

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

3|89



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), С. И. Аксенов, Г. А. Бабийчук, М. Е. Бекер, Ю. П. Благой, Л. Вонг, А. Н. Гольцев, К. Дж. Грин, Г. Ф. Жегунов, В. И. Луговой, В. Я. Малеев, Г. Маттес, П. Мнержичка, Е. Я. Панков, Ф. А. Приходько (отв. секретарь), Н. С. Пушкар, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, А. А. Цуцаева, С. А. Шалимов, Т. Н. Юрченко, Э. З. Эмирбеков

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Д. Бугров (Харьков), В. Я. Волков (Оболensk, Моск. обл.), В. М. Гордиенко (Киев), В. Н. Запорожан (Одесса), П. А. Калиман (Харьков), С. С. Лаврик (Киев), В. В. Лемешко (Харьков), В. Д. Мануильский (Киев), В. А. Моисеев (Харьков), А. С. Попов (Москва), Н. Г. Соломонов (Якутск), Ю. С. Суханов (Москва), В. В. Шенталь (Москва), М. И. Шраго (Харьков)

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), S. I. Aksenov, G. A. Babiychuk, M. E. Beker, Yu. P. Blagoj, L. Wang, A. N. Goltsev, C. J. Green, G. F. Zhegunov, V. I. Lugovoj, V. Ya. Maleyev, G. Matthes, P. Měřička, E. Ya. Pankov, F. A. Prikhodko, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, A. A. Tsutsayeva, S. A. Shalimov, T. N. Yurchenko, E. Z. Emirbekov

EDITORIAL COUNCIL

A. D. Bugrov (Kharkov), V. Ya. Volkov (Obolensk, Moscow Region), V. M. Gordiyenko (Kiev), V. N. Zaporozhan (Odessa), P. A. Kaliman (Kharkov), S. S. Lavrik (Kiev), V. V. Lemesenko (Kharkov), V. D. Manuilsky (Kiev), V. A. Moiseyev (Kharkov), A. S. Popov (Moscow), N. G. Solomonov (Yakutsk), Yu. S. Sukhanov (Moscow), V. V. Shental (Moscow), M. I. Shrago (Kharkov)

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

3 1989

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1985 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1989

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Гордиенко Е. А., Коваленко И. Ф. Осмотическая реакция клеток на контакт с гипертоническими средами и охлаждение	3
Березовский А. А., Леонтьев Ю. В. Математическое прогнозирование криовоздействия на биологические ткани	7
Сахаров Б. В., Волков В. Я. Факторы, вызывающие повреждения биологических мембран при медленном замораживании. Исследование теней эритроцитов методом ЯМР-релаксации	13
Де Лекер Р., Пеннинкс Ф. Осмотическое влияние быстрого удаления криопротекторов на увеличение объема и гемолиз эритроцитов	18
Бобрышев В. Д., Снурников А. С., Швед В. Б. Моделирование процесса диэлектрического разогрева криоконсервированных клеточных суспензий	23
Кравченко Л. П., Карева Л. В., Луговой В. И. Криповреждение лизосом изолированных гепатоцитов при замораживании—оттаивании	27
Дегтярев А. В., Бондаренко В. А. Холодовый шок фосфолипидных везикул. Термоупругий механизм нарушения барьерной функции мембраны	30
Капрельянц А. С. Ультраструктурные основы альтерации печени в криохирургии	35

КРИОМЕДИЦИНА

Ступин И. В., Микаелян Н. П., Сандомирский Б. П., Слета И. В., Коцько Н. И. Влияние резекции печени плазменным потоком и криовоздействием на некоторые биохимические показатели сыворотки крови	40
Яковцова А. Ф., Питенько Н. Н., Ганулич Т. В., Васюта В. С., Марковский В. Д. Компенсаторно-приспособительные процессы в миокарде при краниоцеребральной гипотермии (экспериментальное исследование)	43
Низов В. Н. Сочетанное применение криовоздействия и низкочастотной магнитотерапии при лечении патологии шейки матки	48

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Батраков В. Н., Белоусов Ю. П., Полончук А. М., Прокопчик В. В., Соколов В. А. Сублимационная установка УЗВ 1	52
---	----

ХРОНИКА	55
-------------------	----

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ	55
------------------------------	----

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1989

This One



U5JW-1BJ-70FQ

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Gordiyenko E. A., Kovalenko I. F.</i> The osmotic response of cells to hypertonic media	3
<i>Berezovsky A. A., Leontyev Yu. V.</i> Mathematical prediction of low temperature effects on biological tissues	7
<i>Sakharov B. V., Volkov V. Ya.</i> Factors of cryoinjury in biological membranes on slow freezing. Investigation of erythrocyte ghosts by the method of NMR relaxation	13
<i>De Loecker R., Penninckx F.</i> Osmotic effects of rapid dilution of cryoprotectants on erythrocyte swelling and hemolysis	18
<i>Bobryshev V. D., Snurnikov A. S., Shved V. B.</i> Modelling of the processes of dielectric warming of cryopreserved cellular suspensions	23
<i>Kravchenko L. P., Kareva L. V., Lugovoj V. I.</i> Cryodamage of lysosomes of isolated hepatocytes during freeze-thawing	27
<i>Degtyarev A. V., Bondarenko V. A.</i> Cold shock of phospholipid vesicles. The thermoelectric mechanism of impairment of the membrane barrier function	30
<i>Kaprelyants A. S.</i> Ultrastructural aspects of liver alteration in cryosurgery	35

CRYOMEDICINE

<i>Stupin I. V., Mikaelyan N. P., Sandomirsky B. P., Sleta I. V., Kotsko N. I.</i> The effect of plasma lancet resection and cryoapplication on biomedical indices of blood serum	40
<i>Yakovtsova A. F., Pitenko N. N., Ganulich T. V., Vasuta V. S., Markovsky V. D.</i> Compensatory adaptive processes in myocardium upon craniocerebral hypothermia	43
<i>Nizov V. N.</i> The combined use of cryoapplication and low frequency magnetic therapy for treating pathology of cervix uteri	48

CRYOGENIC EQUIPMENT

<i>Batrakov V. N., Belousov Yu. P., Polonchuk A. M., Prokopchik V. V., Sokolov V. A.</i> A lyophilization unit UZV 1	52
<i>CHRONICLE</i>	55
<i>DEFENSE OF THESES</i>	55

Адрес редакции:

310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23,
тел. 72-10-39

Научный редактор А. М. Белоус

Редактор З. В. Линевиц

Технический редактор В. Н. Волкова

Корректор Н. П. Спичак

Сдано в набор 12.04.89. Подп. в печать 21.06.89. БЦ 23175. Формат 70×108 1/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр.отт. 5,6. Уч. изд. л. 5,2. Тираж 1000 экз. Зак. 9-156. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской типографии № 16. 310003, Харьков 3, ул. Университетская, 16. Зак. 1071.

Е. А. Гордиенко, И. Ф. Коваленко

ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ КЛЕТОК НА КОНТАКТ С ГИПЕРТОНИЧЕСКИМИ СРЕДАМИ И ОХЛАЖДЕНИЕ

С помощью численного решения на ЭВМ системы уравнений, описывающих процессы переноса веществ между клеткой и окружающей ее средой, изучена кинетика изменения относительного объема клетки, а также концентраций проникающего и не проникающего через плазматическую мембрану веществ при комбинированном воздействии гипертонии и охлаждения с постоянной скоростью.

В процессе низкотемпературного консервирования клетки подвергаются совместному воздействию гипертонических растворов и охлаждения. В связи с этим представляют интерес численные эксперименты, моделирующие реакцию клеток на указанные факторы.

Процесс изменения относительного объема клетки и осмотического давления растворенных внутри нее веществ описывается системой уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dy}{dt} &= \frac{1}{\tau_0} \frac{1 - \alpha g_0}{1 - g_0 y} [\sigma_1 \hat{\pi}_1^i - \sigma_1 \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_{2\infty} + (1 - \alpha)/(y - \alpha)]; \\ \frac{d\hat{\pi}_1^i}{dt} &= -\frac{1}{\tau_1} (1 - \alpha g_0) (y - \alpha)^{-1} (1 - g_0 y)^{-1} (\hat{\pi}_1^i - \hat{\pi}_{1\infty}) - \\ &- \frac{1}{\tau_0} (1 - \alpha g_0) (y - \alpha)^{-1} (1 - g_0 y)^{-1} [\sigma_1 \hat{\pi}_1^i - \sigma_1 \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_{2\infty} + (1 - \alpha)/(y - \alpha)]; \\ \hat{\pi}_2^i &= (1 - \alpha)/(y - \alpha), \end{aligned} \quad (1)$$

где обозначения совпадают с принятыми в предыдущей работе [1].

В первом приближении влияние охлаждения на кинетику изменения объема клетки и растворенных внутри нее веществ можно учесть, полагая, что изменение коэффициентов фильтрации и проницаемости плазматической мембраны для растворенного вещества с температурой подчиняется аррениусовым зависимостям:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{U_0}{RT_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right], \quad k_1(T) = k_1(T_0) \exp \left[\frac{U_1}{RT_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right], \quad (2)$$

где T_0 — исходная (до начала охлаждения) температура клеточной суспензии, U_0 и U_1 — соответственно энергии активации процесса переноса через плазматическую мембрану молекул воды и первого растворенного вещества, R — универсальная газовая постоянная. Если охлаждение производится с постоянной скоростью β , то, очевидно,

$$T_0 \frac{d}{dt} = \beta \frac{d}{d\hat{T}}, \quad (3)$$

где $\hat{T} = \frac{T}{T_0}$ — относительная температура суспензии. С учетом соотношений (2) и (3) систему уравнений (1) можно представить в следующем виде:

$$\begin{aligned} \frac{dy}{d\hat{T}} &= p \exp [a(\hat{T} - 1)/\hat{T}] (1 - \alpha g_0) (1 - g_0 y)^{-1} [\sigma_1 \hat{\pi}_1^i - \\ &- \sigma_1 \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_{2\infty} + (1 - \alpha)/(y - \alpha)]; \end{aligned} \quad (4)$$

$$\frac{d\hat{\pi}_1^t}{dt} = -p \{ q \exp [b(\hat{T} - 1)/\hat{T}] [\hat{\pi}_1^t - \hat{\pi}_{1\infty}] + \hat{\pi}_1^t \exp [a(\hat{T} - 1)/\hat{T}] \times \\ \times [\sigma_1 \hat{\pi}_1^t - \sigma_1 \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_{2\infty} + (1 - \alpha)/(y - \alpha)] (1 - \alpha g_0) (y - \alpha)^{-1} (1 - g_0 y)^{-1}; \\ \hat{\pi}_2^t = (1 - \alpha)/(y - \alpha),$$

где введены четыре безразмерных комплекса:

$$p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}, \quad q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}, \quad a \equiv \frac{U_0}{RT_0}, \quad b \equiv \frac{U_1}{RT_0}.$$

На рис. 1—8 приведены полученные путем численного решения системы уравнений (4) на ЭВМ графики, описывающие кинетику изменения клеточного объема и внутриклеточных концентраций проникающего и не проникающего через плазматическую мембрану веществ, при различных значениях параметров p , q , α , g_0 . Графики, приведенные на рис. 1, 4—8 соответствуют случаю, когда воздействия гипертонического раствора и охлаждения на клетку начинаются одновременно. Графики, представленные на рис. 2, относятся к случаю, когда охлаждение начинается в момент достижения клеткой минимального объема в процессе предшествующего изотермического (при температуре T_0) контакта с гипертоническим раствором. На рис. 3 представлены графики, описывающие изменение объема клетки и концентраций растворенных внутри нее веществ в процессе охлаждения, начинающегося после того, как клетка в результате достаточно длительного контакта с гипертонической средой при температуре T_0 восстановила свой объем до значения 0,6.

Изменение аргумента T/T_0 от 1 до 0,8 охватывает большинство из представляющих практический интерес ситуаций, а если учесть, что при $T/T_0 \gg 0,8$ исследуемые величины с течением времени остаются неизменными, то фактически учитываются все случаи, которые относятся к этапу охлаждения клеточной суспензии до начала кристаллизации в ней.

Из проведенных численных экспериментов следует, что при небольших значениях параметра $|p|$ ($|p| \ll 1$) в процессе охлаждения с постоянной скоростью объем клеток и концентрация растворенных в них веществ не успевают заметно отклониться от исходных (до охлаждения) значений вплоть до начала кристаллизации в образце. Естественно, процесс изменения объема и концентраций сильнее выражен в области более высоких температур и фактически прекращается до достижения температуры кристаллизации. Поэтому, как подчеркивалось выше, исследуемые величины по мере охлаждения изменяются до некоторого значения, а затем в процессе дальнейшего охлаждения не изменяются.

В процессе охлаждения относительный объем V/V_0 и осмотическое давление не проникающих через плазматическую мембрану веществ внутри клетки $\hat{\pi}_2^t$ успевает восстановиться до значений тем более близких к единице, чем больше по абсолютной величине безразмерный параметр p . С ростом параметра $|p|$, естественно, увеличивается концентрация проникшего внутрь клетки вещества. При $|p| \gg 1$ $\hat{\pi}_2^t$ (относительный объем клетки V/V_0) вначале достигает пикового значения, тем меньшего (большего), чем больше абсолютное значение параметра p . Изменение параметра b в пределах пятидесяти процентов слабо влияет на кинетику исследуемых величин.

С ростом параметра α изменение объема клетки в процессе охлаждения становится менее выраженным, а осмотическое давление $\hat{\pi}_1^t$ достигает все больших значений. Увеличение параметра g_0 приводит к более значительному уменьшению объема клетки в процессе охлаждения и к достижению более высоких значений $\hat{\pi}_1^t$ и $\hat{\pi}_2^t$.

Как следует из анализа данных, представленных на рис. 1—8, в зависимости от температуры и длительности изотермического контакта клеток с гипертонической средой, режима последующего охлаждения, а также

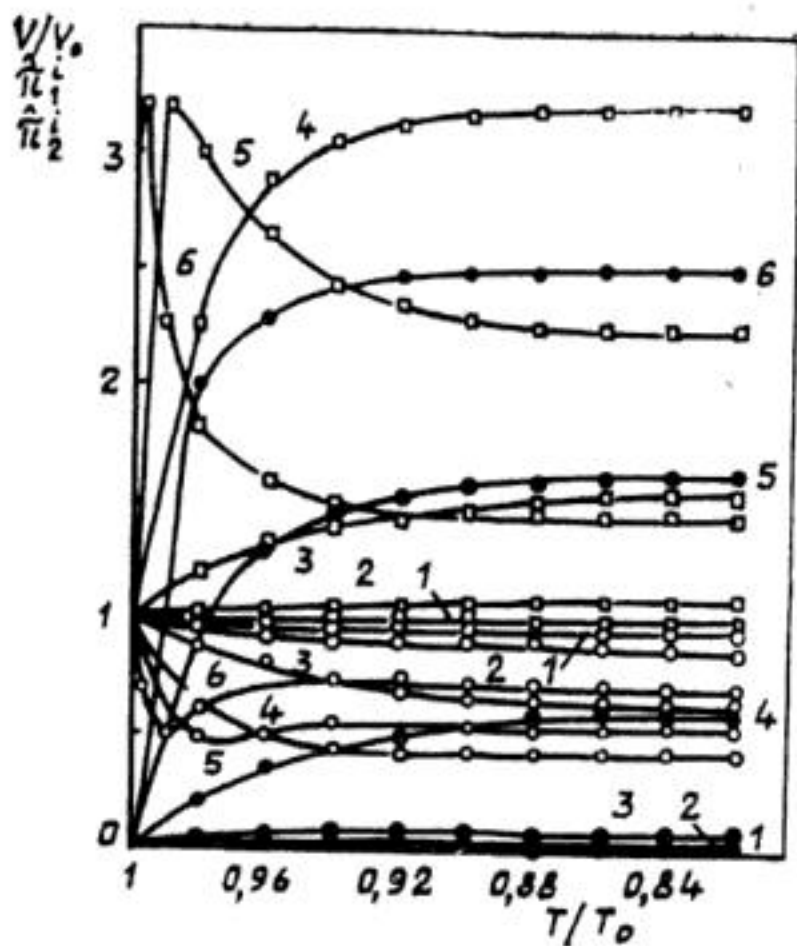


Рис. 1

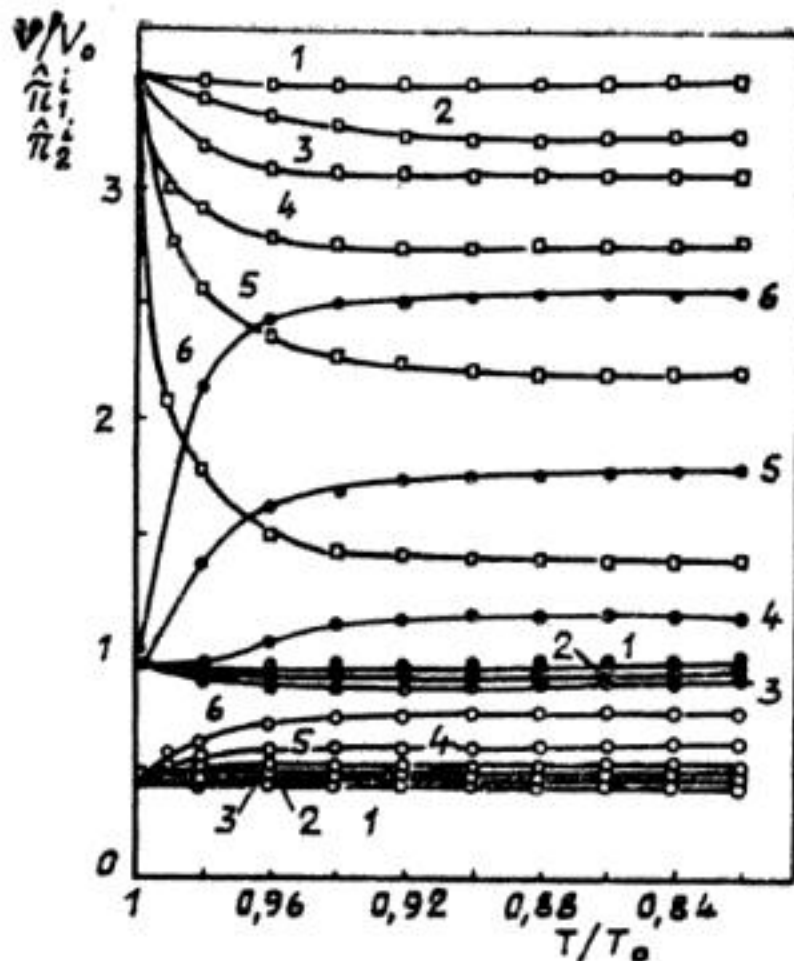


Рис. 2

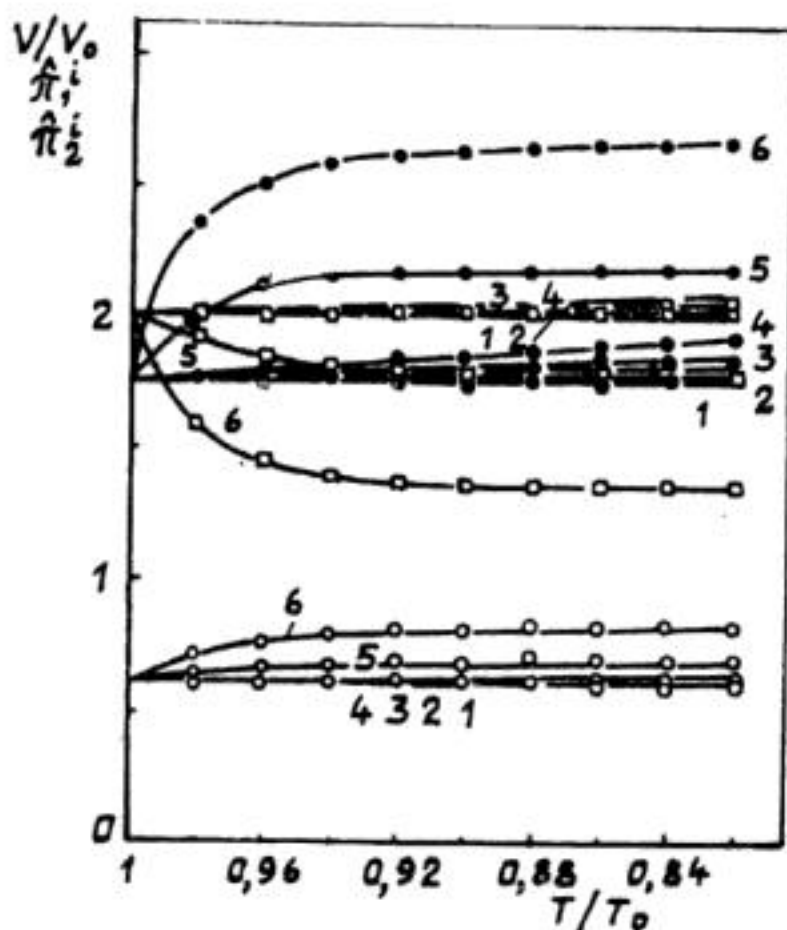


Рис. 3

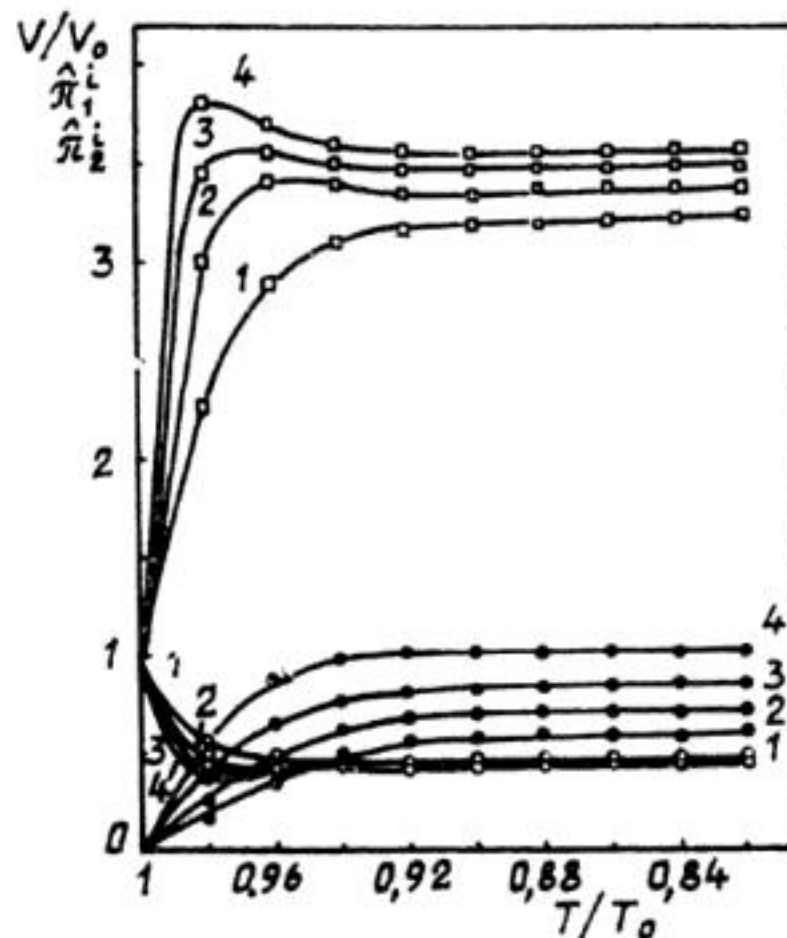


Рис. 4

Рис. 1. Кинетика изменения клеточного объема (○) и внутриклеточных концентраций проникающего (●) и не проникающего (□) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 1$; $\pi_1^i(0) = 0$; $a = b = 25$; $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; $\alpha = 0,2$; $g_0 = 0$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$ и различных значениях параметра p : 1 — $|p| = 0,12$; 2 — $|p| = 0,6$; 3 — $|p| = 3$; 4 — $|p| = 15$; 5 — $|p| = 75$; 6 — $|p| = 375$

Рис. 2. Кинетика изменения клеточного объема (○) и внутриклеточных концентраций проникающего (●) и не проникающего (□) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 0,43$; $\pi_1^i(0) = 0$; $a = b = 25$; $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; $\alpha = 0,2$; $g_0 = 0$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$ и различных значениях параметра p : 1 — $|p| = 0,12$; 2 — $|p| = 0,6$; 3 — $|p| = 3$; 4 — $|p| = 15$; 5 — $|p| = 75$; 6 — $|p| = 375$

