно, до замораживания эта функция у эритроцитов сохранена.

Библиогр. 13. Рис. 1.

УДК 57:536.48.047

Влияние высокого давления на сохранность клеток крови при замораживании. Воротилин А. М., Корчиков С. Д., Гордиенко Л. В. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 65—68.

В работе изучалось влияние давлений до 2500 атм и замораживания на сохранность эритроцитов человека. Показано, что устойчивость клеток к давлению зависит от его величины, скорости подъема, сброса, экспозиции и состава среды. При использовании экзогенных криопротекторов при замораживании клеток обнаружен защитный эффект давления. Описаны конструкции установок для замораживания биологических продуктов под давлением.

Библиогр. 9. Табл. 1. Рис. 1.

УДК 57:536.48.047:612.438.4

Функциональная активность тимоцитов, подвергнутых низкотемпературной консервации (-196°). Васильченко В. Н., Иванов Э. Н., Леонтьев В. С., Васильченко Н. С. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 68—71.

Изучали способность тимоцитов, подвергнутых низкотемпературной консервации (-196°) по модифицированной методике Фарранта, стимулировать образование эндокolonий в селезенке сублетально облученных реципиентов и обеспечивать кооперативное взаимодействие в иммунной реакции на бараньи эритроциты. Активность реконсервированных тимоцитов в изученных тестах значительно не отличалась от активности нативных тимоцитов. Авторы пришли к выводу, что глубокое охлаждение не влияет на биологическую организацию тимоцитов.

Библиогр. 9. Рис. 2.

УДК 611.611:547.422:317.33:543.42

Состояние воды в почке, перфузированной растворами полиэтиленоксида с молекулярным весом 400. Дворцовой В. К., Митасов В. И., Марковский А. Л., Моисеев В. А. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 71—73.

Изучена диэлектрическая проницаемость (ϵ) ткани почки, перфузированной при температуре 37° растворами полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) резонаторным методом при частоте 10 Гц. Результаты исследований показали, что время перфузии не сказывается существенно на гидратационных свойствах ткани почки. Перфузия растворами ПЭО-400 (до 5%) приводит к увеличению свободной воды в ткани почки. При 10—15%-ной концентрации ПЭО-400 в перфузате наблюдали отсутствие изменений в соотношении свободной и связанной воды в почке и увеличение количества связанной воды при концентрации более 15%.

Рис. 2.

УДК 576.72:611.611:615.015

Морфологическая оценка почек на первых этапах криоконсервации. Козлова В. Ф., Дворцовой В. К. — В кн.: Кробиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 73—74.

Изучались особенности микроскопического строения почек, перфузированных при различных температурных условиях растворами, содержащими криопротектор полиэтиленоксид молекулярного веса 400 (ПЭО-400) в 10%-ной концентрации. На основании микроскопического исследования установлено, что более щадящей является гипотермическая перфузия. Применение ПЭО-400 в составе перфузата вызывает некоторое обезвоживание паренхимы органа с сохранением основных его структурных элементов. Дегидратирующее действие криопротектора без нарушения целостности элементов почечной паренхимы и стромы дает основание для дальнейшего изучения действия ПЭО-400 при криоконсервации почки.

Библиогр. 3.

УДК 57:536.48.047:612.444.013.2

Морфологические исследования криоконсервированных трансплантатов щитовидной железы. Шенберг М. Г. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 75—77.

Представлены результаты гистологического исследования нативных и криоконсервированных щитовидных желез, предварительно перфузированных 30%-ным раствором ПЭО-400. В большей части аллотрансплантатов железистая паренхима была замещена моноклеарными клетками, среди которых преобладали лимфоциты. Через 60 дней после пересадки криоконсервированных щитовидных желез наблюдались фолликулы с признаками морфологической активности, что свидетельствует о возможности сохранения в них участков железистой ткани, способной к пролиферации и образованию типичных структурно-функциональных единиц после воздействия низких температур.

Библиогр. 7. Табл. 1.

УДК 616—089.843:536.48:591.444:591.147.6

Реакция коры надпочечников на гомотрансплантацию щитовидной железы — свежей и криоконсервированной (—196°). Чуйко В. А., Онуфриева Г. А., Митасов В. И. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 77—79.

В экспериментах на тиреоидэктомированных крысах проводилось сравнительное изучение реакции коры надпочечников на гомопересадку щитовидной железы свежей и консервированной при ультранизких температурах (—196°) в присутствии криопротектора полиэтиленоксида молекулярного веса 400. Установлено, что пересадка щитовидной железы приводит к повышению уровня 11-ОКС в крови. Указанная реакция наиболее выражена при трансплантации замороженной ткани, хотя ее развитие носит более медленный характер, чем при пересадке свежей щитовидной железы. Трансплантация щитовидной железы, как свежей, так и замороженной, тиреоидэктомированным животным сопровождается восстановлением чувствительности коры надпочечников к АКТГ.