Рис. 3. Кинетика изменения клеточного объема (○) и внутриклеточных концентраций проникающего (●) и не проникающего (□) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 0,6$; $\pi_1^i(0) = 1,76$; $a = b = 25$; $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; $\alpha = 0,2$; $g_0 = 0$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$ и различных значениях параметра p : 1 — $|p| = 0,12$; 2 — $|p| = 0,6$; 3 — $|p| = 3$; 4 — $|p| = 15$; 5 — $|p| = 75$; 6 — $|p| = 375$

Рис. 4. Кинетика изменения клеточного объема (○) и внутриклеточных концентраций проникающего (●) и не проникающего (□) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 1$; $\pi_1^i(0) = 0$; $a = b = 25$; $|p| = 15$; $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; $\alpha = 0,2$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$ и при различных значениях параметра g_0 : 1 — $g_0 = 0$; 2 — $g_0 = 0,25$; 3 — $g_0 = 0,5$; 4 — $g_0 = 0,75$

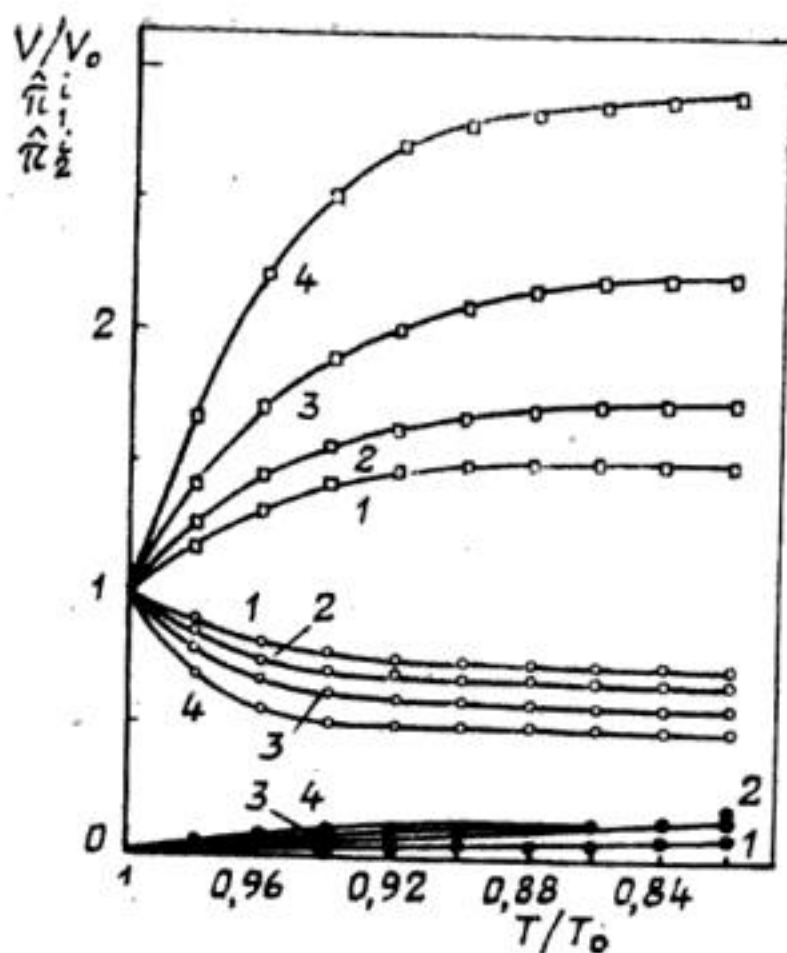


Рис. 5

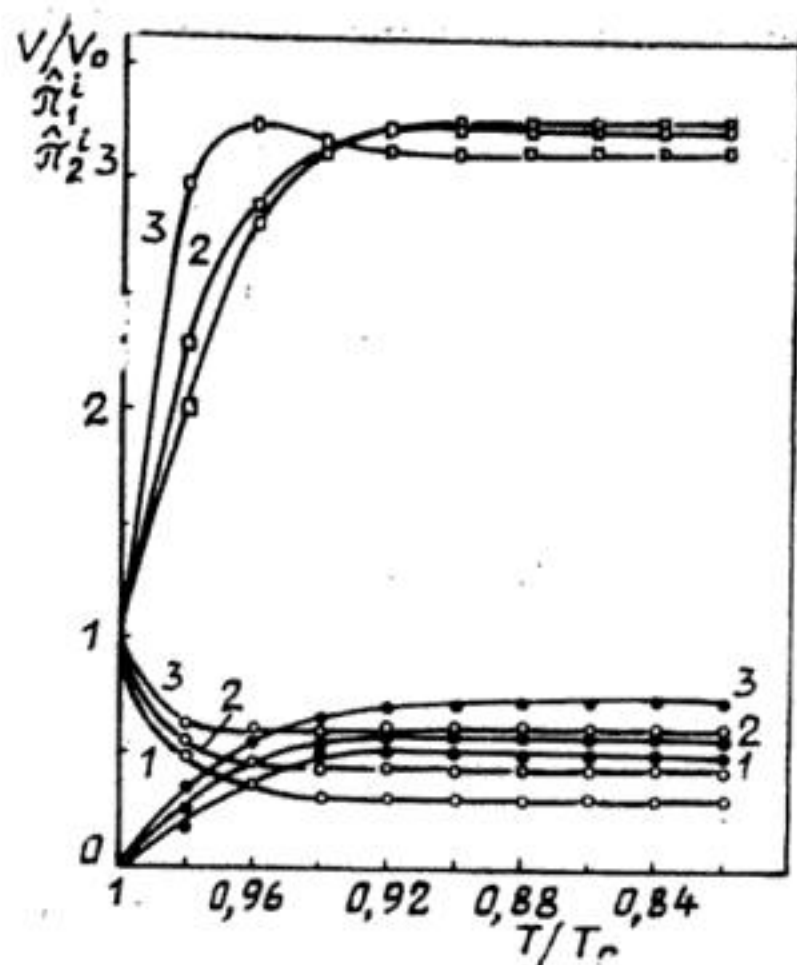


Рис. 6

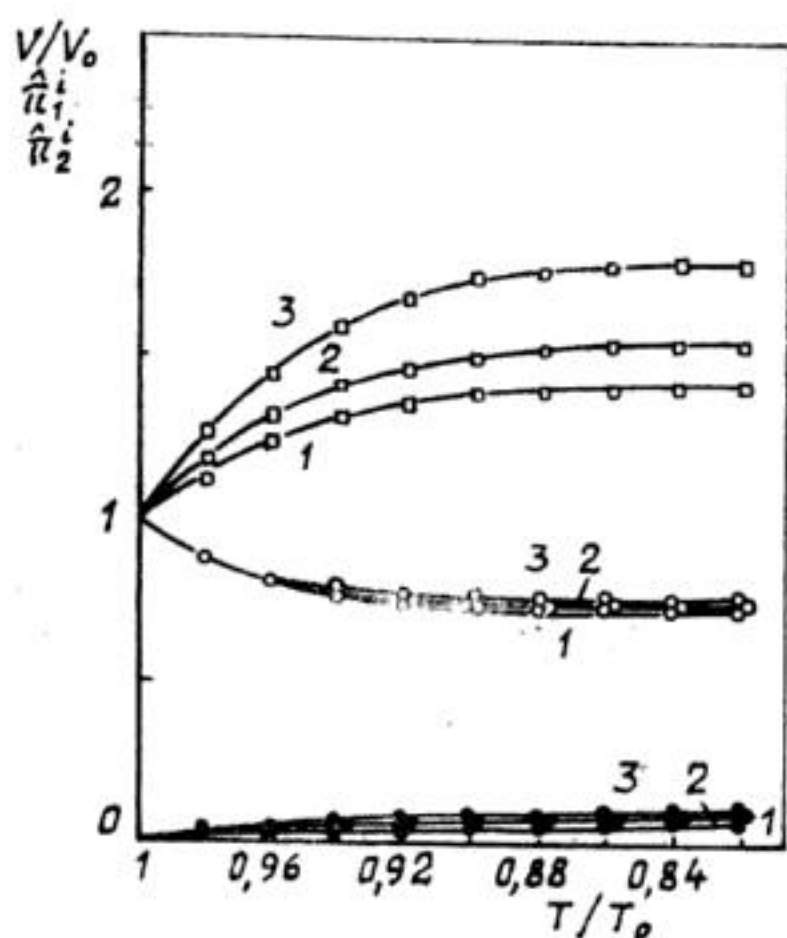


Рис. 7

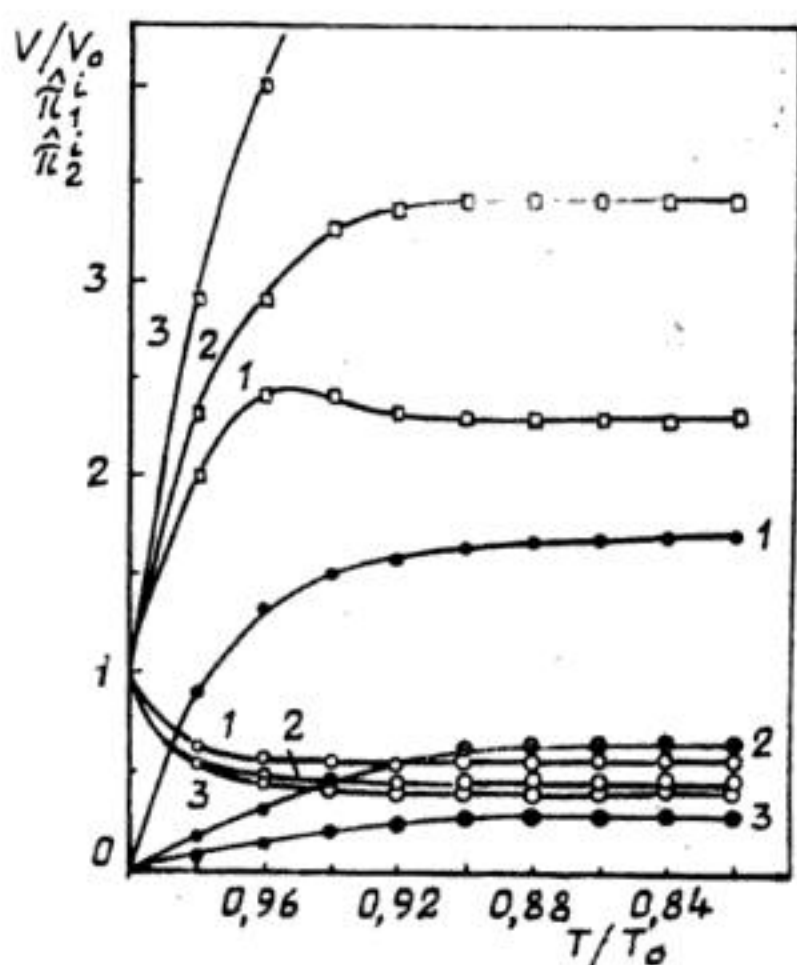


Рис. 8

Рис. 5. Кинетика изменения клеточного объема ($\circ$) и внутриклеточных концентраций проникающего ($\bullet$) и не проникающего ($\square$) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 1$; $\pi_1^i(0) = 0$; $a = b = 25$; $|p| = 3$; $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; $\alpha = 0,2$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$ и различных значениях параметра g_0 : 1 — $g_0 = 0$; 2 — $g_0 = 0,25$; 3 — $g_0 = 0,5$; 4 — $g_0 = 0,75$

Рис. 6. Кинетика изменения клеточного объема ($\circ$) и внутриклеточных концентраций проникающего ($\bullet$) и не проникающего ($\square$) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 1$; $\pi_1^i(0) = 0$; $a = b = 25$; $|p| = 15$; $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$; $g_0 = 0$ и при различных значениях параметра α : 1 — $\alpha = 0$; 2 — $\alpha = 0,2$; 3 — $\alpha = 0,4$

Рис. 7. Кинетика изменения клеточного объема ($\circ$) и внутриклеточных концентраций проникающего ($\bullet$) и не проникающего ($\square$) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 1$; $\pi_1^i(0) = 0$; $a = b = 25$; $|p| = 3$; $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; $g_0 = 0$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$ и при различных значениях параметра α : 1 — $\alpha = 0$; 2 — $\alpha = 0,2$; 3 — $\alpha = 0,4$

Рис. 8. Кинетика изменения клеточного объема ($\circ$) и внутриклеточных концентраций проникающего ($\bullet$) и не проникающего ($\square$) через плазматическую мембрану веществ при $y(0) = 1$; $\pi_1^i(0) = 0$; $a = b = 25$; $|p| = 15$; $\alpha = 0,2$; $g_0 = 0$; $\sigma_1 = 0,9$; $\pi_{1\infty} = 3$; $\pi_{2\infty} = 1$ и различных значениях параметра τ_0/τ_1 : 1 — $\tau_0/\tau_1 = 0,5$; 2 — $\tau_0/\tau_1 = 0,1$; 3 — $\tau_0/\tau_1 = 0,05$

значений параметров, характеризующих как отдельные клетки, так и биологическую суспензию в целом, клетки испытывают разные по амплитуде и длительности концентрационные и деформационные нагрузки. Последние можно снизить, подбирая более благоприятные режимы консервирования путем проведения численных экспериментов с использованием представленной в работе физико-математической модели. Следует подчеркнуть, что к моменту, когда в суспензии начинается кристаллизация, степень пересыщения внеклеточного раствора по отношению к внутриклеточному, как правило, не равна нулю и может принимать как положительные, так и отрицательные значения. Это обстоятельство до настоящего времени не учитывалось при анализе процессов обезвоживания и эффективного переохлаждения клеток на этапе кристаллизации биологических суспензий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е. А., Коваленко И. Ф. Осмотическая реакция клеток на контакт с гипертоническими средами // Криобиология. — 1989. — № 2. — С. 3—9.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 04.05.88

E. A. GORDIYENKO, I. F. KOVALENKO

THE OSMOTIC RESPONSE OF CELLS TO HYPERTONIC MEDIA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

The kinetics of changes in relative cell volume and intracellular concentrations of penetrating and non-penetrating across plasma membrane substances was studied under conditions of hypertony and cooling at a constant rate by computer calculating of the system of equations which described the transfer of substances between a cell and its environment.

УДК 517.946.9

А. А. Березовский, Ю. В. Леонтьев

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ТКАНИ

Предложены одномерные математические модели криодеструкции при неидеальном тепловом контакте поверхности биоткани с охлаждающей поверхностью криозонда. Приведены простые функциональные зависимости основных параметров криодеструкции биоткани от входных данных, в частности динамики роста криопораженной и замороженной зон, максимальные размеры криопоражения, время, в течение которого биоткань в данной точке находится в заданном интервале температур.

Для локального необратимого разрушения биологической ткани в медицинской практике применяются криозонды с плоской, цилиндрической или полусферической формами охлаждающей поверхности. В общем случае тепловой контакт охлаждающей поверхности криоинструмента с биотканью не является идеальным и характеризуется некоторым коэффициентом теплообмена (термическим сопротивлением) α . Математические модели процессов криодеструкции в рассматриваемых случаях представляются одномерными «локальными» нестационарными задачами Стефана [1—9]:

$$\frac{1}{z^n} \frac{\partial}{\partial z} \left[z^n \lambda(u) \frac{\partial u}{\partial z} \right] + \omega(u) = c(u) \rho(u) \frac{\partial u}{\partial t} - P z^* z^{*n} \delta(z - z^*), \quad z_0 < z < \infty, \quad t > 0, \quad (1)$$

$$u(z, 0) = u_T, \quad z_0 < z < \infty, \quad (2)$$

$$\left. \frac{\partial u}{\partial z} \right|_{z=z_0} = h[u(z_0, t) - u_A], \quad u(z, t)|_{z \rightarrow \infty} = u_T, \quad (3)$$

$$u(z^*(t), t) = u^*. \quad (4)$$

Здесь λ , c , ρ — зависящие от температуры коэффициенты теплопроводности, теплоемкости, плотности биоткани; $\omega(u)$ — источники тепла, обусловленные кровотоком и метаболизмом; $P = \Lambda \rho^*$; Λ — скрытая теплота кристаллизации; ρ^* — масса внеклеточной воды в единице объема биоткани; $z = z^*(t)$ — подвижная координата фронта замораживания, соответствующая температуре кристаллизации внеклеточной воды $u = u^*$; u_T , u_A — глубинная температура ткани, температура охлаждающей поверхности криозонда; $h = \alpha/\lambda(u)$, α — коэффициент теплообмена между поверхностями ткани и криозонда; $\dot{z}^*(t)$ — производная от $z^*(t)$ по времени; $n = 0, 1, 2$ соответственно при плоской, цилиндрической и сферической симметрии; $z = r$, когда $n = 1, 2$; $z \geq z_0$, z_0 — координата поверхности биоткани.

Наиболее часто [2—8] используется кусочно-постоянная аппроксимация теплофизических характеристик и источников тепла:

$$\kappa(z) = \begin{cases} \kappa_3, & z_0 \leq z \leq z^*(t), \\ \kappa_T, & z^*(t) \leq z < \infty, \end{cases} \quad \omega(u) = \begin{cases} 0, & z_0 \leq z \leq z^*(t), \\ \omega_0(u_T - u), & z^*(t) \leq z < \infty, \end{cases} \quad (5)$$

где $\kappa(z) = \lambda(z) \vee c(z) \vee \rho(z)$; $(\kappa_3, \kappa_T) = (\lambda_3, \lambda_T) \vee (c_3, c_T) \vee (\rho_3, \rho_T)$; $\omega_0 = m_k c_k$, m_k , c_k — массовый расход потока и удельная теплоемкость крови; индексы «З» и «Т» относятся к замороженной и незамороженной ткани.

Полагая, что по истечении достаточного времени имеет место стабилизация криводействия, приходим к соответствующей стационарной задаче Стефана:

$$\begin{aligned} \frac{1}{z^n} \frac{\partial}{\partial z} \left[z^n \lambda(u) \frac{\partial u}{\partial z} \right] + \omega(u) &= 0, \quad z_0 \leq z < \infty, \\ \frac{\partial u}{\partial z} \Big|_{z=z_0} &= h[u(z_0) - u_A], \quad u(z) \Big|_{z \rightarrow \infty} = u_T, \\ u(z^*) &= u^*. \end{aligned} \quad (6)$$

Плоско-параллельная криодеструкция ($n = 0$, $z_0 = 0$). В этом случае задача (6) имеет точное решение, имеющее следующий вид:

$$u(z) = \begin{cases} u_A + (u^* - u_A) \frac{\left(z + \frac{1}{h}\right)}{\left(z^* + \frac{1}{h^*}\right)}, & 0 \leq z \leq z^*, \\ u_T + (u^* - u_T) \exp \left[\sqrt{\frac{\omega_0}{\lambda_T}} (z^* - z) \right], & z^* \leq z < \infty, \end{cases} \quad (7)$$

где z^* — максимальный размер замороженной области биоткани, вычисляемый по формуле

$$z^* = \sqrt{\frac{\lambda_T}{\omega_0}} \frac{\lambda_3(u^* - u_A)}{\lambda_T(u_T - u^*)} - \frac{1}{h}. \quad (8)$$

Приближенное решение нестационарной задачи Стефана (1) — (4) существенно использует конструкцию решения стационарной задачи (7) и записывается в виде

$$u(z, t) = \begin{cases} u_A + (u^* - u_A) \left[\frac{z + \frac{1}{h}}{z^*(t) + \frac{1}{h}} \right], & 0 \leq z \leq z^*(t), \\ u_T + (u^* - u_T) \exp \left[\sqrt{\frac{\omega_0}{\lambda_T}} (z^*(t) - z) \right], & z^*(t) \leq z < \infty, \end{cases} \quad (9)$$

где координата $z^*(t)$ фронта замораживания находится из обращенного уравнения

$$\tau = \frac{[2(P^* + k(1 + \theta^*)) + (1 + \theta^*)]}{2\theta^* \sqrt{\gamma\beta}} \left[x^* + \left(1 + \frac{1}{h^*}\right) \ln(1 - x^*) \right] + \frac{1}{2h^{*2}} \ln \left(\frac{1 - x^*}{1 + h^*x^*} \right). \quad (10)$$

В (10) использованы безразмерные величины:

$$\begin{aligned} x &= \frac{z}{z^*}, \quad t = \frac{c_3 \rho_3}{\lambda_3} z^{*2} \tau, \quad u = u_T + (u_T - u_A) \theta, \quad h^* = h z^*, \\ \beta &= \frac{\omega_0}{\lambda_3} z^{*2}, \quad P^* = \frac{P}{c_3 \rho_3 (u_T - u_A)}, \quad \theta^* = \frac{u^* - u_T}{u_T - u_A}, \\ k &= \frac{c_T \rho_T}{c_3 \rho_3}, \quad \gamma = \frac{\lambda_T}{\lambda_3}, \end{aligned} \quad (11)$$

к которым будем прибегать и в дальнейшем.

Одной из важных характеристик процесса криодеструкции является временной интервал $\Delta t = t(u_{\Pi}, z) - t(u^*, z)$, в течение которого биоткань в точке z находится в интервале эвтектической температуры $u_{\Pi} < u < u^*$. Если этот интервал мал, то клетки ткани в данной точке z не успевают подвергнуться губительному воздействию гипертонической внеклеточной жидкости. Согласно (9), (10) для $\Delta \tau$ получаем формулу

$$\begin{aligned} \Delta \tau &= \frac{2(P^* + k(1 + \theta^*)) + (1 + \theta^*)}{2\theta^* \sqrt{\gamma\beta}} \left\{ \left(\frac{\theta^* - \theta_{\Pi}}{1 + \theta_{\Pi}} \right) \left(x + \frac{1}{h^*} \right) + \right. \\ &\left. + \left(1 + \frac{1}{h^*} \right) \ln \left[\left(\frac{1 + \theta^*}{1 + \theta_{\Pi}} \right) \left(\frac{x_{\Pi} - x}{1 - x} \right) \right] \right\} + \frac{1}{2h^{*2}} \ln \left(\frac{x_{\Pi} - x}{1 - x} \right), \quad x_0 \leq x < x_{\Pi}, \quad (12) \end{aligned}$$

где

$$\theta_{\Pi} = \frac{u_{\Pi} - u_T}{u_T - u_A}, \quad x_{\Pi} = \frac{(\theta_{\Pi} - \theta^*) + h^*(1 + \theta_{\Pi})}{h^*(1 + \theta^*)}.$$

Осесимметричная криодеструкция ($n = 1$). Как и в случае плоско-параллельной криодеструкции, приведем лишь приближенные аналитические решения возникающей здесь задачи Стефана. Для динамики поля температуры вокруг бесконечного цилиндра радиуса r_0 имеет место выражение

$$\theta(x, \tau) = \begin{cases} -1 + (1 + \theta^*) \frac{\ln \frac{x}{x_0} + \frac{1}{x_0 h^*}}{\ln \frac{x^*(\tau)}{x_0} + \frac{1}{x_0 h^*}}, & x_0 \leq x \leq x^*(\tau), \\ \theta^* \frac{K_0 \left(\sqrt{\frac{\beta}{\gamma}} x \right)}{K_0 \left(\sqrt{\frac{\beta}{\gamma}} x^*(\tau) \right)}, & x^*(\tau) \leq x < \infty, \end{cases} \quad (13)$$

где $K_0(z)$ — модифицированная функция Бесселя второго рода нулевого порядка; $r = r^* x$ — текущая координата; $x_0 = r_0/r^*$; координата r^* — максимальный радиус замороженной биоткани, определяется как единственный положительный корень уравнения

$$f(y) = y \frac{K_1 \left(\sqrt{\frac{\omega_0}{\lambda_T}} y \right)}{K_0 \left(\sqrt{\frac{\omega_0}{\lambda_T}} y \right)} \left(\ln \frac{y}{r_0} + \frac{1}{r_0 h} \right) + \sqrt{\frac{\lambda_T}{\omega_0}} \frac{\lambda_3 (u^* - u_A)}{\lambda_T (u^* - u_T)} = 0, \quad (14)$$

$K_1(y)$ — функция Бесселя первого порядка.

Динамика координаты замораживания $x^*(\tau)$ описывается квадратурой

$$\tau = \frac{1}{\theta^* \sqrt{\beta \gamma}} \int_{x_0}^{x^*} \frac{F(z)}{f(z)} z dz, \quad (15)$$

где

$$F(z) = \left[P^* + k|\theta^*| \frac{K_1^2 \left(\sqrt{\frac{\beta}{\gamma}} z \right)}{K_0^2 \left(\sqrt{\frac{\beta}{\gamma}} z \right)} \right] \left(\ln \frac{z}{x_0} + \frac{1}{x_0 h^*} \right) + \frac{1 + \theta^*}{4 \left(\ln \frac{z}{x_0} + \frac{1}{x_0 h^*} \right)} \times \\ \times \left[2 \ln \frac{z}{x_0} + \left(\frac{x_0^2}{z^2} - 1 \right) \left(1 - \frac{1}{x_0 h^*} \right) \right].$$

Интервал времени $\Delta\tau$, в течение которого биоткань в точке x находится в температурном интервале $\theta_{\Pi} < \theta < \theta^*$, определяется по формуле

$$\Delta\tau = \frac{1}{\theta^* \sqrt{\gamma \beta}} \int_{g(x, \theta_{\Pi})}^{g(x, \theta^*)} \frac{F(z)}{f(z)} z dz, \quad x_0 \leq x \leq x_{\Pi}, \quad (16)$$

где

$$g(x, \theta) = x_0 \exp \left[\left(\frac{1 + \theta^*}{1 + \theta} \right) \left(\ln \frac{x}{x_0} + \frac{1}{h^* x_0} \right) - \frac{1}{h^* x_0} \right], \\ x_{\Pi} = x_0 \exp \left\{ -\frac{1}{(1 + \theta^*)} \left[(1 + \theta_{\Pi}) \ln x_0 + \frac{\theta^* - \theta_{\Pi}}{h^* x_0} \right] \right\}.$$

Сферически-симметричная криодеструкция ($n = 2$). В данном случае для расчета динамики замораживания биоткани сферическим криозондом получаем следующие формулы:

$$\theta(x, \tau) = \begin{cases} -1 + \frac{(1 + \theta^*) x^*(\tau)}{\left[x^*(\tau) - x_0 + \frac{x^*(\tau)}{h^* x_0} \right]} \left(1 - \frac{x_0}{x} + \frac{1}{h^* x_0} \right), & x_0 \leq x \leq x^*(\tau), \\ \frac{x^*(\tau)}{x} \theta^* \exp \left[\sqrt{\frac{\beta}{\gamma}} (x^*(\tau) - x) \right], & x^*(\tau) \leq x < \infty, \end{cases} \quad (17)$$

где $r = r^* x$ — текущая координата; r^* вычисляется по формуле

$$r^* = \frac{1}{2} \left[\frac{hr_0^2}{(1 + hr_0)} - \sqrt{\frac{\lambda_T}{w_0}} \right] + \\ + \sqrt{\frac{1}{4} \left[\frac{hr_0^2}{(1 + hr_0)} + \sqrt{\frac{\lambda_T}{w_0}} \right]^2 + \frac{hr_0^2}{(1 + hr_0)} \sqrt{\frac{\lambda_T}{w_0}} \frac{\lambda_3 (u^* - u_A)}{\lambda_T (u_T - u^*)}}. \quad (18)$$

Подобно осесимметричной криодеструкции, динамика координаты замораживания $x^*(\tau)$ задается квадратурой

$$\tau = \frac{1}{6\theta^* \sqrt{\gamma \beta} \left(1 + \frac{1}{h^* x_0} \right)} \int_{x_0}^{x^*} \frac{F(z)}{f(z)} dz, \quad (19)$$

где

$$F(z) = 6 \left[P^* z^2 + k|\theta^*| \left(\sqrt{\frac{\gamma}{\rho}} + z \right)^2 \right] \left[z \left(1 + \frac{1}{h^* x_0} \right) - x_0 \right]^2 + \\ + x_0 (1 + \theta^*) (z - x_0) \left[2(z - x_0)^2 \left(1 + \frac{1}{h^* x_0} \right) + x_0 (z + x_0) \right], \\ f(z) = z \left[z \left(1 + \frac{1}{h^* x_0} \right) - x_0 \right] (z - 1) (z - x_2^*), \\ x_2^* = -x_0 \sqrt{\frac{\gamma}{\beta}} \frac{1}{\left(1 + \frac{1}{h^* x_0} \right)} \left(1 - \frac{1 + \theta^*}{\gamma \theta^*} \right).$$

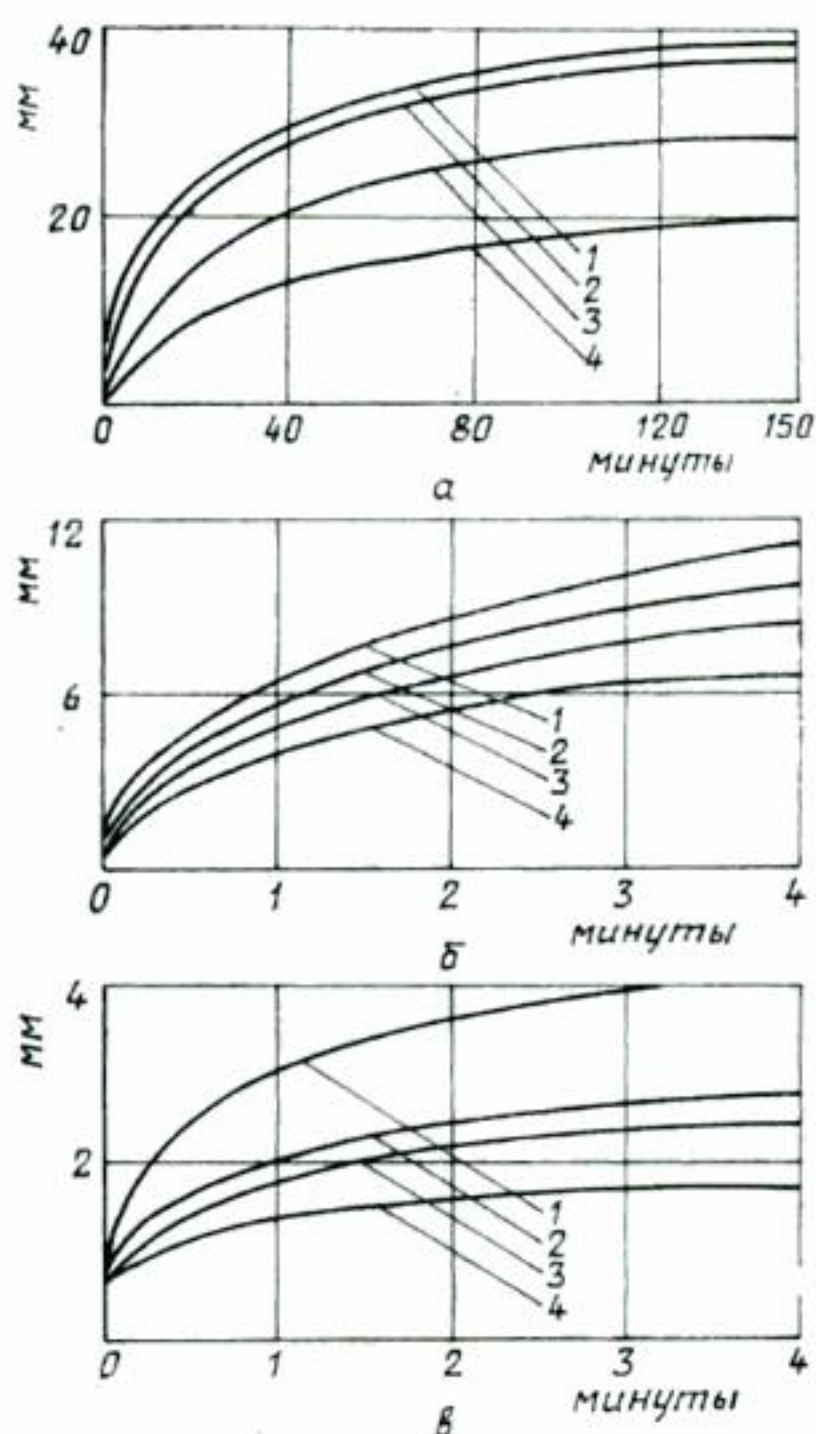


Рис. 1

Рис. 1. Динамика изотермы замораживания: а — плоско-параллельная криодеструкция: 1 — $h = 10^5$, 2 — $h = 500$, 3 — $h = 100$, 4 — $h = 50$; б — осесимметричная криодеструкция: 1 — $h = 10^5$, 2 — $h = 2500$, 3 — $h = 1000$, 4 — $h = 500$; в — сферически-симметричная криодеструкция: 1 — $h = 10^5$, 2 — $h = 1500$, 3 — $h = 1000$, 4 — $h = 500$

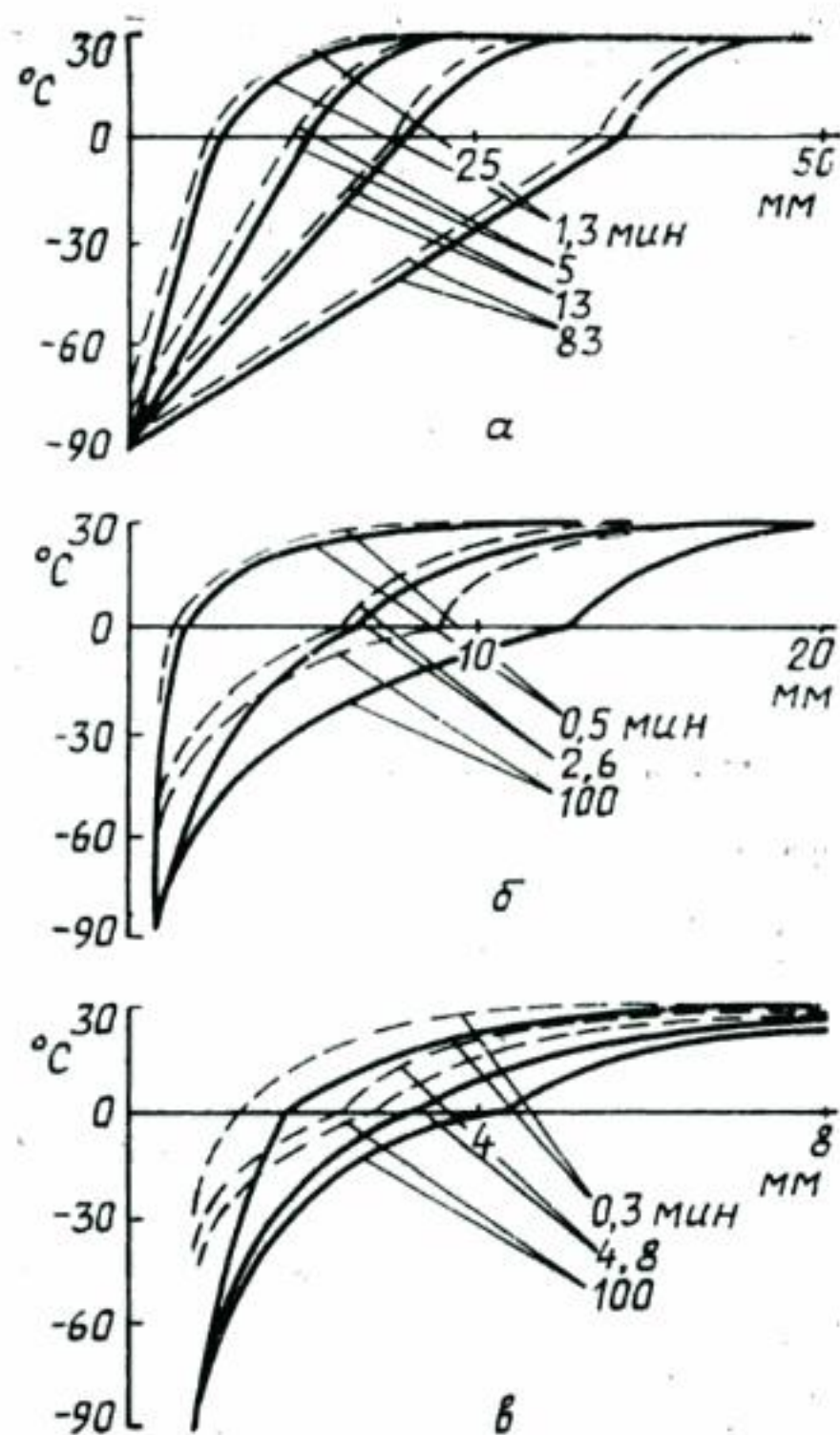


Рис. 2

Рис. 2. Динамика температурного поля (пунктиром — $h = 10^3$, сплошной — $h = 10^5$): а — плоско-параллельная криодеструкция; б) осесимметричная криодеструкция; в) сферически-симметричная криодеструкция

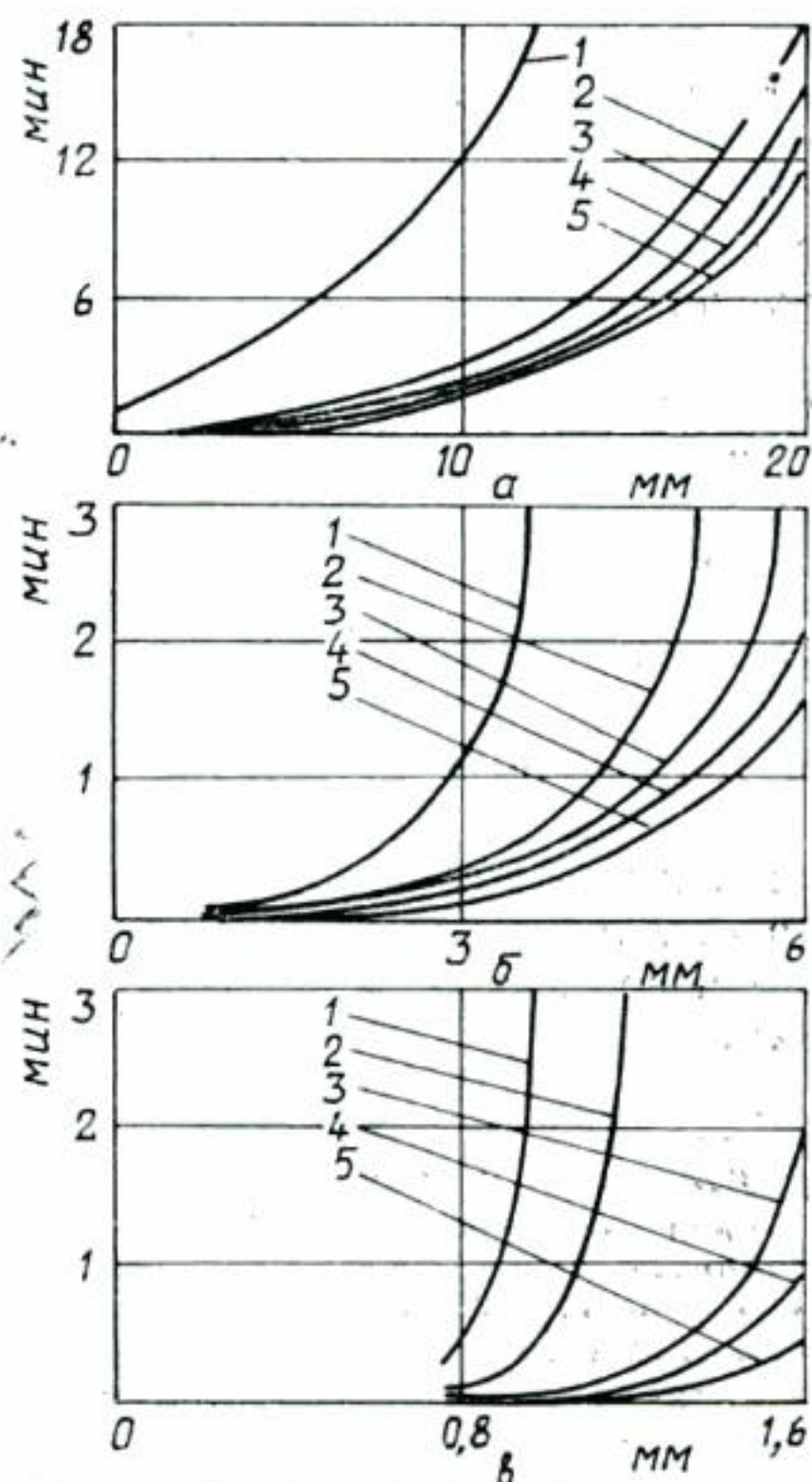


Рис. 3

Интервал времени $\Delta\tau$ вычисляется по формуле

$$\Delta\tau = \frac{1}{60 \cdot \sqrt{\gamma\beta} \left(1 + \frac{1}{h^* x_0}\right)} \int_{g(x, \theta^*)}^{g(x, \theta)} \frac{F(z)}{f(z)} dz, \quad (20)$$

где

$$g(x, \theta) = \frac{(1 + \theta) x_0}{(1 + \theta^*) \frac{x_0}{x} + (\theta - \theta^*) \left(1 + \frac{1}{h^* x_0}\right)},$$

$$x_{\Pi} = \frac{(1 + \theta^*) x_0}{(1 + \theta_{\Pi}) x_0 + (\theta^* - \theta_{\Pi}) \left(1 + \frac{1}{h^* x_0}\right)}.$$

Численные расчеты. Входные данные для численных расчетов выбирались следующими [3]: $\lambda_3 = 2,22 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot ^\circ\text{C}}$, $\lambda_T = 0,56 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot ^\circ\text{C}}$, $c_3 \rho_3 = 2,01 \times 10^6 \frac{\text{Вт} \cdot \text{с}}{\text{м}^3 \cdot ^\circ\text{C}}$, $c_T \rho_T = 3,6 \cdot 10^6 \frac{\text{Вт} \cdot \text{с}}{\text{м}^3 \cdot ^\circ\text{C}}$, $P = 300 \cdot 10^6 \frac{\text{Вт} \cdot \text{с}}{\text{м}^3}$, $\omega_0 = 48,5 \times 10^3 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^3 \cdot ^\circ\text{C}}$, $u_A = -90^\circ\text{C}$, $u_{\Pi} = -20^\circ\text{C}$, $u^* = 0^\circ\text{C}$, $u_T = 30^\circ\text{C}$, $r_0 = 0,75 \cdot 10^{-3} \text{ м}$, $\alpha = 100 \div 2 \cdot 10^5 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot ^\circ\text{C}}$.

Параметр h варьировался в довольно широком диапазоне. Результаты проведенных численных расчетов представлены в виде графиков на рисунках 1—3. На рис. 1 представлена рассчитанная по формулам (10), (15), (19) динамика изотерм замораживания $z^*(t)$ в случаях: *а* — плоско-параллельной криодеструкции; *б* — осесимметричной криодеструкции; *в* — сферически-симметричной криодеструкции при различных значениях h . Из приведенных кривых следует, что время практического достижения стационарного состояния, когда $x^*(\tau) = 0,95$, существенно зависит от степени неидеальности теплового контакта поверхности биоткани с охлаждающей поверхностью криозонда: при малых α оно на порядок выше, чем при идеальном контакте $\alpha \rightarrow \infty$. Динамика температурного поля $u = u(z, t)$, рассчитанная по формулам (9), (13), (17), для каждого из трех рассмотренных случаев представлена на рис. 2 при $h = 10^3$ и $h = 10^5$. Из приведенных графиков видно, что чем лучше тепловой контакт поверхности биоткани с охлаждающей поверхностью криоинструмента, тем быстрее протекает процесс замораживания биоткани. На рис. 3 представлены графики функций $\Delta\tau = \Delta\tau(x, h)$, рассчитанные по формулам (12), (16), (20). Как видно, увеличение h (α) приводит к увеличению области криопоражения, причем при малых h размеры области растут быстрее, чем при больших значениях h .

В заключение отметим, что рассмотренные одномерные задачи криодеструкции при условии неидеального контакта поверхности биоткани с охлаждающей поверхностью криоинструмента позволяют просчитать ряд типичных случаев замораживания биотканей, с достаточной точностью определить частные и общие закономерности процесса, составить серии номограмм, необходимых для использования в практической медицине, наметить дальнейшее направление исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Березовский А. А.** Математическая модель динамики локального криовоздействия на биологическую ткань // Нелинейные дифференциальные уравнения в прикладных задачах. — Киев: Ин-т математики АН УССР, 1984. — С. 9—17.
2. **Березовский А. А.** Одномерные математические модели криодеструкции биологической ткани // Дифференциальные уравнения с частными производными в прикладных задачах. — Киев: Ин-т математики АН УССР, 1986. — С. 3—18.
3. **Березовский А. А.** Одномерные модели локального замораживания биоткани // Нелинейные задачи теплопроводности. — Киев: Ин-т математики АН УССР, 1984. — С. 3—8.

4. Березовский А. А. Проекционно-сеточный метод решения одномерных задач Стефана // Мат. физика.— 1985.— Вып. 4 38.— С. 71—76.
5. Березовский А. А., Рейдер Э. Е. Управляемая плоско-параллельная криодеструкция // Задачи Стефана с предельным стационарным состоянием в криохирургии.— Киев, 1986.— С. 3—16. Препринт / АН УССР, Ин-т математики; 86.68.
6. Комини Г., Дель-Джудиче С. Тепловые аспекты криохирургии // Тр. Амер. о-ва инж.-мех.: Теплопередача.— 1976, № 4.— С. 8—16.
7. Микулин Е. И., Резницкий В. Г., Шафранов В. В. Теоретические исследования тепловой задачи локального замораживания биотканей // Электронная промыш. ленность.— 1982.— Вып. 8.— С. 76—79.
8. Cooper T., Trezek G. Analytical prediction of the temperature fluid emanating from a cryogenic surgical cannula // Cryobiology.— 1970.— 7, N 2—3.— P. 79—83.
9. Orpwood R. D. Biophysical and engineering aspects of cryosurgery // Phys. Med. Biol.— 1982.— 26, N 4.— P. 555—575.

Ин-т математики АН УССР,
г. Киев

Поступила 04.07.88

A. A. BEREZOVSKY, Yu. V. LEONTYEV

MATHEMATICAL PREDICTION OF LOW TEMPERATURE EFFECTS ON BIOLOGICAL TISSUES

Institute of Mathematics of the UkrSSR Academy of Sciences, Kiev

One-dimensional mathematical models of cryodestruction under non-ideal heat contact of biological tissue with a cryoprobe cooling surface are proposed. Simple functional dependences of main cryodestruction parameters on such values as the growth dynamics of cryoinjured and frozen zones, maximum size of cryolesion, time of exposition of biological tissue in a given temperature range are presented.

УДК 539.143.43:577.352.3

Б. В. Сахаров, В. Я. Волков

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПРИ МЕДЛЕННОМ ЗАМОРАЖИВАНИИ. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ЯМР-РЕЛАКСАЦИИ

Методом ЯМР-релаксации изучено влияние незамерзающей воды и растворенных ионов на стабильность мембран при замораживании теней эритроцитов, реконструированных на основе растворов холинхлорида и KCl различной осмолярности. Полученные данные свидетельствуют о том, что основным фактором, вызывающим специфическое нарушение барьерной функции эритроцитарных мембран при медленном замораживании, является снижение уровня незамерзающей воды в системе ниже критической величины $5-4 \cdot 1$. Другой причиной повреждения мембран может быть преципитация соли из незамерзающей фазы.

Клеточная мембрана рассматривается как первичный участок повреждения биологических систем при замораживании [1]. Повреждение самой мембраны при замораживании связано, согласно наиболее распространенным представлениям, с такими следствиями образования льда, как длительное пребывание в растворах с высокой концентрацией солей и дегидратация (осмотическое сжатие) клеток [5, 7]. Однако окончательный ответ на этот вопрос еще не получен. В последнее время, например, появились сообщения о том, что основным повреждающим мембрану фактором может быть уменьшение объема жидкой фазы при замораживании [6].

Удобным объектом для исследования причин повреждений биомембран в ходе цикла замораживания—оттаивания, что и составило цель данной работы, являются тени эритроцитов. С одной стороны, тени сохраняют свойства нативной плазматической мембраны, а с другой—при их получении имеется возможность широкого варьирования внутриклеточного содержимого [3]. В настоящей работе для одновременного контроля как количества подвижной (незамерзающей) воды в системе, так и целостности

барьера проницаемости мембран теней эритроцитов в ходе замораживания—оттаивания использовали метод ЯМР-релаксации.

K⁺-реконструированные «изотонические» (120 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM трис-HCl, pH 7,4) тени эритроцитов готовили из свежей донорской крови на основе метода гипотонического лизиса [3]. Реконструированные тени с содержанием хлорида калия выше ($\times 2,5$) и ниже ($\times 0,25$, $\times 0,5$) изотонического получали, изменяя его концентрацию в реконструирующем

растворе и соответственно в растворе отмывки. Замкнутые «холиновые» тени получали с помощью этой же методики, заменив KCl на холинхлорид. Для приготовления экспериментальных образцов тени отмывали до исчезновения в супернатанте гемоглобина, ресуспендировали до гематокрита 30—50 % и вносили в суспензию 5 mM MnCl₂.