Библиогр. 6. Рис. 2.

УДК 611.126:547.96:612.015.35.547.422

Влияние полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 и температурного режима инкубации на синтез белка и потребление кислорода тканью ксеноклапанов аорты. Пономарев Ю. И., Гулевский А. К., Обозный Э. П., Чеканов В. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 79—81.

В работе изучено влияние полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) на синтез белка и потребление кислорода тканью ксеноаортального клапана при нормо- и гипотермической инкубации. Использовались методы включения C^{14} -аминокислот и микрореспирометрии. Результаты исследования показали, что синтез белка в ткани при нормотермической инкубации с ПЭО-400 резко падает, тогда как гипотермия при инкубации с ПЭО-400 позволяет сохранить исходный уровень синтеза белка и поглощения кислорода.

Библиогр. 7. Рис. 3.

УДК 615.361.841.2.014.41

Сравнительная оценка действия низкотемпературной консервации на дыхательную функцию роговой оболочки человека и некоторых животных. Шарлай Т. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 81—84.

В работе в сравнительном аспекте изучалось дыхание трупных роговых оболочек человека, кролика и свиньи до и после низкотемпературной консервации. Результаты исследований показали, что процент снижения дыхательной функции у трупных роговых оболочек человека, кролика и свиньи, замороженных до температуры —196° под защитой ПЭО-400 10%-ной концентрации, существенно не отличается.

Библиогр. 12. Табл. 1.

УДК 611.77:536.48:612.017.12

Влияние низкотемпературной консервации на иммуногенные и антигенные свойства аллотрансплантатов кожи. Калмыков К. К., Лобасенко Н. П., Тупчиенко Г. С., Медведева Г. Г. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 84—86.

Об иммуногенных и антигенных свойствах деконсервированных кожных лоскутов судили по времени их выживания у реципиентов, примированных пересадкой нативных и деконсервированных лоскутов кожи. Выявлены зависимость выживаемости трансплантатов от интервала между первой и второй пересадкой кожи и различия в выживаемости деконсервированных и нативных трансплантатов.

Библиогр. 6. Табл. 1.

УДК 615.373.3:615.014.4:536.48

Специфическая активность антитоксических противостолбнячных сывороток после воздействия низких температур и криофилактика полиэтиленоксида молекулярного веса 400. Цуцаева А. А., Маркова В. М., Петренко М. Д. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 86—89.

В работе изучался характер воздействия низких температур и криофилактика полиэтиленоксида молекулярного веса 400 (ПЭО-400) в разных концентрациях на специфическую активность антитоксических противостолбнячных сывороток. Установлено, что криофилактик ПЭО-400 в концентрациях 10 и 15% оказывает стабилизирующий эффект на свойства иммунных глобулинов при низкотемпературной консервации.

Табл. 3. Рис. 1.

УДК 57:536.48:048:622.234.6

Криохирургический метод лечения опухолей больших полушарий мозга с применением прибора КМ-6. Сипитый В. И., Медведев Е. М., Муринец Б. Н. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2, Киев, «Наукова думка», 1976, с. 89—91.

Настоящее сообщение основано на анализе результатов криохирургического лечения 56 больных опухолями больших полушарий мозга с применением специального криохирургического прибора КМ-6.

Показано, что применение криохирургического метода лечения больных с использованием прибора КМ-6 способствует более радикальному удалению опухолей и быстрому восстановлению нарушенных функций мозга в послеоперационном периоде.

УДК 578.08:615.849.19:616.006.6

Исследование действия лазерного излучения малой мощности на клетки аденокарциномы Эрлиха. Скибенко К. П., Цуцаева А. А., Дудник Л. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 91—94.

Исследовали *in vitro* действие различных доз света гелий-неонового лазера на клетки аденокарциномы Эрлиха. Изучалась скорость синтеза ДНК облученными и нелюбыми клетками на 7-й день развития аденокарциномы Эрлиха и их патогенность.

Результаты исследования показали, что после облучения клеток лучами лазера они интенсивнее включают H^3 -тимидин в процессе своего роста, а также наблюдается увеличение веса солидных опухолей.

Библиогр. 4. рис. 4.

УДК 57.536.48.047:615.47

Продолжительность размораживания клеточных суспензий в водяной бане. Рудько Ю. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 2. Киев, «Наукова думка», 1976, с. 94—95.

Для создания новой аппаратуры с водяными банями, которая может применяться при криоконсервировании с целью размораживания клеточных суспензий в различных типах контейнеров, необходимо получение данных о влиянии на этот процесс температуры теплоносителя, материала, объема и формы контейнера, характера перемешивания биоматериала при его вибрации или покачивании.

В работе приводятся данные о продолжительности размораживания биоматериала в контейнерах, которые применяются в медицине и биологии. Отогрев биоматериала производился в водяных банях различного типа при температуре теплоносителя 40° и 50°.

Табл. 1.



92 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»