Замораживание образцов объемом 1 мл осуществляли непосредственно в датчике ЯМР-спектрометра путем обдува ампул испаряющимся азотом. Замораживание инициировали внесением в суспензию микрокристаллов льда. Оттаивание проводили перенесением образцов в водяную баню с температурой 37 °C.

Все ЯМР-измерения были выполнены на ЯМР-спектрометре «SXP-100» фирмы «Брукер» с рабочей частотой 90 МГц. Процент незамерзающей воды определяли по отношению амплитуды сигнала спада свободной индукции (или поперечной намагниченности) после замораживания (A) и до него (A_0).

Оценку повреждений мембран теней в результате замораживания—оттаивания также проводили методом ЯМР-релаксации. Добавление парамагнитных ионов Mn²⁺

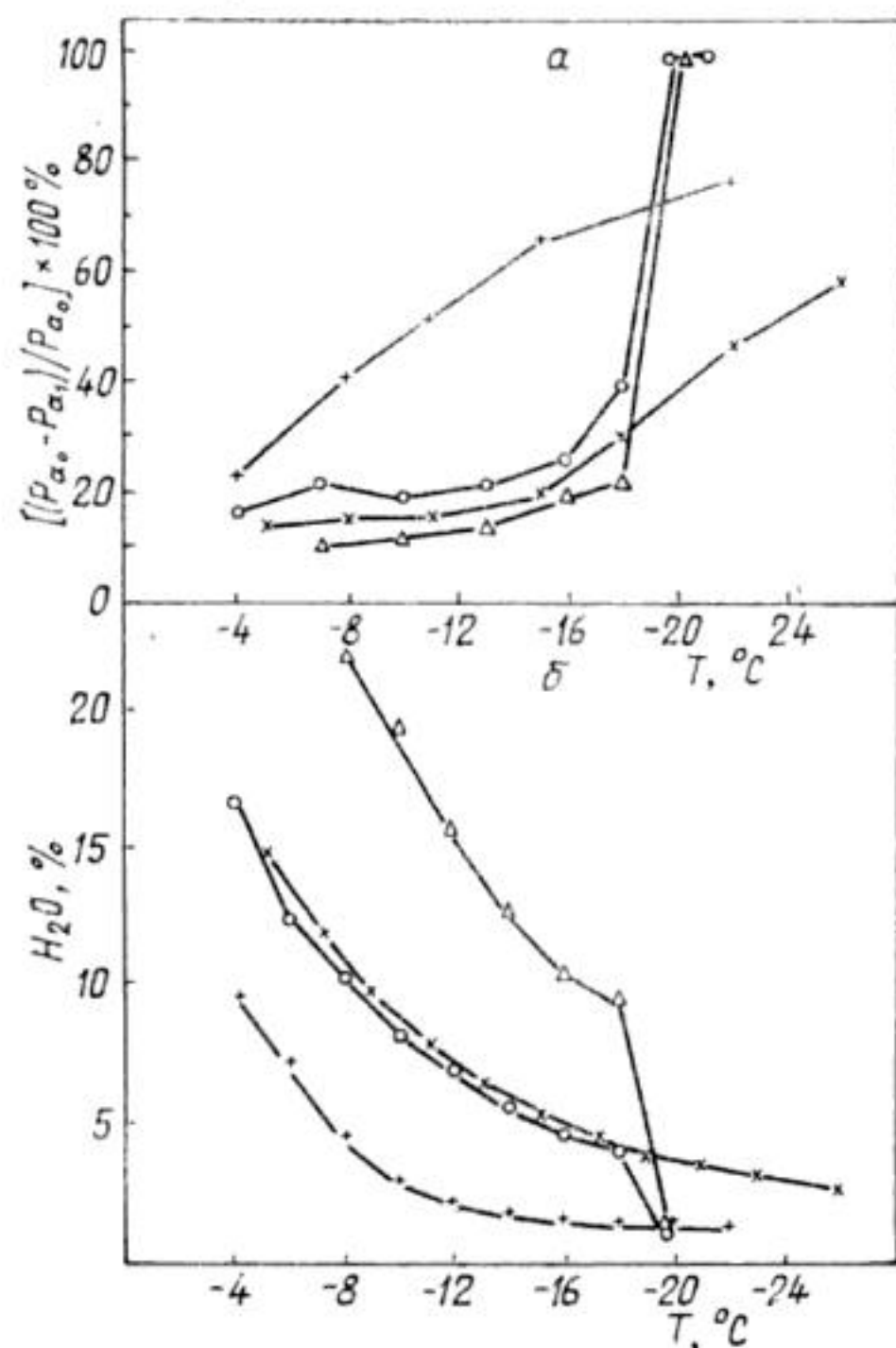


Рис. 1 Изменение процента поврежденных мембран (а) и количества незамерзающей воды (б) при медленном замораживании суспензий теней эритроцитов: $\times$ — холиновые тени; $+$, $\circ$, Δ — калиевые тени с содержанием KCl соответственно 0,25 $\times$, 1,0 $\times$, 2,5 $\times$ 120 mM

в суспензию позволяет выделить в ЯМР-сигнале поперечной намагниченности составляющие от протонов внутри- и внеклеточной воды [4]. Для получения кривой спада поперечной намагниченности использовали импульсную последовательность Карра-Парселла с расстоянием 200 мкс между 180° зондирующими импульсами. Разложение кривой спада на две экспоненциальные компоненты, расчет времени обмена молекул воды через мембрану (τ_a) и населенности внутриклеточной компоненты (P_a) выполняли на миниЭВМ BNC-12 с помощью специальной программы. Поскольку P_a определяется числом клеток в суспензии, мембраны которых непроницаемы для ионов Mn²⁺, уровень повреждений клеточной популяции или процент клеток с нарушенным барьером проницаемости для этого парамагнитного иона будет характеризоваться отношением

$$\frac{P_{a0} - P_{a1}}{P_{a0}} \times 100 \%,$$

где P_{a0} — населенность внутриклеточной компоненты до, а P_{a1} — после замораживания—оттаивания [4].

На рис. 1, а представлена зависимость степени повреждения мембран замкнутых калиевых и холиновых теней от конечной температуры замораживания, при которой они выдерживались не менее 30 мин. Как видно из рисунка, с понижением температуры процент поврежденных клеток возрастает во всех образцах, но если для теней с изотонической концентрацией KCl и выше резкое изменение барьерных свойств мембран происходит в узком температурном диапазоне — $17 \div -20^\circ\text{C}$, то для холиновых теней и теней с низкой концентрацией калия процент повреждений растет постепенно, причем для холиновых теней заметный рост уровня повреждений начинается при более низких температурах. Из рис. 1, б видно, что скачкообразному нарушению целостности барьера проницаемости мембран для ионов Mn^{2+} соответствует скачкообразное уменьшение (вследствие кристаллизации KCl) количества незамерзающей воды в системе до уровня 2—1 % от исходного. Аналогичное соответствие между температурой, где регистрировался полный выход гемоглобина и ^{14}C -сахарозы из калиевых теней, и температурой, при которой происходило резкое снижение количества незамерзающей воды, было установлено ранее [3]. Поскольку для теней, суспендированных в растворе холинхлорида, резких температурозависимых изменений в уровне незамерзающей воды не наблюдалось, но выход внутриклеточных маркеров увеличивался при понижении температуры (примерно так же, как на рис. 1, а для холиновых теней), было высказано предположение, что в механизме криповреждений эритроцитарных мембран существенное значение имеют термотропные перестройки липид-липидных и липид-белковых комплексов [2]. Однако это предположение находится в противоречии с представленными на рис. 1, а данными, где, как мы видим, один и тот же постепенно нарастающий уровень повреждений холиновых теней и теней, приготовленных на основе растворов KCl низкой концентрации, достигается при различных температурах. С другой стороны, если представить «выживаемость» теней (величина, обратная проценту повреждений) как функцию количества оставшейся незамерзающей воды (рис. 2), то обнаруживается, что равной «выживаемости» холиновых и калиевых теней соответствует один и тот же уровень незамерзающей воды, а существенное падение выживаемости происходит при уменьшении параметра A_1/A_0 от 0,05 до 0,015 как для холиновых, так и для калиевых теней, независимо от температуры, при которой данный уровень незамерзающей воды достигается. С этим результатом качественно согласуются данные, представленные ранее [6]: процент гемолиза нативных эритроцитов, замороженных в растворах с различным содержанием NaCl и глицерина, резко возрастал при изменении доли незамерзающей воды от 0,15 до 0,04 независимо от конечной температуры замораживания и концентрации соли в оставшемся незамерзшем растворе. Таким образом, фактором, вызывающим неспецифическое нарушение барьерной функции эритроцитных мембран при медленном замораживании, является, скорее всего, достижение некоторого критического уровня вымерзания растворителя.

Вместе с тем из рис. 2 видно, что «выживаемость» теней зависит и от того, каким образом был достигнут этот критический уровень. Так, в образцах

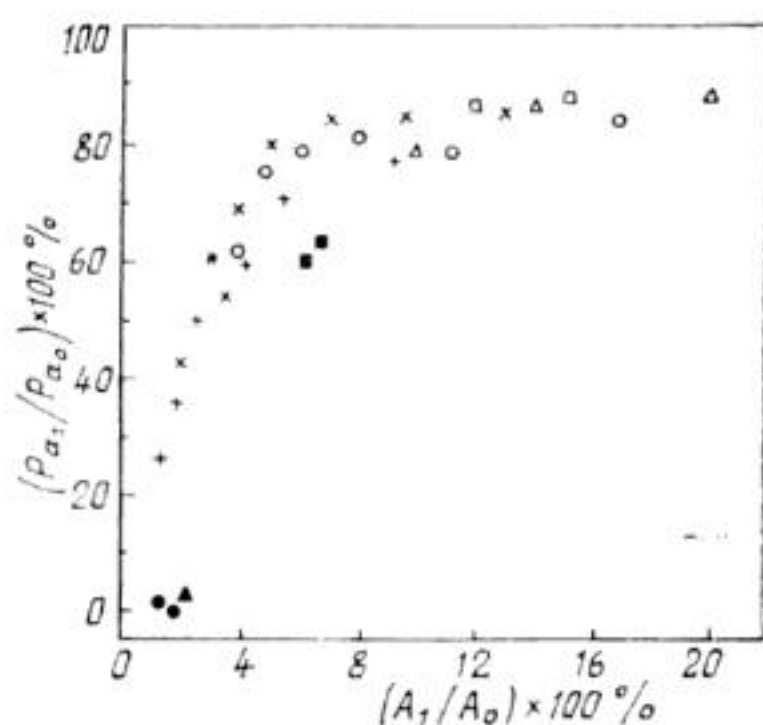


Рис. 2. Относительное количество мембран, сохранивших барьерные свойства по отношению к ионам Mn^{2+} , как функция количества оставшейся незамерзшей воды: $\times$ — холиновые тени; $+$, $\times$, $\circ$, Δ — калиевые тени с содержанием KCl 0,25 $\times$, 0,5 $\times$, 1,0 $\times$, 2,5 $\times$ 120 мМ; $\square$ — образец (2,5 $\times$ 120 мМ) с добавкой ДМСО. Темным цветом ($\bullet$, $\blacktriangle$, $\blacksquare$) обозначены суспензии, в которых происходила кристаллизация соли

(1×120 ; $2,5 \times 120$ мМ KCl), в которых он достигался в результате эвтектической кристаллизации KCl, повреждались все клетки, а в образцах ($0,25 \times 120$ мМ KCl), где этот феномен отсутствовал, повреждалось не более 70 % клеточной популяции. Следовательно, можно предположить, что в случае эвтектической кристаллизации мы сталкиваемся с действием дополнительного повреждающего фактора, связанного с появлением в системе новой твердой фазы.

Была предпринята попытка разделить два взаимосвязанных феномена (снижение доли незамерзающей воды и переход ионов калия и хлора из

раствора в кристаллическую фазу) с помощью добавки ДМСО в такой концентрации, которая не ингибировала бы преципитацию соли, но предотвращала бы вымерзание воды ниже критического уровня.

В экспериментах с замораживанием растворов было установлено, что такие условия достигаются при мольном отношении KCl к ДМСО 2 : 1.

На рис. 3 в сравнительном плане последовательно прослеживается, как изменяются ЯМР-релаксационные параметры суспензии калиевых теней с добавкой ДМСО и без него при образовании льда, дальнейшем понижении температуры и в процессе кристаллизации соли. Наиболее удобным объектом для исследования этих явлений являются образцы с концентрацией KCl $2,5 \times 120$ мМ, так как содержат наибольшее количество незамерзающей воды (имеют наибольшую амплитуду ЯМР-сигнала) перед кристаллизацией соли и вымерзают достаточно долго, что позволяет выполнить до десяти и более ЯМР-измерений.

Прежде чем перейти к анализу результатов, представленных на рис. 3, отметим, что величина τ_a

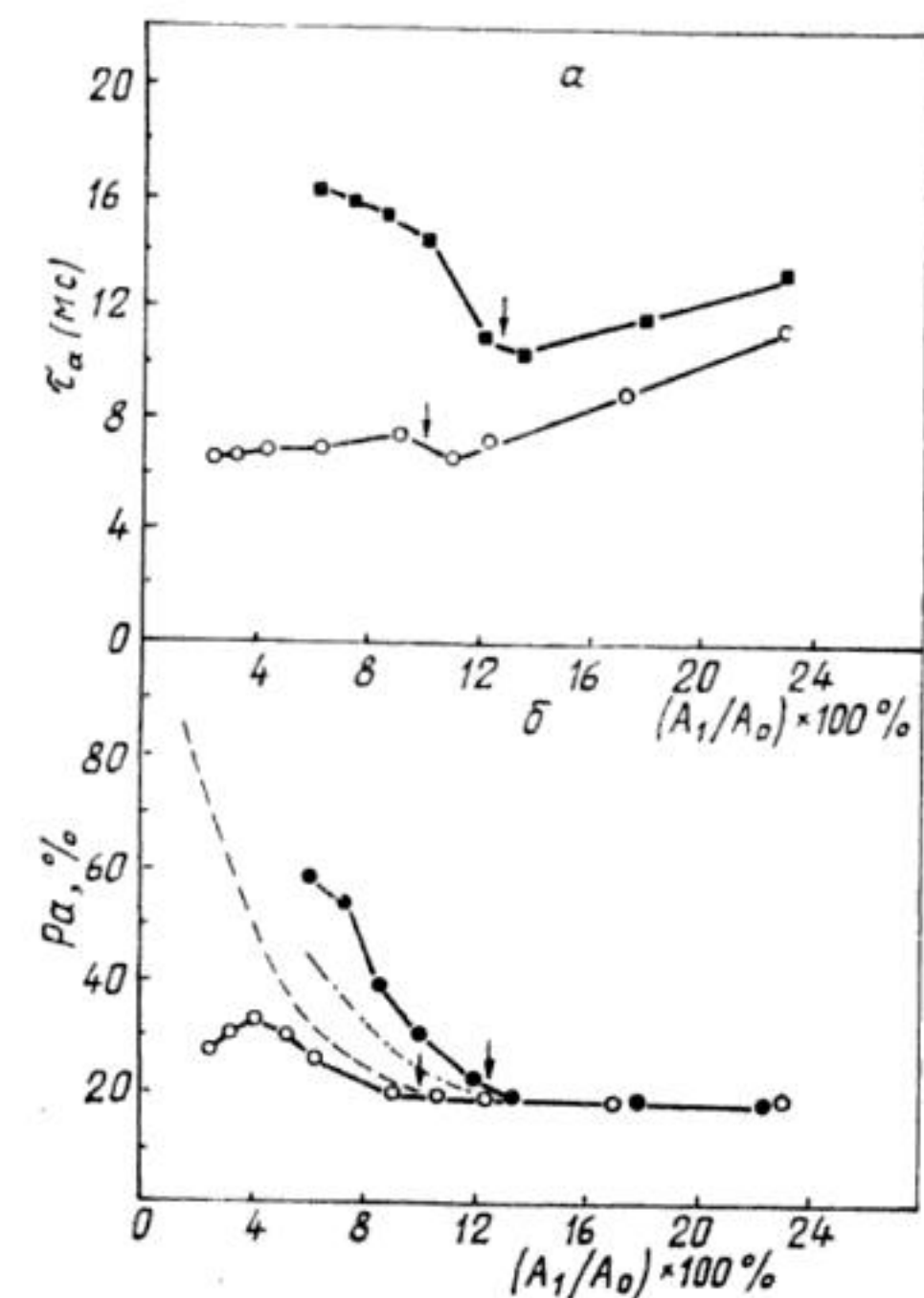


Рис. 3. Изменение τ_a (а) и P_a (б) в процессе вымерзания воды при замораживании и кристаллизации хлорида калия (начало процесса обозначено стрелкой) в суспензии теней эритроцитов ($2,5 \times 120$ мМ KCl) с добавкой (■, ●) и без добавки ДМСО (□, ○)

связана с водной проницаемостью и геометрическими параметрами клетки следующим соотношением: $P_w = V/5\tau_a$ (где V — водный объем клетки, S — площадь ее поверхности, а P_w — диффузионная водная проницаемость). Поскольку, как нами было установлено ранее, водная проницаемость эритроцитных мембран при замораживании в области субнулевых температур не изменяется [4], при неизменной площади поверхности клетки величина τ_a должна в основном отражать изменения водного объема клетки в ответ на образование льда в системе. Вымерзание воды в суспензии приводит к значительному сжатию теней. Так, после завершения образования льда при температуре -4°C τ_a сокращается приблизительно в 4 раза (с 40 до 10 мс). При этом выход воды из клеток происходит в соответствии с законом идеального осмометра, о чем свидетельствует постоянство P_a при замерзании. Это возможно только при пропорциональном уменьшении количества внеклеточной жидкости (приводящей к росту осмолярности среды) и внутриклеточного водного объема. Добавка ДМСО принципиально не меняет реакцию теней на льдооб-

разование, P_a при первичной кристаллизации и дальнейшем понижении температуры не изменяется, τ_a сокращается, хотя и в несколько меньшей степени.

Характер изменения τ_a и P_a в процессе вторичной кристаллизации (начало этого процесса обозначено на рис. 3 стрелкой) резко изменяется. Клетка уже не отвечает сжатием на вымерзание воды, τ_a , по крайней мере, не убывает. Очевидно, это должно приводить и, как видно из рис. 3, приводит к увеличению доли внутриклеточной воды (P_a) по отношению к общему количеству воды в системе. Однако скорость возрастания P_a отстает от расчетной (обозначенной на рис. 3 пунктиром). Причина несоответствия, скорее всего, заключается в повреждении части клеток, что приводит к проникновению ионов Mn^{2+} в них и изменению P_a . Данное предположение подтверждает корреляция величины изменения параметра P_a с процентом поврежденных мембран после отогрева, так мембраны оказываются полностью поврежденными при отогреве от точки, соответствующей максимальному отклонению ($A_1/A_0 = 2\%$), а при отогреве от точки $A_1/A_0 = 4\%$ процент повреждений не превышал 60.

Для образца, содержащего добавку ДМСО, картина противоположная: наблюдаемый рост P_a в момент кристаллизации соли несколько превышает предполагаемый рост при постоянном клеточном объеме. Вероятно, в процессе вторичной кристаллизации в этом случае происходит снижение концентрации внеклеточного раствора и, как следствие, вода поступает в клетку, что в итоге приводит к набуханию. Дополнительно это подтверждается ростом τ_a , показателя, характеризующего объем отдельной клетки. Обратим внимание на то, что преципитация соли в присутствии ДМСО сопровождается увеличением доли поврежденных клеток, но не более чем на 30%. В образцах с той же исходной концентрацией соли, но без ДМСО, это приводило к 100%-ному повреждению теней (рис. 2).

Как известно [6], при замораживании клеточных суспензий незамерзшая фаза образует каналы, размер которых тем меньше, чем ниже исходная концентрация растворенных веществ в суспензии. Предполагается, что повреждение клеток связано с сужением размера этих каналов. Полученные в настоящей работе результаты позволяют постулировать следующий механизм повреждения в таких условиях. Кристаллизация соли из пересыщенного раствора приводит к снижению внеклеточного осмотического давления и вызывает набухание клеток, если позволяет размер каналов (в образцах с ДМСО). В узких каналах (в образцах без ДМСО) набухание невозможно из-за геометрических ограничений, вследствие этого на мембране возникает механическое напряжение, вызванное градиентом осмотического давления, что и приводит к повреждению мембран. Повреждение части клеток в образцах с протектором объясняется гетерогенностью образцов (существованием распределения каналов по размерам).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криповреждений биомембран // Итоги науки и техники. — М.: ВИНТИ, 1978. — Вып. 9. — С. 80—113.
2. Гулевский А. К., Михалев О. И., Рязанцев В. В. и др. О физических состояниях и криозащитных свойствах растворов холинхлорида // Криобиология. — 1987. — № 1. С. 17—21.
3. Гулевский А. К., Сахаров Б. В., Волков В. Я. Роль дегидратации в нарушении проницаемости плазматических мембран эритроцитов при замораживании—оттаивании // Докл. АН СССР. Сер. биол. — 1982. — 263, № 5. — С. 1250—1254.
4. Сахаров Б. В., Волков В. Я. Проницаемость и повреждение мембран эритроцитов при температурах от -1°C до -9°C по данным метода ЯМР-релаксации // Биофизика. — 1984. — 29, вып. 2. — С. 264—267.

5. Lovelock J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // *Biochim. et biophys. acta.*— 1953.— 10, N 4.— P. 414—426.
6. Mazur P. Freezing of living cells: mechanism of implications in injury // *Cell Physiol.*— 1984.— 16, N 1.— P. 125—142.
7. Meryman H. T. Freezing injury and its prevention in living cells // *Annu. Rev. Biophys.*— 1974.— 3, N 3.— P. 341—363.

ВНИИ прикладной микробиологии,
гос. Оболенск, Московская обл.

Поступила 22.02.88

B. V. SAKHAROV, V. Ya. VOLKOV

FACTORS OF CRYOINJURY IN BIOLOGICAL MEMBRANES ON SLOW FREEZING. INVESTIGATION OF ERYTHROCYTE GHOSTS BY THE METHOD OF NMR RELAXATION

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Obolensk, Moscow Region

The influence of unfrozen water and dissolved ions on the stability of membranes was studied by the method of NMR relaxation upon freezing of erythrocyte ghosts reconstituted using choline chloride and KCl solutions of different osmolality. The obtained results indicated decreasing the level of unfrozen water in the system below the critical value of $5-4 \cdot 1$ to be the main factor which induces a non-specific impairment of the erythrocyte membrane permeability upon slow freezing. Salt precipitation from the unfrozen phase may be an alternative cause of the membrane damage.

УДК 57.043

Р. Де Лекер, Ф. Пеннинкс

ОСМОТИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ БЫСТРОГО УДАЛЕНИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ ОБЪЕМА И ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Набухание клеток и гемолиз эритроцитов, обусловленные удалением проникающего криопротектора диметилсульфоксида, можно уменьшить путем добавления непроникающего сорбитола в период инкубации. Одновременное добавление сорбитола при инкубации с криопротектором способствует уменьшению исходного объема клетки, оцениваемого по величине среднего корпускулярного объема, представляющей собой среднее значение объемов нормальных клеток и везикул эритроцитов, сформированных при разведении, и предотвращает таким образом гемолиз при удалении криопротекторов. Фосфатно-буферные растворы с внутриклеточным электролитным составом обеспечивают оптимальную защиту клеток от избыточного набухания.

В процессе инкубации органов, тканей или отдельных клеток в буфере, содержащем проникающий криопротектор диметилсульфоксид (Me_2SO) или глицерин, происходит отек или цитоллиз при разведении криопротектора изотоническим раствором [9]. С целью уменьшения или предотвращения осмотического повреждения криопротектор обычно отмывают постепенно, добавляя или не добавляя при этом непроникающие защитные вещества [8, 10]. В настоящей работе исследовали условия, при которых можно уменьшить набухание и гемолиз эритроцитов человека.

Кровь здоровых доноров собирали в специальные пакеты объемом 500 мл, содержащие 2250 ед. гепарина («Травенол лаб», Бельгия), хранили при 4 °С и использовали не позднее 7 дней после забора. В каждом эксперименте кровь разводили в десять раз: а) раствором евро-Коллинза («Фресениус», ФРГ) с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ , б) перфудексом (приготовленным на месте) с высоким содержанием Na^+ и низким K^+ либо в) буфером К (135)-TES с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ (таблица).

Проникающий криопротектор Me_2SO («Мерк», ФРГ) добавляли в среду инкубации (рН 7,4) в конечной концентрации 0, 0,6, 0,9, 1,2 1,8 и 2,4 М. Одновременно в буферы с разной концентрацией Me_2SO вводили в качестве непроникающего вещества сорбитол («Мерк») в конечной концентрации 0, 0,25, 0,50, 0,80 и 1,00 М. После эквilibрации в течение 30 мин суспензии эритроцитов, помещенные в счетчик Коултера (модель S, «Коултер электроникс лтд», Великобритания), быстро разводили в 6250 раз чистым изотонном II («Коултер электроникс лтд»), фосфат-буферным стабилизированным раствором с высоким содержанием Na^+ и низким K^+ , и регистрировали на ЭВМ средний корпускулярный объем (СКО) клеток.

Для определения гемолиза в процессе разведения эритроциты разводили вручную в 500 раз чистым изотонном II. После установления гематокрита (на микрогематокритной центрифуге, модель MB, «Интернэшнл эквипмент ко», США) гемолиз при разведении оценивали путем измерения цианометгемоглобина в супернатанте, добавив реактив Драбкина [5].

Эксперименты проводили на шести образцах крови. Статистическую значимость результатов определяли с помощью *t*-теста Стьюдента.

Добавление Me_2SO в буфер не оказывало влияния на значения гематокрита, однако при повышении концентрации сорбитола его величина снижалась почти на 50 %.

Измеренные значения СКО эритроцитов, суспендированных в разных растворах электролитов, содержащих сорбитол в качестве непроникающего криопротектора в концентрациях от 0,25 до 1,00 М, оставались постоянными при быстром разведении. Однако, если в среде присутствовал только Me_2SO в концентрациях от 0,6 до 2,4 М, при быстром разведении изотонном II происходило набухание клеток и наступал гемолиз. При быстром разведении среды, содержащей Me_2SO в концентрации выше 0,9М, СКО увеличивался почти на 50 % (рис. 1, а). Если в буфере с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ (раствор евро-Коллинза), содержащем разные концентрации Me_2SO , находился сорбитол в достаточно высокой концентрации, при разведении клетки набухали в меньшей степени и гемолиз уменьшался. Осмотические эффекты Me_2SO в концентрации 0,9, 1,2, 1,8, 2,4 М, которые приводили к набуханию клеток при разведении, адекватно компенсировались соответственно 0,25, 0,50, 0,80 и 1,00 М сорбитолом, если он находился в среде в период инкубации с криопротектором

Состав растворов

Состав, мэкв/л	Среда инкубации			Буфер разведения
	Раствор евро-Коллинза	Перфудекс	К (135)-TES	Изотон II
Na^+	10	137,8	8,4	161,36
K^+	115	5,85	134,9	5,36
Mg^{2+}	—	1,6	—	—
Cl^-	15	142,4	48,9	141
F^-	—	—	—	11,90
HCO_3^-	10	—	15,5	—
SO_4^{2-}	—	1,6	—	—
HPO_4^{2-}	85	0,8	—	10,70
H_2PO_4^-	15	0,45	1,2	1,37
OH^-	—	—	77,7	—
ЭДТА ²⁻	—	—	—	1,75
Глюконат	—	23	—	—
TES, mM	—	—	100	—
Глюкоза, mM	194	5,5	11,5	—
Декстран40, mM	—	1,25	—	—
2-феноксэтанол, mM	—	—	—	23,80

(рис. 1, а). В таких условиях гемолиз значительно уменьшался и не превышал 20 % (рис. 1, б).

Среда инкубации с высоким содержанием электролитов Na^+ и низким K^+ (перфудекс), в состав которой входили Me_2SO и сорбитол, оказалась

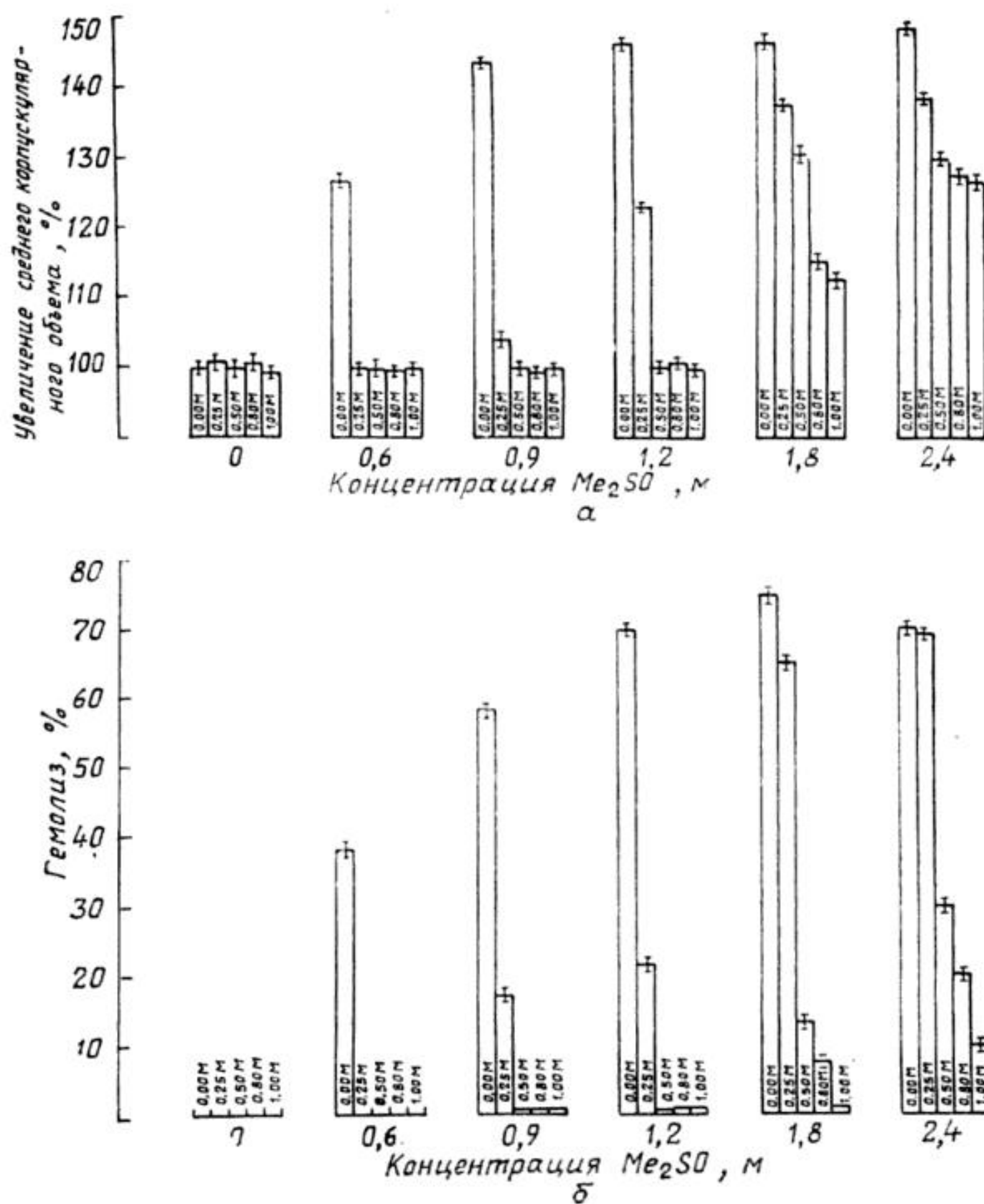


Рис. 1. Влияние сорбитола на СКО эритроцитов, суспендированных в растворе евро-Коллинза, содержащем Me_2SO , при быстром разведении. Цельную кровь разводили в 10 раз раствором евро-Коллинза с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ и содержащем Me_2SO в конечной концентрации 0, 0,6, 0,9, 1,2, 1,8 и 2,4 М. После одновременного добавления сорбитола в конечной концентрации 0, 0,25, 0,50, 0,80 и 1,00 М (значения, указанные на диаграмме) делали быстрое разведение изотонном II в счетчике Коултера и регистрировали СКО. Каждое значение представляет собой среднее шести экспериментов $\pm$ среднее квадратичное отклонение (а). Влияние быстрого разведения на гемолиз эритроцитов, суспендированных в буфере евро-Коллинза, содержащем Me_2SO и сорбитол в разной концентрации. Клетки, приготовленные как на рис. 1, а, вручную разводили изотонном II в 500 раз. Цианометгемоглобин определяли в супернатанте после центрифугирования, гемолиз выражали в процентах к общему гемолизу. Концентрации сорбитола указаны на диаграммах. Каждое значение представляет собой среднее шести экспериментов $\pm$ среднее квадратичное отклонение (б)

менее благоприятной для уменьшения набухания клеток при разведении. Сорбитол компенсировал в этом случае только эффекты, обусловленные снижением концентрации Me_2SO до 1,2 М. Увеличение СКО клеток в результате повышения концентрации Me_2SO можно было только частично уменьшить путем повышения уровня сорбитола (рис. 2, а). Значения гемолиза

в этих условиях были хотя и сравнимы с наблюдаемыми в растворе евро-Коллинза, однако увеличивались при повышении концентрации Me_2SO (рис. 2, б).

В среде К (135)-TES с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ без фосфатного буфера значения клеточного объема были сравнимы с данными,

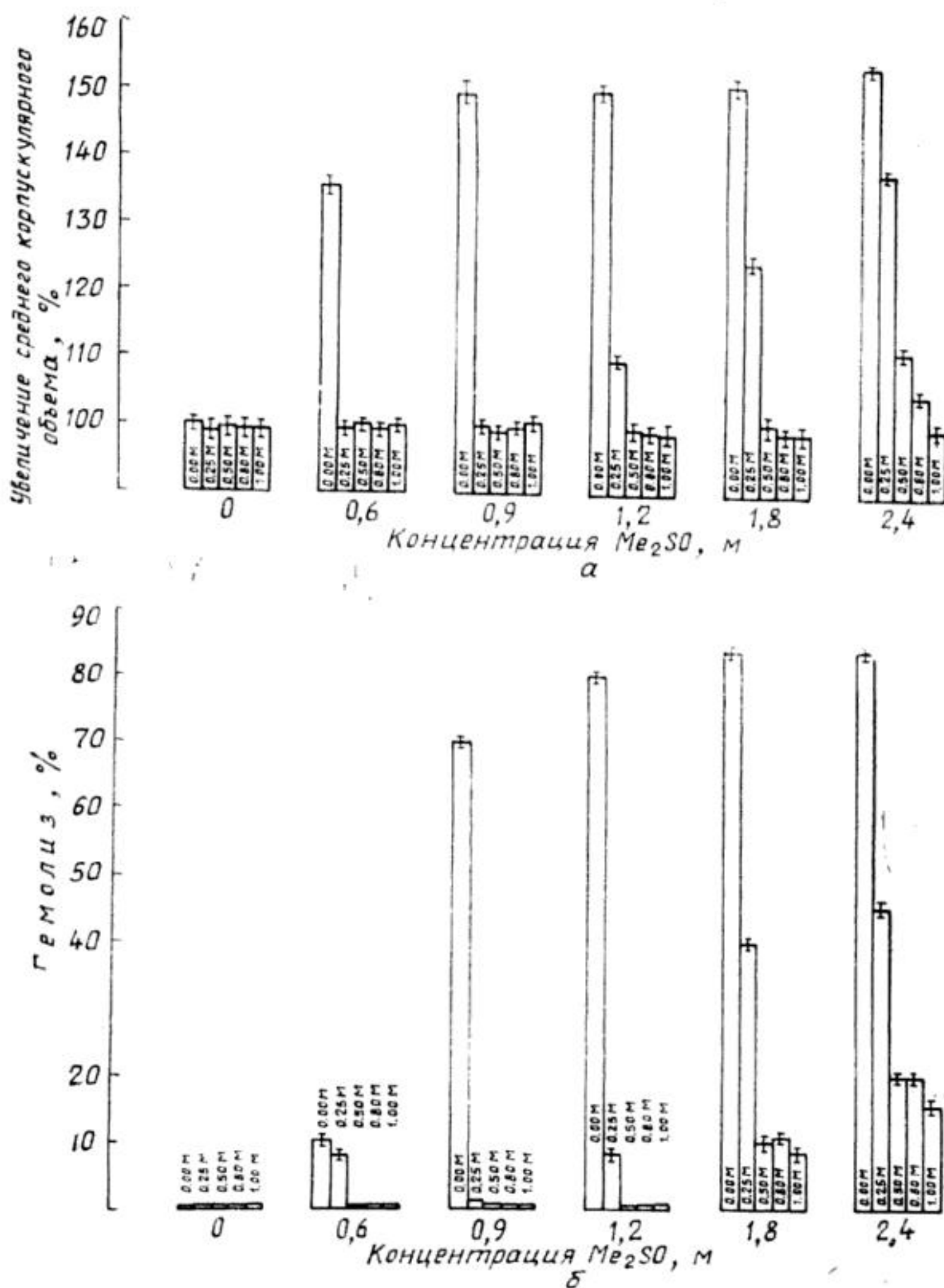


Рис. 2. Влияние сорбитола на СКО эритроцитов, суспендированных в перфудексе, содержащем Me_2SO , с высоким содержанием Na^+ и низким K^+ , при быстром разведении (а). Процедура та же, что и на рис. 1, а. Влияние быстрого разведения на гемолиз эритроцитов, суспендированных в растворе перфудекса, содержащем Me_2SO и сорбитол в разной концентрациях (б). Процедура та же, что и на рис. 1, б

полученными в среде с высоким содержанием Na^+ и низким K^+ (перфудекс), рис. 3.

При исследовании ионного состава буфера в отношении изменения объема клеток оптимальное их восстановление достигалось в буферах с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ , если после инкубации с Me_2SO и непрони- кающим сорбитолом криопротекторы быстро разводили изотоническими растворами. При использовании растворов с высоким содержанием Na^+ и низким K^+ либо без фосфатного буфера, например раствора К (135)-TES,

удовлетворительные результаты получены только в случаях, когда концентрация Me_2SO была ниже 1,2 М, то есть недостаточной для криоконсервирования. Гемолиз происходил при повышении значений СКО, представляющих собой средние значения объемов нормальных и лизированных клеток, образующих сферы [6,7]. В присутствии сорбитола исходный равновесный объем клетки до разведения значительно уменьшался по сравнению с эритроцитами в изотонической среде либо в среде, содержащей только Me_2SO . Таким образом, увеличение содержания внутриклеточной воды при разведении и увеличение в результате этого набухания клеток может и не приводить к такому увеличению их объема, при котором происходит гемолиз.

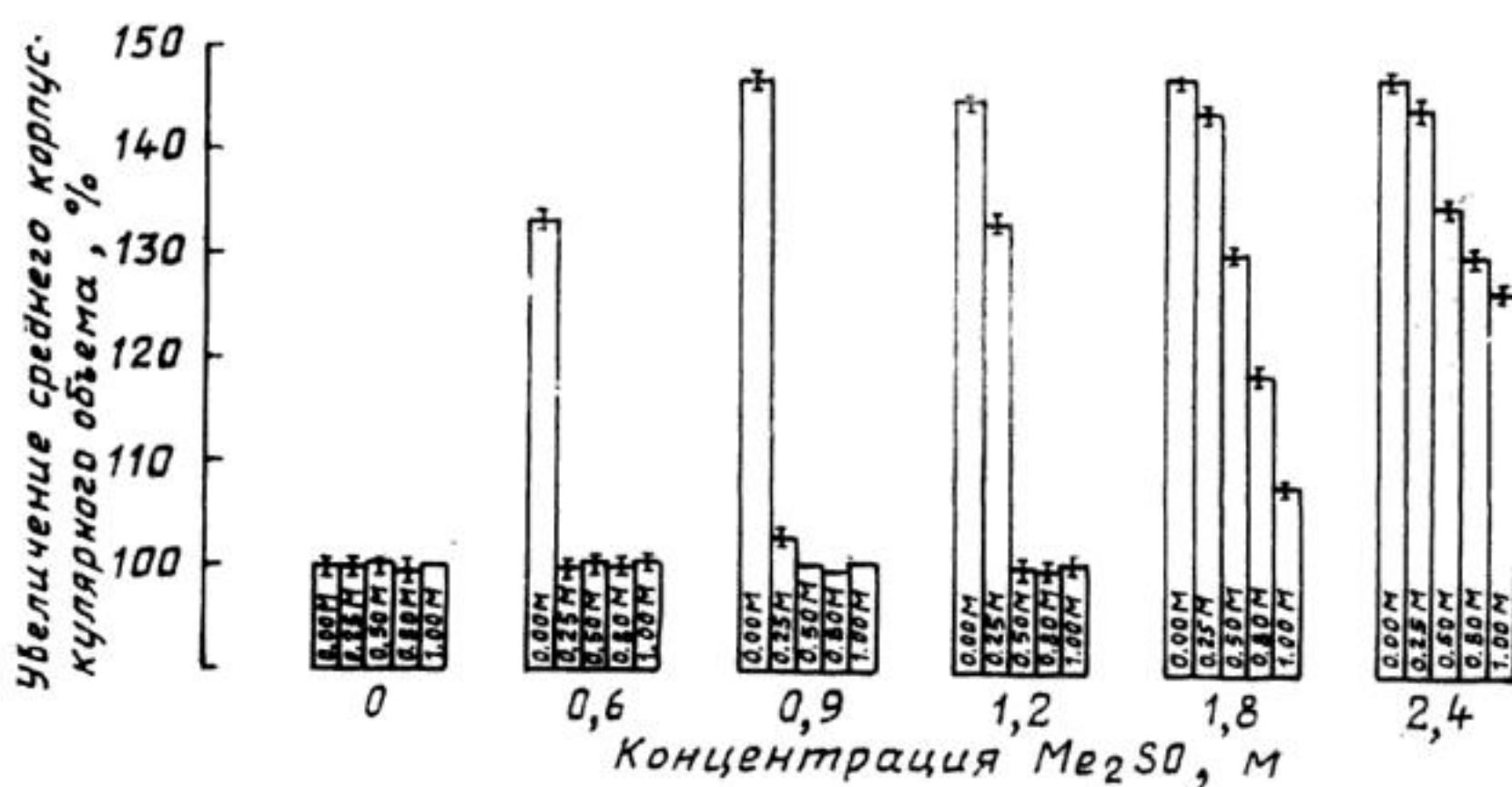


Рис. 3. Влияние сорбитола на СКО эритроцитов, суспендированных в растворе Me_2SO , содержащем цвиттерионный буфер К (135)-TES с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ , при быстром разведении. Процедура та же, что и на рис. 1, а

Поскольку фосфат-буферная среда с внутриклеточным составом электролитов обеспечивает оптимальную защиту, присутствие фосфатов при инкубации с криопротектором оказывает благоприятное действие и предотвращает избыточное набухание клеток, возможно, они вносят свой вклад, защищая процесс образования АТФ [1, 2, 3, 4].

Авторы благодарны Бельгийской национальной организации медицинских исследований за помощь при выполнении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Loecker W., De Wever F. Oxidative phosphorylation in rat skin during preservation // *Cryobiology*.— 1979.— 16, N 5.— P. 517—525.
2. De Loecker W., De Wever F., Stas M. L., Jullet R. The effects of adenosine triphosphate and inorganic phosphates on the viability of stored rat skin // *Ibid.*— 1979.— 16, N 1.— P. 11—17.
3. Green C. J., Pegg D. E. The effect of variation of electrolyte composition and osmolality of solutions for infusion and hypothermic storage of kidneys // *Organ Preservation*.— Edinburgh: Churchill Livingstone, 1979.— P. 86—101.
4. Lund P., Cornell N. W., Krebs H. A. Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes // *Biochem. J.*—1975.—152, N 6.— P. 593—599.
5. Mazur P., Rigopoulos P. Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: Influence of warming rate // *Cryobiology*.— 1983.— 20, N 2.— P. 274—289.
6. Meryman H. T. The relationship between dehydration and freezing injury in the human erythrocyte / *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms*.— Sapporo: Hokkaido University, 1967.— P. 231—244.
7. Meryman H. T. A modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes // *Nature (London)*.— 1968.— 218.— P. 333—336.
8. Pegg D. E. An approach to hypothermic renal preservation // *Cryobiology*.— 1978.— 15, N 1.— P. 1—17.

9. Pegg D. E., Jacobsen I. A., Armitage W. J., Taylor M. J. Mechanism of cryoinjury in organs // Organ Preservation.— Edinburgh: Churchill Livingstone, 1979.— P. 132—146.
10. Segal N. B., Guttman F. M. Function of rabbit kidneys *in vitro* at normothermia following equilibration with 3.0 M Me₂SO and removal by hypertonic washout at 10 °C // Cryobiology.— 1982.— 19, N 1.— P. 50—60.

Пер. с англ. З. В. Линевиц

Поступила 30.01.89

Ун-т г. Левена, Бельгия

R. De LOECKER, F. PENNINCKX

OSMOTIC EFFECTS OF RAPID DILUTION OF CRYOPROTECTANTS ON ERYTHROCYTE SWELLING AND HEMOLYSIS

University of Leuven, Belgium

Cell swelling and hemolysis of red blood cells resulting from dilution of the penetrating cryoprotectant dimethylsulfoxide can be reduced by the simultaneous addition of the nonpenetrating sorbitol during the exposure period. As a Mean Corpuscular Volume value represents the average between the volumes of normal cells and red blood cell vesicles formed upon dilution, the simultaneous addition of sorbitol during exposure reduces the initial cell volumes, thus avoiding hemolysis levels to be reached during the removal of cryoprotectants. Phosphate buffered solutions characterized by an intracellular electrolyte composition provide optimal protection against excessive cell swelling.

УДК 57.043

В. Д. Бобрышев, А. С. Снурников, В. Б. Швед

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОГО РАЗОГРЕВА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

В статье систематизированы экспериментальные данные по электрофизическим параметрам для переохлажденной воды и льда и аппроксимированы полученные частотные зависимости в диапазоне 1—10 000 МГц для следующего ряда температур: —10, —20, —30, —40 °C. На основании математической модели процесса диэлектрического разогрева клеточной суспензии определены значения локальных перегревов, возникающих в системе, их частотные и температурные зависимости. Показаны принципиальные преимущества ВЧ диэлектрического разогрева в сравнении с СВЧ.

Разработка оптимальных методов размораживания биологических объектов после криоконсервации является одной из актуальных задач криобиологии, поскольку не только условия охлаждения, но и режимы отогрева оказывают существенное влияние на их жизнеспособность. Традиционные способы размораживания, основанные на передаче энергии от внешнего теплоносителя, имеют ряд недостатков: принципиальная невозможность получения равномерного по объему разогрева, ограниченный диапазон скоростей изменения температуры, техническая сложность управления данным процессом [1].

Использование с этой целью диэлектрического разогрева позволяет избежать указанных недостатков, так как дает возможность реализовать объемное тепловыделение, широкий диапазон скоростей изменения температуры. При этом управление режимом разогрева осуществляется на уровне регулирования выходной мощности СВЧ генератора, что обеспечивает простоту и безынерционность процесса. Тем не менее в практике криобиологии диэлектрический разогрев не нашел широкого применения, что связано как с ограниченным числом частот, используемых для медицинских целей в СВЧ диапазоне (433, 915, 2400 МГц), так и с достаточно жестким требованием к однородности и изотропности объекта, при невыполнении которого возможны значительные локальные перегревы [6].

В настоящей работе предложен подход, позволяющий использовать диэлектрический разогрев реальной гетерогенной криобиологической системы при минимизации локальных перегревов. Для поиска оптимальных

параметров поля используется машинное моделирование процесса разогрева. В качестве модели принята гетерогенная система, состоящая из ледяной матрицы и жидких сферических включений переохлажденной пресной и морской воды (использована терминология, принятая в цитируемой литературе). Исследование двух вариантов включений позволяет оценить зависимость локального перегрева от состава жидкой фазы как по электрофизическим характеристикам в СВЧ и значительной части ВЧ диапазона, как и по теплофизическим, модель адекватна реальной системе: замороженной клеточной суспензии. Процесс диэлектрического разогрева принятой модели описывается следующей системой уравнений [3]:

$$\Delta\theta = \frac{R^2 E_0^2 \omega \varepsilon_2'' \varepsilon_0}{2\lambda_2} \left[A1 \cos^2 Q - B1 + D1 \left(\frac{R_0}{R} \right)^2 \right],$$

$$A1 = \frac{\lambda_2 (k_1 - 2k_3)}{2\lambda_1 + 3\lambda_2},$$

$$A2 = \frac{(\lambda_2 + 2\lambda_1) k_3 + 2k_1 (\lambda_1 - 2\lambda_2)}{2\lambda_1 + 3\lambda_2},$$

$$B1 = \frac{1}{3} \left[\frac{\lambda_2 \varepsilon_2''}{\lambda_1 \varepsilon_2''} k_2 + A2 - \frac{\lambda_2 C1}{\lambda_1 C2} \right],$$

$$D1 = \frac{1}{3} \left[\left(\frac{\lambda^2}{\lambda_1} + 2 \right) \left(\frac{\varepsilon_1''}{\varepsilon_2''} k_2 - \frac{C1}{C2} \right) \right] + k_1,$$

$$k_1 = \frac{(\varepsilon_2' - \varepsilon_1')^2 + (\varepsilon_2'' - \varepsilon_1'')^2}{(\varepsilon_1' + 2\varepsilon_2')^2 + (\varepsilon_1'' + 2\varepsilon_2'')^2},$$

$$k_2 = \frac{9 [(\varepsilon_2')^2 + (\varepsilon_2'')^2]^2}{(\varepsilon_1' + 2\varepsilon_2')^2 + (\varepsilon_1'' + 2\varepsilon_2'')^2},$$

$$k_3 = \frac{(\varepsilon_2' - \varepsilon_1') (\varepsilon_1' + 2\varepsilon_1') + (\varepsilon_2'' - \varepsilon_1'') (\varepsilon_1'' + 2\varepsilon_2'')}{(\varepsilon_1' + 2\varepsilon_2')^2 + (\varepsilon_1'' + 2\varepsilon_2'')^2},$$

где $\Delta\theta$ — превышение температуры относительно бесконечно удаленной точки; E_0 — напряженность электромагнитного поля; ω — циклическая частота ЭМП; R_0 — радиус сферической неоднородности; R , Q — элементы сферической системы координат, при этом принято, что вектор E_0 направлен по оси $Q = 0$, а центр неоднородности находится в точке $R = 0$; $C1$, $C2$ — теплоемкость жидкой и твердой фаз; λ_1 , λ_2 — теплопроводность жидкой и твердой фаз; ε_0 — абсолютная диэлектрическая проницаемость; ε_1' , ε_2' — действительная часть относительной диэлектрической проницаемости жидкой и твердой фаз; ε_1'' , ε_2'' — мнимая часть относительной диэлектрической проницаемости жидкой и твердой фаз.

Наибольший практический интерес представляют исследования зависимости локального перегрева от частоты ЭМП в температурном диапазоне $0 \div -40^\circ\text{C}$, где возможно существование двухфазной системы. Анализ приведенной системы уравнений показывает, что в качестве исходного числового материала используются теплофизические C , λ и электрофизические ε' , ε'' параметры твердой и жидкой фаз. Если первые слабо зависят от температуры в данном температурном диапазоне и не зависят от частоты ЭМП, то значения вторых могут изменяться на несколько порядков.

Нами систематизированы разрозненные экспериментальные данные об электрофизических параметрах для переохлажденной воды и льда, и полученные частотные зависимости аппроксимированы в диапазон $1 \div 10000$ МГц для следующего ряда температур: -10 , -20 , -30 , -40°C . Оценка действительной части диэлектрической проницаемости ε_1' воды (рис. 1) проведена на основании данных для области положительных температур [5], а также температурной зависимости ε переохлажденной воды [2]. Для оценки мнимой части диэлектрической проницаемости ε_1'' пресной воды (рис. 2) использованы данные о температурной зависимости тангенса угла диэлектрических потерь $\text{tg } \delta$ при положительных температурах [3], а также полученные выше частотные зависимости ε_1' . Зависимость от частоты для морской воды (рис. 2) получена на основании значений для пресной воды с учетом вклада, обусловленного повышенной ионной проводимостью первой

[4]. Оценка указанных выше величин для льда проведена аналогично: действительная часть диэлектрической проницаемости (рис. 3) на основании данных [2,5]; для определения (рис. 4) использованы результаты работы [5] при температуре -12°C , а также зависимость $\text{tg}\delta$ льда от частоты и дебаевская аппроксимация для ϵ .

Систематизация электрофизических параметров позволила провести вычисления значений $\Delta\theta$ в исследуемой модели криоконсервированной клеточной суспензии при ее диэлектрическом нагреве. Расчет проведен для скорости нагрева ледяной матрицы $1^{\circ}\text{C}/\text{с}$, что позволило, используя известное преобразование [3]

$$\frac{\partial\theta}{\partial t} = \frac{\omega\epsilon'\epsilon_0 \text{tg}\delta}{C2} E_0^2$$

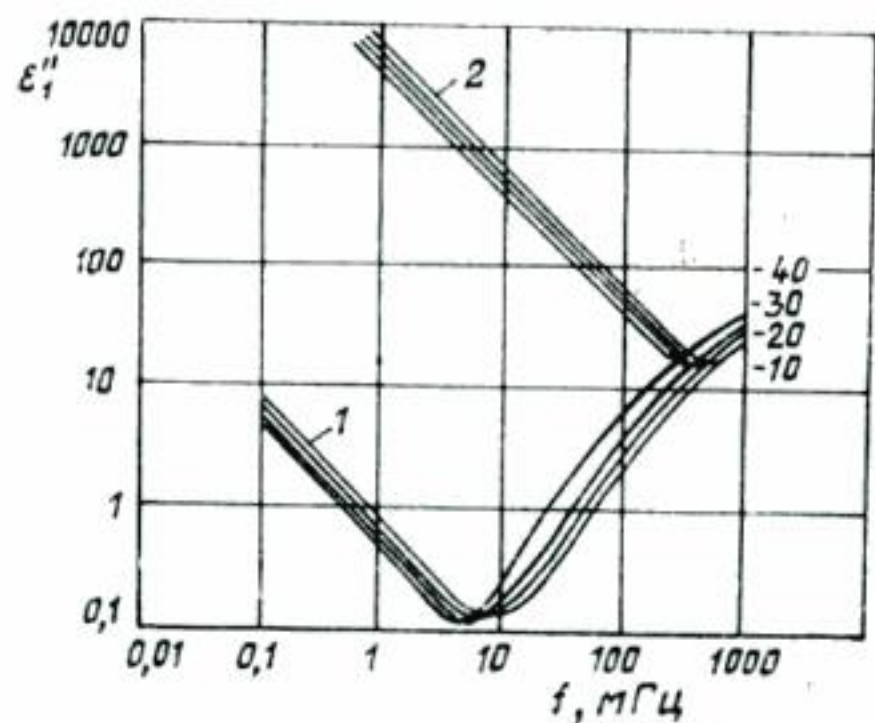
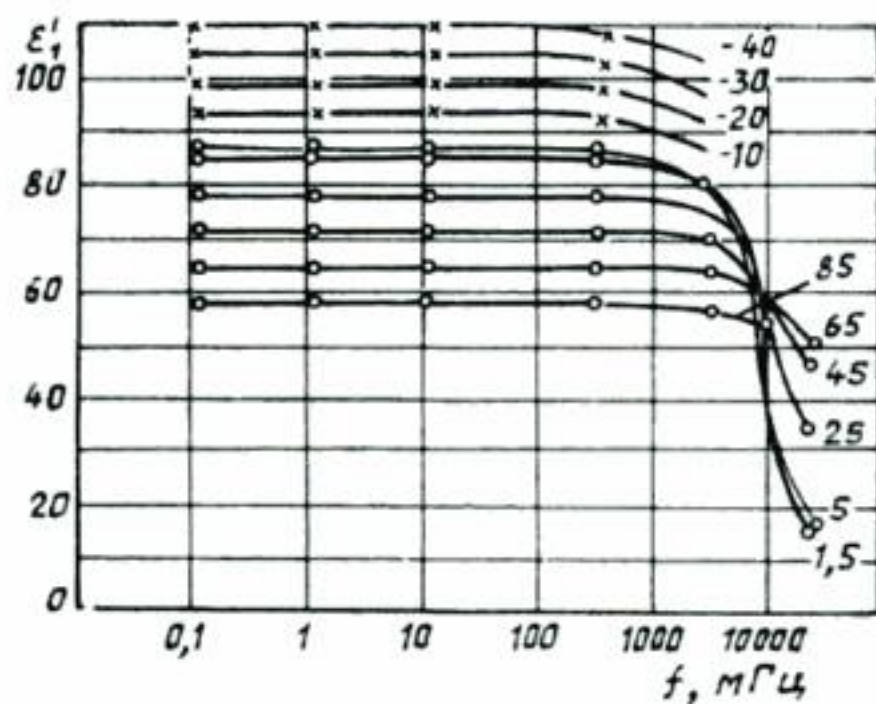


Рис. 1. Частотная зависимость действительной части диэлектрической проницаемости ϵ_1' воды при различных температурах ($^{\circ}\text{C}$): литературные данные— $\bigcirc$ — $\bigcirc$ — $\bigcirc$; аппроксимация— $\times$ — $\times$ — $\times$

Рис. 2. Зависимость мнимой части диэлектрической проницаемости ϵ_1'' воды при различных температурах ($^{\circ}\text{C}$): 1 — для пресной воды; 2 — для морской воды

избежать вычисления в явном виде напряженности электрического поля E_0 . Полученные значения перегрева $\Delta\theta$ для включений морской и пресной воды в частотном диапазоне $1 \div 1000$ МГц при температурах -10 , -20 , -30 , -40°C представлены на рис. 5. Необходимо отметить, что изменение скорости нагрева $\frac{\partial\theta}{\partial t}$ приводит к пропорциональному изменению вели-

чины перегрева $\Delta\theta$. Приведенные результаты подтверждают наличие значительных локальных перегревов в СВЧ области исследуемого диапазона. Однако принципиально новым является существование частот, зависящих от температуры матрицы и ионной проводимости включений, на которых полностью отсутствует локальный перегрев неоднородностей в данной гетерогенной среде. Эта нетривиальная возможность объясняется дисперсионным эффектом ослабления внешнего ЭМП внутри сильно отличающихся по электрофизическим характеристикам включений, который на определенных частотах может компенсировать превышение коэффициента диэлектрических потерь в жидкой фазе по сравнению со льдом. Анализ расчетных данных показывает, что нулевой перегрев для включений из пресной воды реализуется при частотах меньше 100 МГц и с повышением ионной проводимости включений сдвигается в еще более низкочастотную область. При этом возникает вопрос о сравнительной эффективности нагрева льда в ВЧ диапазоне по сравнению с СВЧ. Так как энергия, выделяемая в образце, пропорциональна $E^2\omega\epsilon_2''$, где E — напряженность ЭМП в среде, то при десятикратном снижении частоты для компенсации дефицита поглощаемой мощности необходимо десятикратное увеличение величины $E^2\epsilon_2''$. Из приведенного графика (рис. 4) видно, что ϵ_2'' при этом увеличится не менее чем в 5 раз. Следовательно, потребуется всего полуторакратное увели-

чение напряженности ЭМП. Например, при частоте 10 МГц и скорости разогрева льда 1 °С/с значение напряженности ЭМП не превышает 2 кВ/см.

Техническая реализация указанных напряженностей в данном диапазоне не сложна.

Таким образом, показано, что при диэлектрическом разогреве гетерогенной системы в жидкой фазе как правило возникают значительные локальные перегревы. Традици-

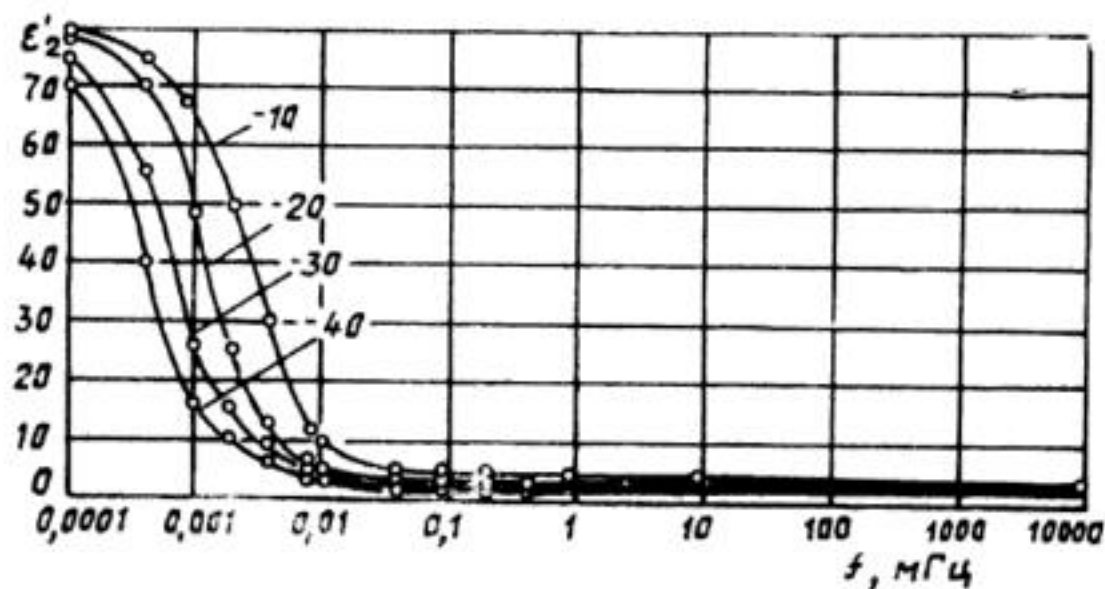


Рис. 3

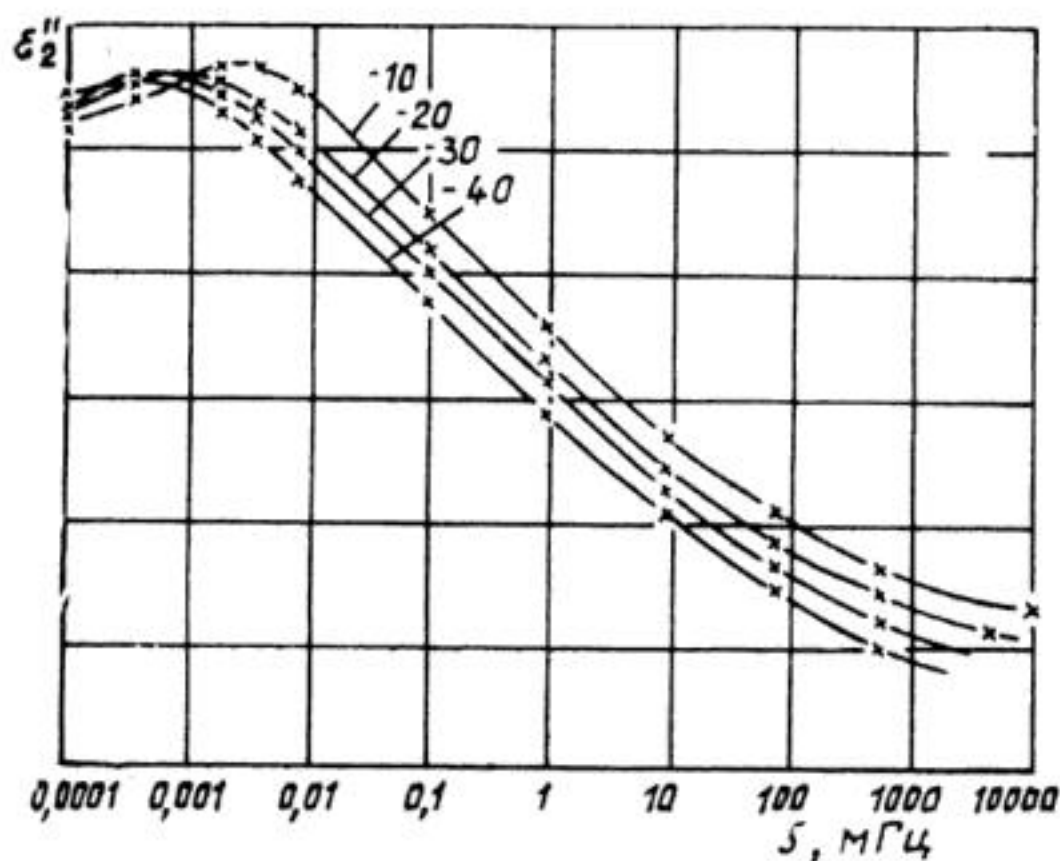


Рис. 4

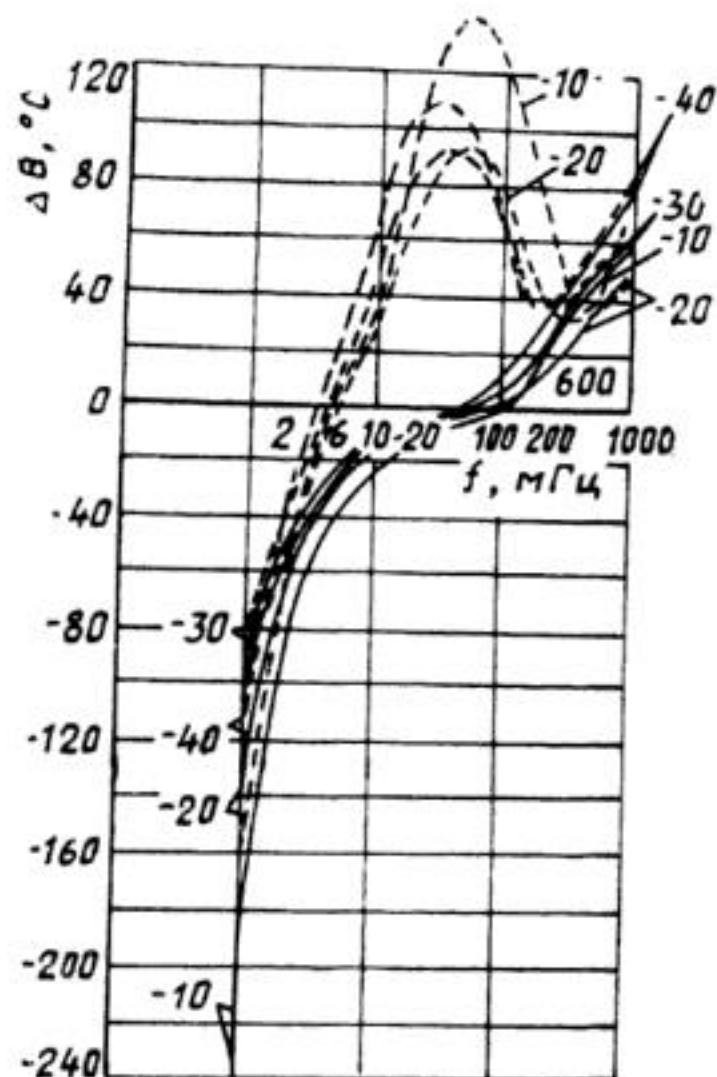


Рис. 5

Рис. 3. Частотная зависимость действительной части диэлектрической проницаемости льда ϵ_2' при различных температурах: литературные данные—○—○—○; аппроксимация—×—×—×

Рис. 4. Зависимость мнимой части диэлектрической проницаемости ϵ_2'' льда при различных температурах (°С): литературные данные ○—○—○; аппроксимация ×—×—×

Рис. 5. Температурный перепад в сферической неоднородности относительно окружающей матрицы при диэлектрическом разогреве со скоростью 1 °С/с на разных частотах при температурах —10, —20, —30, —40 °С: сплошные линии — для пресной воды, пунктирные — для морской воды

онное использование СВЧ диапазона принципиально не позволяет получить однородный по объему разогрев гетерогенного образца, в то время как в ВЧ диапазоне такая возможность существует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н. С. Пушкаря.— Киев: Наук. думка, 1981 — 605 с.
2. Вода и водные растворы при температуре ниже 0 °С / Под ред. Ф. Франкса.— Киев: Наук. думка, 1985.— 300 с.
3. Нетушил А. В. Высоочастотный нагрев диэлектриков и полупроводников.— М., Л.: ГЭИ, 1959.— 500 с.
4. Никольский В. В. Электродинамика и распространение волн.— М.: Наука, 1973.— 400 с.
5. Хиппель А. Р. Диэлектрики и их применение.— М.: Высшая школа, 1959.— 400 с.
6. Шестиперов В. А. СВЧ электродинамические системы для термообработки веществ, изменяющих свои электрофизические свойства в широких пределах.— Автореф. дис. ... канд. техн. наук.— М., 1986.— 21 с.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 04.01.88 г.

V. D. BOBRY SHEV, A. S. SNURNIKOV, V. B. SHVED

MODELLING OF THE PROCESS OF DIELECTRIC WARMING OF CRYOPRESERVED CELLULAR SUSPENSIONS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

The paper contains experimental data on electrophysical parameters for supercooled water and ice as well as an approximation of the obtained frequency dependences in the range of 1 to 10 000 Mhz for the following series of temperatures: -10 , -20 , -30 , and -40 °C. On the basis of the mathematical model for cellular suspension dielectric warming, values for local overheatings occurring in the system and their frequency and temperature dependences were determined. The major advantages of high frequency dielectric warming over ultrahigh frequency dielectric warming were demonstrated.

УДК 57.043.576.311.34.591.044.3

Л. П. Кравченко, Л. В. Карева, В. И. Луговой

КРИОПОВРЕЖДЕНИЕ ЛИЗОСОМ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ — ОТТАИВАНИИ

Изучена криочувствительность лизосом изолированных гепатоцитов в условиях однократного цикла замораживания—оттаивания суспензии клеток печени. Установлено, что лизосомы в составе клеток являются более криоустойчивыми, чем лизосомы, выделенные из клеток, что может быть обусловлено стабилизирующим действием естественного микроокружения лизосомальных мембран.

Сохранение целостности лизосом при замораживании—оттаивании клеток и тканей является одним из условий, определяющих эффективность низкотемпературной консервации биологического материала, поскольку хорошо известно, что нарушение проницаемости лизосомальных мембран сопровождается выходом в цитоплазму высокоактивных гидролаз, способных оказывать разрушающее действие на различные макромолекулярные и мембранные структуры клетки. В предыдущих исследованиях было показано [1], что замораживание изолированной фракции лизосом приводит к дестабилизации этих органелл, одной из причин которой может быть повреждающий эффект на мембрану высоких концентраций солей в результате вымораживания воды из системы.

Задачей настоящего исследования являлось выяснение криочувствительности лизосом в условиях однократного цикла замораживания—оттаивания суспензии изолированных клеток печени.

Гепатоциты выделяли из печени белых крыс массой 200—250 г [2]. Аликвоты суспензии гепатоцитов (5 мл), приготовленной на 0,15 М растворе хлорида натрия и содержащей $10 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл, помещали в полиэтиленовые ампулы и замораживали в жидком азоте со средней скоростью 300—400 °C/мин до -196 °C. Оттаивание экспериментальных образцов проводили в водяном термостате при $40 \div 42$ °C. Контролем служили пробы, не подвергавшиеся замораживанию. Обогащенную лизосомами фракцию получали методом дифференциального центрифугирования гомогената клеток по схеме Де Дюва и соавторов [7]. Проводили исследование общей, неседиментируемой и связанной с лизосомами активности кислых гидролаз [4], определяли активности кислой рибонуклеазы и кислой дезоксирибонуклеазы [6], катепсина Д [3], кислой фосфатазы [5]. Активность ферментов выражали в микромолях соответствующего субстрата, расщепленного в процессе гидролиза за 1 мин при 37 °C, на 1 мг белка. В качестве субстратов были использованы следующие вещества: высокополимерные РНК и ДНК, гемоглобин, β -глицерофосфат («Реанал»).

В применявшихся экспериментальных условиях нельзя было исключить, что замораживание—оттаивание может оказывать активирующее или ингибирующее влияние непосредственно на лизосомальные ферменты. Поэтому для проверки такого предположения была изучена активность гидролаз, солюбилизированных из органелл с помощью 0,1 %-ного раствора тритона

X-100, после замораживания ферментного препарата до -196°C . Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что замораживание — оттаивание не оказывало заметного влияния на активность солюбилизованных из лизосом гидролаз, что свидетельствует о криостабильности этих ферментов.

Таблица 1

Активность солюбилизованных лизосомальных гидролаз (мкмоль субстрата $\cdot$ мг $^{-1}$ белка $\cdot$ мин $^{-1}$) после замораживания — оттаивания

Условия опыта	Активность ферментов			
	РНКаза	ДНКаза	Катепсин Д	Кислая фосфатаза
До замораживания (контроль)	$2,17 \pm 0,27$	$0,55 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,02$	$4,70 \pm 0,22$
После замораживания <i>P</i>	$2,22 \pm 0,25$ $>0,1$	$0,58 \pm 0,03$ $>0,1$	$0,57 \pm 0,03$ $>0,1$	$5,10 \pm 0,21$ $>0,1$

Таблица 2

Общая активность лизосомальных ферментов (мкмоль субстрата $\cdot$ мг $^{-1}$ белка $\cdot$ мин $^{-1}$) после замораживания — оттаивания гепатоцитов

Условия опыта	Активность гидролаз			
	РНКаза	ДНКаза	Катепсин Д	Кислая фосфатаза
Гепатоциты до замораживания	$3,34 \pm 0,46$	$0,68 \pm 0,07$	$6,38 \pm 0,30$	$0,88 \pm 0,07$
после замораживания <i>P</i>	$2,00 \pm 0,30$ $<0,05$	$0,34 \pm 0,05$ $<0,01$	$4,04 \pm 0,20$ $<0,01$	$0,66 \pm 0,05$ $<0,05$
Среда замораживания	$1,64 \pm 0,29$	$0,45 \pm 0,07$	$4,09 \pm 0,65$	$0,32 \pm 0,05$

Таблица 3

Связанная с лизосомами активность ферментов (мкмоль субстрата $\cdot$ мг $^{-1}$ белка $\cdot$ мин $^{-1}$) после замораживания — оттаивания гепатоцитов крыс

Условия опыта	Активность ферментов			
	РНКаза	ДНКаза	Катепсин Д	Кислая фосфатаза
До замораживания (контроль)	$5,29 \pm 0,30$	$1,68 \pm 0,13$	$9,83 \pm 0,50$	$2,05 \pm 0,14$
После замораживания <i>P</i>	$3,33 \pm 0,60$ $<0,05$	$0,60 \pm 0,06$ $<0,01$	$4,10 \pm 0,64$ $<0,01$	$1,70 \pm 0,19$ $<0,05$

После быстрого замораживания суспензии гепатоцитов отмечалось довольно выраженное снижение в клетках общей активности лизосомальных гидролаз, которое сопровождалось появлением в среде замораживания достаточно высокого уровня их активности (табл. 2). При этом в гепатоцитах, подвергавшихся замораживанию, наблюдалось снижение связанной с лизосомами активности гидролаз (табл. 3) с одновременным увеличением их неседиментируемой активности (табл. 4).

Таблица 4

Неседиментируемая активность лизосомальных гидролаз (в % от общей активности) после замораживания — оттаивания гепатоцитов крыс

Условия опыта	Активность ферментов			
	РНКаза	ДНКаза	Катепсин Д	Кислая фосфатаза
До замораживания (контроль)	$13,8 \pm 0,20$	$14,0 \pm 3,0$	$17,0 \pm 2,5$	$13,6 \pm 2,6$
После замораживания <i>P</i>	$22,9 \pm 1,6$ $<0,05$	$31,8 \pm 2,7$ $<0,001$	$38,0 \pm 6,0$ $<0,001$	$26,8 \pm 5,9$ $<0,01$

Из представленных данных следует, что в процессе замораживания—оттаивания гепатоцитов происходит дестабилизация лизосом, которая проявляется нарушением латентности гидролаз и изменением их внутриклеточного баланса.

При сравнении относительного уровня неседиментируемой активности гидролаз в гепатоцитах и в изолированных фракциях лизосом после замораживания—оттаивания их по одной программе (быстрое замораживание—быстрое оттаивание) выявилось, что в последнем случае величина изучавшегося показателя была особенно значительной (табл. 5).

Таблица 5

Неседиментируемая активность гидролаз (в % от общей активности) после замораживания—оттаивания изолированной фракции лизосом и гепатоцитов

Условия опыта	Активность ферментов			
	РНКаза	ДНКаза	Катепсин Д	Кислая фосфатаза
Изолированная фракция лизосом	69,4±2,8	48,0±4,3	52,2±5,5	58,6±5,0
Лизосомы в составе гепатоцитов	22,9±1,6	31,8±2,7	38,0±6,0	26,8±5,9
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001

Эти результаты позволяют сделать заключение о том, что лизосомы в составе клеток проявляют более высокую криоустойчивость, чем органеллы в составе выделенной фракции. Такое явление может быть обусловлено стабилизирующим действием естественного микроокружения лизосомальных мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кравченко Л. П., Луговой В. Я., Білоус А. М. Значения концентраційних чинників у кріопшкодженні лізосом // Укр. біохім. журн.— 1976.— 48, № 1.— С. 11—15.
2. Луговой В. И., Кравченко Л. П., Карева Л. В. и др. Метод получения изолированных клеток печени // Криобиология и криомедицина.— Киев: Наук. думка, 1983.— Вып. 13.— С. 36—39.
3. Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментативная идентификация субклеточных фракций // Современные методы в биохимии.— М.: Медицина, 1968.— С. 5—59.
4. Покровский А. А., Тутельян В. А., Кравченко Л. В. К вопросу об оценке стабильности мембран лизосом // Биохимия.— 1975.— 40, № 3.— С. 545—552.
5. Bodansky O. Acid phosphatase // Adv. Clin. Chem.— 1975.— 15, N 1.— P. 43—147.
6. Barrett A. Lysosomal enzymes. Assay methods // Lysosomes. A laboratory handbook.— Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1972.— P. 43—136.
7. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R. et al. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue // Biochem. J.— 1955.— 60, N 6.— P. 604—617.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 03.03.88

L. P. KRAVCHENKO, L. V. KAREVA, V. I. LUGOVOJ

CRYODAMAGE OF LYSOSOMES OF ISOLATED HEPATOCYTES DURING FREEZE-THAWING

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

The cryosusceptibility of lysosomes of isolated hepatocytes was studied during single cycle of freeze—thawing. It was found that lysosomes inside the cells were more stable to low temperatures than isolated ones, probably, due to the stabilizing effect of the microenvironment of lysosomal membranes.

А. В. Дегтярев, В. А. Бондаренко

ХОЛОДОВЫЙ ШОК ФОСФОЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ. ТЕРМОУПРУГИЙ МЕХАНИЗМ НАРУШЕНИЯ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ МЕМБРАНЫ

В рамках механохимической модели липидного бислоя сделана оценка влияния осмолярности наружной среды на холодовый шок фосфолипидных везикул. Расчетные значения для критической температуры начала лизиса везикул при холодовом шоке и её зависимости от трансмембранного осмотического градиента удовлетворительно согласуются с экспериментально измеренными величинами. Методом малоуглового светорассеяния измерены эффективные значения коэффициента теплового расширения бислоя ($\theta_{эф}$) в зоне фазовых переходов синтетических и природных липидов: дипальмитоиллецитина, димиристоиллецитина, дилауроиллецитина, сфингомиелина из мозга быка и смеси яичного лецитина с димиристоиллецитином в мольном соотношении 1 : 1. Полученные величины $\theta_{эф}$ на один-два порядка превышают значения θ , характерные для бислоев в жидкокристаллическом состоянии.

Экспериментальные закономерности нарушения барьерной функции бислоя при охлаждении липидных везикул в зоне температур, удаленной от области фазовых переходов входящих в состав бислоя липидов, рассмотрены нами в предыдущем сообщении [1]. Выявленные закономерности, как будет показано ниже, удовлетворительно интерпретируются в рамках механохимической модели бислоя [2].

Поскольку около половины площади большинства биологических мембран занята молекулами липидов [3], возрастание натяжения липидного бислоя при снижении температуры может оказывать существенное влияние на характер развития холодового шока и криповреждения клеток и клеточных органелл [10]. В первую очередь это относится к мембранам, имеющим форму, близкую к сферической, и незначительный запас мембранного материала в виде складок или выступов, например мембранам лизосом, наружным мембранам митохондрий, мембранам бактериальных клеток. Термоупругие силы могут являться причиной повреждения при охлаждении мембран, прикрепленных к упругим опорным элементам, таких как цитоплазматические мембраны яйцеклеток, меристемных клеток высших растений, многих бактериальных клеток. Кроме того, в рамках мозаичной модели биологических мембран [6] термоупруго индуцированные натяжения могут иметь локальный характер. В этом случае форма мембран уже не будет играть определяющей роли и повреждения, связанные с локальными натяжениями бислоя, могут развиваться при охлаждении большинства биологических объектов. Особенно сильные термоупругие эффекты, как будет показано ниже, наблюдаются в температурной области фазовых переходов липидов, входящих в состав мембран.

В работе использовали отечественный яичный лецитин (ЯЛ) после дополнительной очистки методом тонкослойной хроматографии, димиристоиллецитин (ДМЛ), «Серва», дилауроиллецитин (ДЛЛ) и дипальмитоиллецитин (ДПЛ), «Калбиоchem», сфингомиелин из мозга быка (СФМ), «Сигма». Все липиды были хроматографически чистыми.

Фосфолипидные везикулы получали по ранее описанному методу [5]. Липид в количестве 12 мг растворяли в 1 мл смеси хлороформа с метанолом (96 : 4 по объему) и упаривали под вакуумом на роторном испарителе RVO-82 во вращающемся флаконе цилиндрической формы до получения на его стенке тонкой сухой липидной пленки. Во флакон аккуратно без встряхивания добавляли 6 мл бидистиллированной воды и инкубировали 4 ч при температуре, превышающей температуру фазового перехода липида на 5 градусов. Полученные везикулы освобождали от примеси многослойных липосом, центрифугируя суспензию 10 мин при 6000 g. В надосадке доминировали крупные сферические везикулы. Средний диаметр получен-

ных везикул определяли методом интерференционной оптической микроскопии, используя в качестве контрастирующего вещества 1 %-ный раствор фикола-400. Относительное изменение объема везикул, как функцию времени или температуры, рассчитывали по формуле [11]:

$$\frac{V - V_0}{V_0} = \frac{[-\lg \tau(t, T)]^{-1,5} - [-\lg \tau(t_0, T_0)]^{-1,5}}{[-\lg \tau(t_0, T_0)]^{-1,5}}, \quad (1)$$

где V — объем везикулы, t — время, T — температура суспензии, а $\tau = \tau(t, T)$ — светопропускание суспензии на углы $1,5^\circ \div -1,5^\circ$ при длине волны 450 нм. Индекс «0» присвоен начальным значениям переменных. При измерении относительных изменений объема везикул в зоне фазового перехода использовали аналогичную формулу, считая T_0 равной температуре верхней (T_v), а T — нижней (T_n) границы перехода. Поправка к полученным величинам $((V_v - V_n)/V_v)$ на изменение показателя преломления липида при переходе из жидкокристаллического в гель-состояние была учтена на основании данных [11] в виде поправочного коэффициента ($\kappa =$

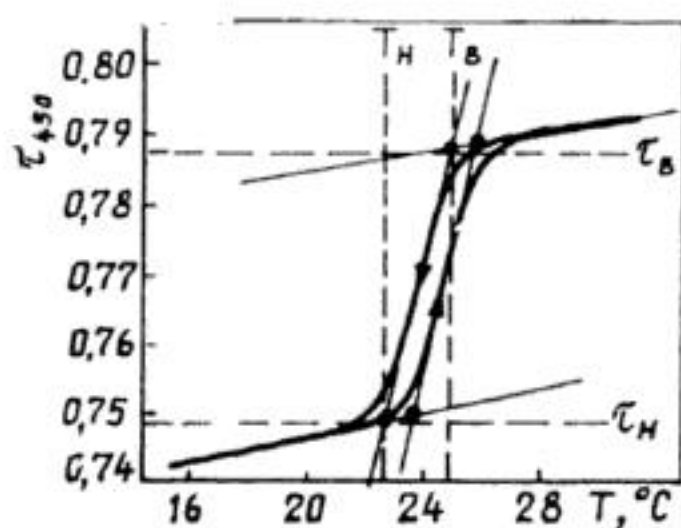


Рис. 1. Зависимость светопропускания (τ_{450}) суспензии везикул клеточных размеров из ДМЛ от температуры. Верхнюю (T_v и τ_v) и нижнюю (T_n и τ_n) границы фазового перехода определяли графическим путем как точки пересечения касательных к пологим и крутому участкам кривой $\tau = \tau_{450}(T)$. На рисунке представлены T_v , T_n , τ_v и τ_n для нисходящей ветви кривой, полученной при охлаждении суспензии

$= 0,77$). Следует подчеркнуть, что в наших опытах при измерении параметров фазовых переходов везикулы имели сферическую форму и средний диаметр не менее 5 мкм, то есть более 10λ . В этом случае приближение Ми для описания рассеяния света везикулами вполне корректно и выполняется соотношение (1) [11]. Параметры фазового перехода (T_n , T_v , T_k) определяли из зависимости светопропускания суспензии везикул от температуры, как показано на рис. 1. Температурный коэффициент изменения площади бислоя (θ) в зоне фазового перехода определяли по приближенной формуле

$$\theta_{\text{эф}} = \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{\bar{T}} = \frac{2(V_v - V_n)}{3V_v(T_v - T_n)}, \quad (2)$$

где α — относительное изменение площади мембраны, T — абсолютная температура, $\bar{T}$ — изотропное натяжение мембраны. Бислои в зоне фазового перехода липида хорошо проницаемы для воды [4]. Поэтому сопротивлением воды изменению объема везикул пренебрегали и считали изотропное натяжение мембраны, усредненное по всей площади, близким к нулю при скорости изменения температуры среды равной $0,08 \div 0,1^\circ \text{C/s}$.

Проницаемость везикул для осмотически активного вещества (ОАВ) оценивали по осмотической активности при гипертоническом стрессе. Суспензию везикул в дистиллированной воде (3 мл) помещали в кювету спектрофотометра, снабженную магнитной мешалкой. Кювету, наполненную суспензией, термостатировали при заданной температуре в течение 10 мин с точностью $\pm 0,05^\circ \text{C}$, а затем в нее впрыскивали 10 мкл раствора NaCl (имеющего ту же температуру) до конечной концентрации 40 ммоль/л. Регистрировали кинетическую кривую $[\tau = \tau(t)]$ уменьшения светопропускания суспензии везикул при $\lambda = 450$ нм и по формуле (1) рассчитывали величину максимального уменьшения объема везикул $|(V_0 - V_{\min})/V_0^{\text{osm}}|$. За осмотически активный объем принимали объем воды, которую везикулы теряли при изотермическом гипертоническом стрессе при температуре 30°C ,

когда бислой из всех использованных липидов (ЯЛ, ДМЛ, ДМЛ: ЯЛ = 1:1) находились в жидкокристаллическом состоянии и являлись хорошим барьером для ионов [9].

В предыдущем сообщении [1] мы описали основные экспериментальные закономерности развития холодового шока фосфолипидных везикул из яичного лецитина при охлаждении суспензии со скоростью $0,08 \div 0,1$ °C/с в температурной зоне, когда бислой находился в жидкокристаллическом состоянии (от 22 до 0 °C). В изотонических условиях лизис везикул начинался при охлаждении суспензии на 10—12 °C относительно начальной температуры. Изменение начальных осмотических условий в сторону гипотонии повышает, а в сторону гипертонии — понижает критическую температуру начала лизиса (T_k).

Влияние исходной осмолярности внешней среды на T_k можно описать в рамках термоупругой модели [2]. Согласно этой модели, уравнение состояния мембраны, имеющей сферическую форму, в терминах изотропного натяжения имеет вид

$$d\bar{T} = \Gamma (d\alpha - \theta dT), \quad (3)$$

где $\bar{T}$ — изотропное натяжение мембраны, α — относительное изменение её площади, T — абсолютная температура, $\Gamma \left(\frac{\partial \bar{T}}{\partial \alpha} \right)_T$ — изотермический модуль сжатия, а $\Theta = \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{\bar{T}}$ — температурный коэффициент изменения площади бислоя при постоянном изотропном натяжении. Равновесная площадь мембраны при снижении температуры уменьшается. Если в везикулы включено ОАВ в концентрации C_0 , то уменьшение объема везикул при охлаждении будет приводить к концентрированию ОАВ внутри везикул, возникновению разности осмотического давления и, соответственно, росту изотропного натяжения их мембран. При охлаждении до критической температуры T_k натяжение мембраны достигает критической величины $\bar{T}_k$ и она теряет свои барьерные свойства [8]. Для гипотонических условий начальное натяжение мембраны $\bar{T}_0$ задается градиентом осмотического давления и выражение для критической температуры получаем в виде

$$T_k = T_0 \frac{rRT_0}{2\Gamma\Theta n} (C_0 - C_n) - \frac{\bar{T}_k}{\Gamma\Theta} \left(1 + \frac{4\Gamma n}{3rRT_0 C_0} \right), \quad (4)$$

где T_0 — начальная температура; C_0 — изотоническая, а C_n — гипотоническая концентрация ОАВ; r — радиус везикулы; n — число бислоев липида в мембране; R — универсальная газовая постоянная. Предполагается, что для везикул выполняется условие $nh \ll r$ (где h — толщина бислоя) и взаимным влиянием бислоев в олиголамеллярной мембране можно пренебречь [8]. Для одноламеллярной везикулы диаметром 5 мкм в изоосмотическом растворе NaCl (180 ммоль/л) поправка к T_k на изменение объема везикул при охлаждении (второе слагаемое в последних скобках формулы (4)) невелика и составляет 0,87 °C.

При повышении осмолярности наружной среды (по сравнению с C_0) везикулы уменьшают свой объем. Если площадь мембраны при этом не изменяется, то везикулы становятся несферическими и, как нетрудно показать, выражение для T_k имеет вид

$$T_k = T_0 + \frac{2}{3} \cdot \frac{C_0 - C_n}{C_0 \Theta} - \frac{\bar{T}_k}{\Gamma\Theta} \left(1 + \frac{4\Gamma n}{3rRT_0 C_0} \right). \quad (5)$$

Сшивка решений (4) и (5) дает кривую с изломом в области C_0 . Наклон кривой в условиях гипотонии для одноламеллярной везикулы диаметром 2 мкм больше, чем в условиях гипертонии. Именно такой характер зависимости T_k от C_n был обнаружен нами экспериментально [1]. Используя термоупругие параметры лецитинового бислоя [8] ($\bar{T}_k = 3,5 \cdot 10^{-3}$ Н/м, $\Gamma = 139 \cdot 10^{-3}$ Н/м, $\Theta = 2,4 \cdot 10^{-3}$ °C⁻¹), находим, что для одноламеллярных

везикул диаметром 5 мкм T_k на $10,5^\circ\text{C}$ ниже начальной температуры. Аналогичная величина была получена нами экспериментально [11]. В целом оценка зависимости T_k от осмолярности внешней среды в рамках термоупругой модели удовлетворительно согласуется с экспериментальными закономерностями холодового шока фосфолипидных везикул из яичного лецитина. Удастся предсказать количественно критическую температуру начала лизиса везикул в изоосмотических условиях и качественно — влияние изменения осмолярности наружной среды на T_k .

Из вышесказанного следует, что наиболее существенными параметрами бислоя, определяющими его чувствительность к охлаждению, являются $\bar{T}_k$, Γ и Θ . Критическое натяжение бислоя в зоне фазового перехода должно уменьшаться за счет «дефектов» упаковки молекул липида в области межфазных границ [4, 9]. Эффективный модуль сжатия $\Gamma_{\text{эф}}$ (усредненный по всей площади) растет за счет вклада гель-фазы, а эффективный коэффициент

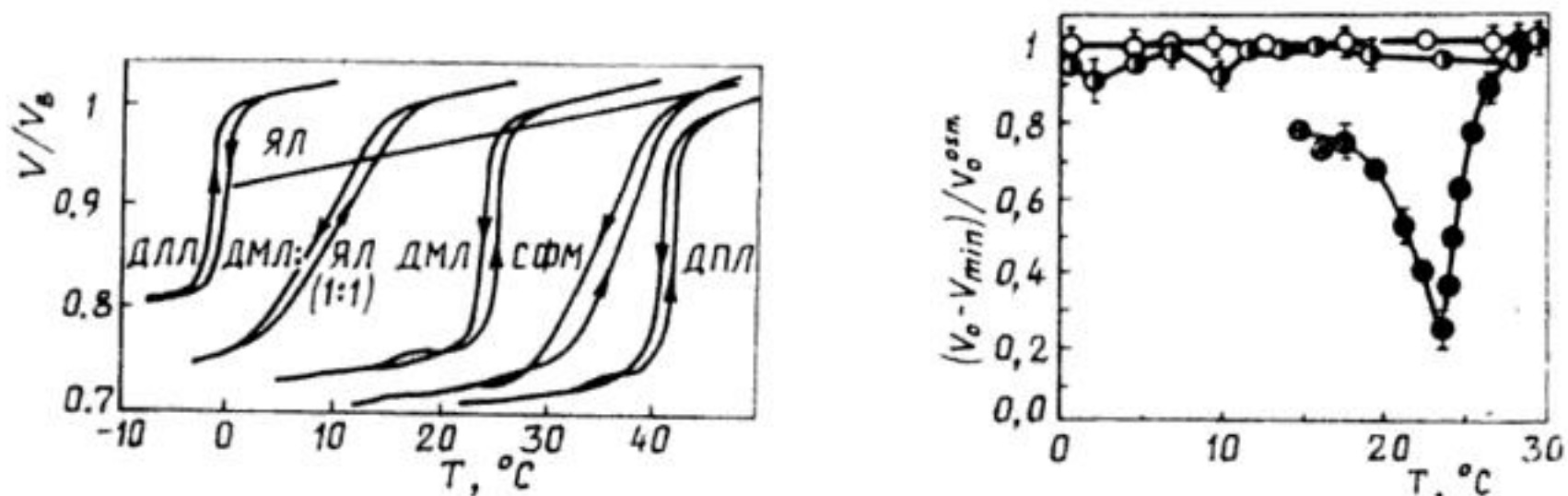


Рис. 2. Зависимость относительного объема фосфолипидных везикул от температуры. Липидный состав везикул указан аббревиатурами у кривых. Скорость изменения температуры $0,08 \div 0,1^\circ\text{C}/\text{с}$

Рис. 3. Зависимость амплитуды изотермического осмотического сжатия фосфолипидных везикул от температуры. Везикулы клеточных размеров были сформированы из ДМЛ (—●—), ЯЛ (—○—) и эквимольной смеси ЯЛ: ДМЛ (—■—) [5]

теплового расширения мембраны $\Theta_{\text{эф}}$ резко увеличивается благодаря существенному уменьшению эффективной площади молекулы липида при переходе из жидкокристаллической в гель-фазу. Измеренные нами параметры переходов для тонкостенных везикул, соизмеримых с размерами клеток, из синтетических и природных липидов представлены в таблице. Видно, что $\Theta_{\text{эф}}$ в зоне фазовых переходов на 1—2 порядка выше, чем Θ для яичного лецитина в области температур, когда бислой находится в жидкокристаллическом состоянии (рис. 2).

Известно, что проницаемость бислоя для малых молекул достигает максимума при температуре основного фазового перехода синтетических липидов [4]. Аналогичные данные получены нами для везикул из ДМЛ (рис. 3). Резкое уменьшение осмотической активности везикул при 24°C свидетельствует о возрастании проницаемости бислоя для ионов Na^+ и Cl^- при этой температуре, совпадающей с температурой фазового перехода данного липида (таблица). Однако в случае везикул из эквимольной смеси ДМЛ с ЯЛ, фазовый переход в которой характеризуется более низкой кооперативностью (таблица), заметного увеличения проницаемости мембран в температурной зоне фазового перехода не наблюдается (рис. 3). Гетерогенные смеси липидов, как известно, характеризуются более низкой кооперативностью фазовых переходов по сравнению с гомогенными липидами. Это проявляется в уширении температурной зоны переходов и сглаживании пиков, регистрируемых методом ДСК [7, 9]. Прослеживается корреляционная зависимость между кооперативностью перехода, величиной $\Theta_{\text{эф}}$ и уровнем изотермической проницаемости бислоя для малых молекул в температурной зоне фазового перехода. Можно предположить, что изотермическая проницаемость бислоя в зоне фазового перехода определяется не наличием статических «дефектов» упаковки моле-

кул липида в области межфазных границ, а образованием сквозных водных пор в жидкокристаллических доменах бислоя, имеющих динамическую природу и статистически устойчивых. Поры могут порождаться взаимодействием динамических локальных флуктуаций параметра порядка, имеющих волновую природу. Известно, что в гетерогенных смесях липидов ширина межфазных границ увеличивается, а амплитуда флуктуаций параметра порядка уменьшается [7]. В этих условиях затухают и

Параметры фазовых переходов, полученные методом малоуглового светорассеяния

Параметры перехода	Режим	Липидный состав везикул				
		ДПЛ ($\varnothing = 20$ мкм), $n=10$	ДМЛ ($\varnothing = 10$ мкм), $n=11$	ДЛЛ ($\varnothing = 5$ мкм), $n=6$	СФМ ($\varnothing = 30$ мкм), $n=11$	ДМЛ:ЯЛ ($\varnothing = 20$ мкм), $n=6$
T_n , °C	Нагрев	41,8±0,6	23,6±0,4	-2,0±0,1	30,5±0,9	4,5±1,8
	Охлаждение	40,4±0,3	22,7±0,7	-1,8±0,1	28,6±0,4	3,9±0,7
T_v , °C	Нагрев	43,7±1,3	25,7±0,2	-0,8±0,2	41,4±0,8	16,2±0,5
	Охлаждение	42,8±0,7	25,1±0,6	-0,4±0,1	41,0±0,9	15,6±0,5
$T_{кр}$, °C	Нагрев	42,7±0,9	24,7±0,3	-1,4±0,1	35,9±0,5	10,3±0,3
	Охлаждение	41,6±0,5	23,9±0,6	-1,1±0,1	34,8±0,5	9,9±0,3
$\frac{V_v - V_n}{V_v}$, %	Нагрев	24,1±3,2	22,3±3,4	21,1±1,9	23,5±1,7	22,2±0,7
	Охлаждение	24,6±2,6	21,6±2,8	19,1±2,2	27,0±0,2	19,5±1,3
$\theta_{эф} \cdot 10^3$, °C ⁻¹	Нагрев	80,5±20,0	70,9±8,1	108,5±31,9	14,4±1,2	12,5±1,3
	Охлаждение	65,6±11,8	62,6±8,5	90,7±8,5	14,4±1,3	11,0±1,3

Примечания. T_n и T_v — температуры соответственно нижней и верхней границ фазового перехода (определялись как точки пересечения касательных к пологим и крутой частям S-образной кривой зависимости светопропускания суспензии от температуры), а $T_{кр}$ — середина температурной зоны перехода. Скорость нагрева и охлаждения равна 0,08 ÷ 0,1 °C/с. $P < 0,05$.

функции отклика, в частности, уменьшается изотермическая проницаемость бислоя для малых молекул.

Однако $\theta_{эф}$ для гетерогенных смесей липидов, в частности для эквимолярной смеси ДМЛ:ЯЛ (таблица), в области фазового перехода могут быть в несколько раз выше, чем для бислоя в жидкокристаллическом состоянии. Естественно предполагать, что повреждение гетерогенных по составу липидных мембран, в том числе и биологических, будет гораздо сильнее выражено при охлаждении, чем при нагреве в температурной зоне фазовых переходов липидов. Действительно, нами обнаружено, что потеря макромолекул, включенных в везикулы из сфингомиелина и дипальмитоиллецитина (измеряли выход фиколла-400, данные не представлены) наблюдается при охлаждении, но не при нагреве, в температурной зоне фазового перехода соответственно для каждого липида. Эти данные подтверждают термоупругую природу нарушения барьерной функции мембран для макромолекул при изменении температуры в зоне фазового перехода липида.

Термоупругий механизм нарушения барьерной функции мембран будет доминировать, по-видимому, и при изменении температуры в зоне фазовых переходов гетерогенных по липидному составу биологических мембран. Повреждение при этом будет развиваться в фазе охлаждения и зависеть от целого ряда химических, механических и морфологических факторов, таких как структура мембраны, наличие упругих опорных элементов (цитоскелета, клеточной стенки и т. п.), форма клетки, устойчивость систем активной адаптации к изменяющимся условиям наружной и внутренней среды, механохимические параметры компонентов мембраны и цитозоля.

Таким образом, термоупругие свойства мембран фосфолипидных везикул играют важную роль в процессах нарушения барьерной функции бислоя при снижении температуры. Вклад термоупругих эффектов в криоповреждение биологического материала является актуальной задачей дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дегтярев А. В., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Холодовый шок фосфолипидных везикул. Влияние охлаждения на барьерные свойства // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 20—26.
2. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. — М.: Мир, 1982. — 304 с.
3. Финеан Д., Коалин Р., Мичелл Р. Мембраны и их функции в клетке. — М: Мир, 1977. — 200 с.
4. Blok M. C., Neut-Kok B. C. M., Van-Deenen L. L. M., DeGier J. The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes // Biochim. et biophys. acta. — 1975. — 406, N2. — P. 187—196.
5. Boroske E., Elwenspoek M., Helfrich W. Osmotic shrinkage of giant egg—lecithin vesicles / Biophys. J. — 1981. — 34, N 1. — P. 95—109.
6. Jain M. K. Nonrandom lateral organization in bilayers and biomembranes // Membrane Fluidity in Biology. — New York: Acad. Press, 1983. — P. 1—39.
7. Jänig F. Critical effects from lipid—protein interaction in membranes. II. Interpretation of experimental results // Biophys. J. — 1981. — 36, N2. — P. 347—359.
8. Kwok R., Evans E. Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles // Ibid. — 1981. — 35, N3. — P. 637—652.
9. Lee A. G. Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions // Biochim. et biophys. acta. — 1977. — 472, N2. — P. 237—281.
10. McGrath J. J. Effect of thermoelastic stress on thermal shock and freezing response of cell-size unilamellar liposomes // Cryobiology. — 1984. — 24, N6. — P. 696—697.
11. Yoshikawa W., Akutsu H., Kyogoku Y. Light-scattering properties of osmotically active liposomes // Biochim. et biophys. acta. — 1983. — 735, N3 — P. 397—406.

Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 04.02.88

A. V. DEGTYAREV, V. A. BONDARENKO

COLD SHOCK OF PHOSPHOLIPID VESICLES. THE THERMOELASTIC MECHANISM OF IMPAIRMENT OF THE MEMBRANE BARRIER FUNCTION

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

The effect of osmolality of the external medium on cold shock of phospholipid molecules was estimated in the framework of mechanochemical model. Calculated values for the critical temperature at which vesicle lysis is initiated by cold shock and its dependence on the transmembrane osmotic gradient correlate well with the experimental data. The effective values of the bilayer thermal extension coefficient (θ_{ef}) in the phase transition range for synthetic and natural lipids, namely dipalmytoil lecithin, dimiristoil lecithin, dilauroil lecithin, bovine brain sphingomyelin, yolk lecithin — dimirystoil lecithin mixtures (1 : 1 mol/mol) were measured by the method of small angle light scattering. The obtained θ_{ef} values appeared to be one or two orders higher than those representative for bilayers in the liquid-crystalline state.

УДК 612.359:615.832.9

А. С. Капрельяни

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ АЛЬТЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ В КРИОХИРУРГИИ

С помощью методов электронной микроскопии, замораживания—замещения, стереометрии и электронно-микроскопической цитохимии (определение кислой фосфатазы, АТФазы) исследованы ультраструктурно-метаболические характеристики печени при локальном замораживании. Описаны закономерности альтерации ультраструктуры клеток печени при охлаждении до -10 , -30 , -180 °C.

Трудности прогнозирования эффекта локального действия низких температур в криохирургии во многом определяются отсутствием достаточной информации о процессах, происходящих в тканях при криовоздействии [2, 12], а также использованием различных по своей природе объектов, технических средств и методов воздействия.

В настоящей работе нами исследованы ультраструктурные особенности повреждения ткани печени при стандартизированных и дозированных криовоздействиях. Для этого нами разработаны специальные технические сред-

ства [6, 7, 20], с помощью которых клетки печени охлаждались до -10 , -30 , -180 °C. Анализ ультраструктуры ткани печени проводили с помощью методов макро-микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии (методы ультратонких срезов и замораживания—замещения), электронно-микроскопической цитохимии (определение кислой фосфатазы, АТФазы) и морфометрии [4, 5, 6, 7].

При замораживании печени до -10 °C обнаружено повреждение отдельных внутриклеточных структур в 47 % гепатоцитов сразу после охлаждения. Наблюдается расширение цистерн ЭПР, их везикуляция. В цитоплазме гепатоцитов встречаются небольшие участки с просветленной гиалоплазмой, а также вакуоли с различным содержимым. Отмечаются разрушения некоторых митохондрий и плазматической мембраны в апикальной части гепатоцитов.

Охлаждение печени до -30 °C приводит к более выраженным изменениям ультраструктуры гепатоцитов [3]. При этом наряду с усилением указанных выше изменений дополнительно отмечается некоторое увеличение ядерных пор и повреждение ядерной мембраны. Этот температурный

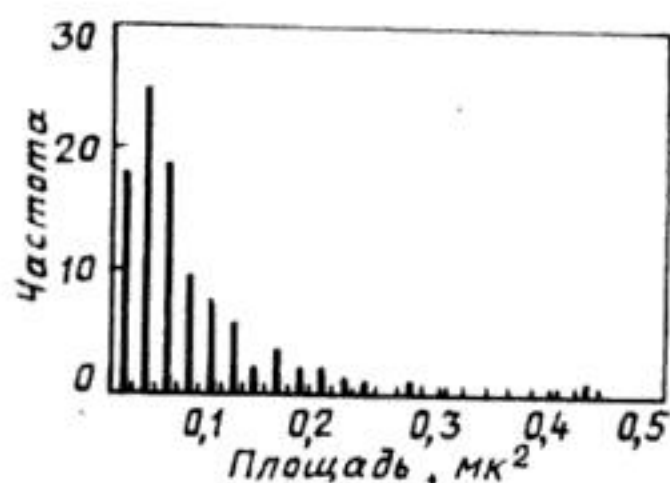


Рис. 1. Гистограмма распределения значений площадей кристаллов льда в гепатоцитах в замороженном состоянии (-180 °C)

диапазон ($-10 \div -30$ °C) представляет интерес, так как здесь происходит начало и завершение процессов кристаллизации и формирования твердой фазы. На примере клеток асцитной карциномы Эрлиха нами также было выявлено, что основные повреждения ультраструктурных элементов происходят при охлаждении до температуры -30 °C.

При более глубоком охлаждении печени (-180 °C) в гепатоцитах были обнаружены пикнотические изменения ядра, изменение его формы, нарушение целостности мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума, вакуолизация и локальное просветление цитоплазмы [19].

Для выяснения вклада кристаллов льда в развитие деструктивных изменений органоидов клетки проведено изучение их локализации в ткани печени, замороженной до -10 и -30 °C с помощью метода замораживания—замещения и морфометрии, выполненной на разработанных установках [4, 6, 20] и приборе МОП-видеоплан (фирма «Райхерт», Австрия). Обнаружено, что в условиях охлаждения до -10 °C в ткани образуются достаточно большие кристаллы льда округлой формы, имеющие максимальный линейный размер 12,71 мк и площадь 134,42 мк². Замораживание до -30 °C вызывает образование более мелких кристаллов льда округлой формы, локализующихся в цитоплазме и ядре гепатоцитов. Средние максимальный линейный размер кристаллов соответствуют значению 1,34 мк и площади 1,32 мк². Глубокое замораживание (-180 °C) сопровождается образованием мелких кристаллов льда, расположенных в различных участках клетки со средним значением диаметра 0,3 мк и площади 0,07 мк² (рис. 1). При этом отмечается сильная деформация органоидов (сжатие митохондрий) и ядер клеток, которые имеют ячеистый вид (рис. 2). Полученные результаты согласуются с данными Рубински [21], который исследовал характер кристаллизации в печени с помощью метода низкотемпературной сканирующей электронной микроскопии. В то же время обращает на себя внимание обнаруженный тонкий поверхностный участок печени, расположенный под аппликатором с очень маленькими кристаллами льда. При этом ультраструктура гепатоцитов изменена незначительно (рис. 3).

С целью выяснения возможных первичных механизмов повреждения клеточных элементов ткани печени нами также исследованы структурные характеристики лизосом при охлаждении до -30 , -70 , -140 , -196 °C. Было выявлено, что наибольшие изменения структуры этих органелл про-

исходят на этапе охлаждения до -30°C с последующим усилением повреждений при глубоком охлаждении до -196°C . Проведенный биохимический анализ активности кислых гидролаз лизосом печени подтвердил, что при -30°C в надосадочной жидкости определяется большое количество активных гидролаз (РНКаза, ДНКаза, кислая фосфатаза) [9].

Проведено исследование локализации и активности кислой фосфатазы в клетках печени с помощью метода электронно-микроскопической цитохимии. Анализ замороженного до -30°C участка ткани печени показал, что отложение электронно-плотного продукта цитохимической реакции наблюдалось в основном в лизосомах и было увеличено по сравнению с контрольными образцами.

При проведении электронно-цитохимического анализа Mg^{2+} -активируемой АТФазы в клетках печени при замораживании до -30 и -196°C было обнаружено, что в обоих случаях отложение мелкогранулярного продукта реакции происходит в митохондриях, имеющих измененную структуру, а также в цитоплазме гепатоцитов. Локализация фермента также свя-

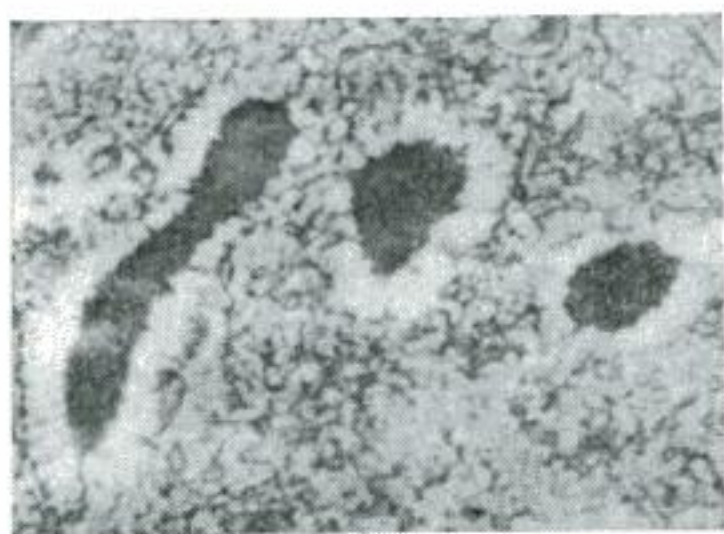


Рис. 2. Локализация кристаллов льда в гепатоците при замораживании до -180°C . Метод замораживания — замещения. Митохондрии деформированы и уменьшены в размерах

Рис. 3. Поверхностный участок быстро замороженной до -180°C печени. Хорошо сохранившийся желчный капилляр с участком цитоплазмы двух гепатоцитов

зана с плазматической мембраной клеток, и после отогрева наблюдается увеличение специфического продукта реакции в различных ее участках [8]. Обращает на себя внимание отложение мелких гранул продукта цитохимической реакции на мембранах поврежденных эндотелиальных клеток синусоидов.

Таким образом, после замораживания наблюдается повышение активности и перераспределение локализации АТФазы в клетках печени. Механизм, связанный с повышением активности АТФаз после замораживания — отогрева биообъектов, достаточно хорошо описан [1]. Факт делокализации АТФ в мембранах после замораживания свидетельствует о возможности гомогенизации липидного бислоя мембран клеток и аномального перераспределения белка-переносчика [11]. Полученные результаты, касающиеся активации лизосомальных гидролаз, согласуются с данными литературы о вкладе первичного повреждения лизосомального аппарата и митохондрий в развитие деструктивных изменений клеток при замораживании [10].

Как видно, в температурной зоне охлаждения $-10 \div -30^{\circ}\text{C}$ происходят основные повреждения ультраструктур клеток различной степени выраженности. При этом выявляются первичные повреждения как в цитоплазматическом компартменте ткани (изменения органоидов гепатоцитов) так и в микрососудистой части (изменения эндотелиальных клеток).

Анализируя динамику изменений микроциркуляторного русла печени во всех случаях после замораживания и отогрева, мы обнаружили скопление форменных элементов крови в синусоидах, некоторое расширение их просвета в зоне криовоздействия [13]. По-видимому, при криовоздействии на состояние тканей действует двойной механизм: стаз крови в микрососудах и связанная с этим ишемия тканей.

Таким образом, при анализе полученных собственных результатов, а также данных литературы [10, 12, 15—17, 19] имеется возможность сформулировать основные представления о характере локализации кристаллов льда в ткани и связи их с органоидами клеток в зависимости от глубины охлаждения. Учитывая то, что при аппликационном способе криовоздействия всегда возникает значительный градиент температуры, можно описать реальную ситуацию замораживания ткани печени в виде модели с дискретной многоуровневой системой. Поверхностный слой, «первый уровень», на который накладывается охлажденный (-180°C) аппликатор, замораживается до этой температуры с максимально большой скоростью. Согласно представлениям, сформулированным на основе электронно-микроскопических исследований, при сверхбыстром замораживании клеток и тканей образуются кристаллы льда незначительных размеров [14, 18]. Этот тонкий слой ткани практически приближается к витрифицированному состоянию. Вот почему этот тканевой уровень может сохранять характеристики даже тонкой структуры без существенных повреждений. Ниже располагается «второй уровень» ткани, который охлаждается до низких температур достаточно быстро, однако сопровождается образованием внутриклеточных и внеклеточных кристаллов льда, которые вызывают изменения клеточных элементов. «Третий уровень», расположенный ниже, представляет собой зону, которая охлаждается до несколько более высоких отрицательных температур и с меньшей скоростью. Значение этой скорости может соответствовать оптимальному и вызывать минимальные повреждения в клетках и их органоидах. Однако слой ткани, расположенный еще ниже («четвертый уровень»), будет охлаждаться медленно до субнулевой температуры. Такие условия охлаждения не способствуют сохранению структуры клеток в связи с образованием больших внеклеточных кристаллов льда. «Пятый уровень» представляет собой пограничную область, в которой происходит очень медленное охлаждение до субнулевых или околонулевых температур, которая расположена в непосредственной близости от зоны с измененными теплофизическими характеристиками («шестой уровень»).

Описанные выше экспериментальные данные и теоретические посылки могут быть использованы при интерпретации результатов реакции тканей при криохирургических воздействиях и описании закономерностей патоморфогенеза.

Действительно, проведенный электронно-микроскопический анализ динамики изменения структурных элементов печени показал, что уже спустя 60 мин после замораживания и отогрева альтерация клеточных элементов в целом усиливается. Согласно нашим и литературным данным [15, 17], формирование некроза происходит через несколько суток. В этот период в зону некроза входят все описанные пять уровней, несмотря на то, что поверхностный слой и зона, охлаждаемая с оптимальной скоростью, могут в отдельности сохранять структурные компоненты с минимальными изменениями. Однако в деструктивные процессы вовлекаются все структурно связанные уровни объекта, что объясняется высокой степенью интеграции тканевых элементов. В то же время нельзя полностью исключить наличие в этих участках отдельных клеток, находящихся в активном структурно-метаболическом состоянии. Линейные размеры зоны и глубина во всех трех случаях (-10 , -30 и -180°C) различны и достигают наименьших значений некроза при повышении температуры охлаждения. Анализ дальнейшего развития морфологических изменений показал, что направленность восстановительных процессов идет от периферии зоны замораживания. При этом на поверхности печени уменьшаются диаметр поврежденного участка и радиус полусферы в глубине ткани. Обнаружена активизация клеток Ито, вероятно, играющих важную роль в реализации ответных реакций ткани печени.

Наблюдение состояния структуры ткани печени через 1 мес. свидетельствует о наличии сформированных рубцовых образований в зоне криовоз-

действия, состоящих из элементов волокнистой соединительной ткани, гранулоцитов и клеток фибробластического типа. В более поздние сроки происходит полное замещение соединительных элементов паренхиматозными клетками.

Таким образом, полученные результаты позволяют уточнить теоретические представления о состоянии субклеточных элементов ткани при действии дозированного локального охлаждения печени и дать морфологическую характеристику развития альтеративных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — С. 105—115.
2. Грищенко В. И. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл. междунаrod. конф. — Харьков: Б. и., 1988. — С. 4—5.
3. Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Сандомирский Б. и. Ультраструктура гепатоцитов после дозированного локального охлаждения печени // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1985. — № 10. — С. 496—499.
4. Капрельянц А. С., Панков Е. Я. Этапно-факторный подход в анализе криоповреждений ультраструктуры клетки // Сб. работ Ин-та цитологии АН УССР. — Л.: Б. и., 1977. — Вып. 17. — С. 137.
5. Капрельянц А. С. Системный подход к изучению влияния локального охлаждения на морфогенез ткани печени // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов: Всесоюз. конф. — Харьков: Б. и., 1984. — Т. 11. — С. 32.
6. Капрельянц А. С., Слободской Р. Ж., Панков Е. Я. и др. Новая система для компьютерной стереометрии тканевых, клеточных элементов // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 48—50.
7. Капрельянц А. С., Ткаченко С. И., Стрелец Л. И. Криоинструмент для проведения исследовательских работ // Медико-технические, фармакологические и научные аспекты медицинской профилактики диспансеризации и реабилитации: Тез. докл. обл. конф. — Харьков: Б. и., 1983. — С. 233—234.
8. Капрельянц А. С. Электронно-цитохимическое исследование АТФазной активности клеток печени при охлаждении // Криобиология и криомедицина. — 1983. — Вып. 11. — С. 28—31.
9. Луговой В. И., Кравченко Л. П., Капрельянц А. С. Влияние глубокого замораживания на изолированные лизосомы печени крыс // Цитология. — 1977. — 19, № 11. — С. 1288—1291.
10. Мак-Ген Л. Е., Янг Х., Уолтерсон М. Дж. Повреждение замораживанием клеток млекопитающих // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл. междунаrod. конф. — Харьков: Б. и., 1988. — С. 78—79.
11. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования. — Киев: Наук. думка, 1984. — С. 90—102.
12. Практическая криомедицина / Под ред. В. И. Грищенко, Б. П. Сандомирского. — Киев: Здоров'я, 1987. — 245 с.
13. Сандомирський Б. П., Капрельянц О. С., Слєта І. В. та ін. Мікрогемоциркуляція в печінці щурів при локальному охолодженні // XII З'їзд Українського фізіологічного товариства ім. І. П. Павлова: Тез. доп. — Львів: Б. в., — 1986. — С. 357.
14. Allison D. P., Daw C. S., Rorvic M. C. The construction and operation of a simple inexpensive slam freezing device for electron microscopy // J. Microsc. — 1987. — 147, N 1. — P. 103—108.
15. Cooper J. S. Cryosurgery for cancer // Fed. Proc. — 1965. — 24, N 2. — P. 237—240.
16. Eichler F., Lenz M. Experimental measurement and theoretical calculations on muscle and liver tissue during cryosurgery. II. A theory on freezing of tissue // Cryobiology. — 1976. — 13, N 2. — P. 185—190.
17. Helpap B., Grouls V. Tissue reparation of the liver after thermo- and cryosurgical lesions: Comparative cell analytical investigation // Ibid. — 1979. — 16, N 5. — P. 473—480.
18. Franks F. Biological freezing and cryofixation // J. Microsc. — 1977. — 111, N1. — P. 3.
19. Kaprelyants A. S., Martchenko L. N., Sandomirsky B. P. Liver ultrastructure: the effect of low temperatures // Proc. XI Int. Congress on Electron Microscopy. — Kyoto, 1986. — Vol. 3. — P. 2901—2902.
20. Kaprelyants A. S. Realization of freezing—substitution method for visualization of ice crystals during liver cooling // Proc. of the 8th European Congress on Electron Microscopy. — Budapest, 1984. — P. 1807—1808.
21. Rubinsky B., Lee C. S., Bastasky S., Hayes F. I. The mechanism of freezing in biological tissue: the liver // Cryo-Lett. — 1987. — 8, N 6. — P. 370—382.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 10.06.88

A. S. KAPRELYANTS

ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF LIVER ALTERATION IN CRYOSURGERY

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

The ultrastructural and metabolic characteristics of liver on local freezing have been studied by means of electron microscopic, freeze—substitution, stereometric and electron microscopic cytochemical (acid phosphatase, ATPase) methods. The patterns of liver cell ultrastructure alteration resulted from cooling down to -10 , -30 , and -180 °C are described.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 612.35:615.832.98+472:612.12

*И. В. Ступин, Н. П. Микаелян, Б. П. Сандомирский,
И. В. Слета, Н. И. Коцько*

ВЛИЯНИЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ ПЛАЗМЕННЫМ ПОТОКОМ И КРИОВОЗДЕЙСТВИЕМ НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

При сравнительной оценке криовоздействия, резекции печени плазменным потоком и сочетанного использования этих двух методов установлено, что метаболические изменения в первую неделю после различных вариантов воздействия могут быть связаны с адаптивно-компенсаторной реакцией организма на различные повреждающие воздействия. Метаболические нарушения, обнаруженные в более поздние сроки наблюдения после раздельного применения изучаемых хирургических методов лечения, при сочетанном их применении нивелируются.

Атипическая резекция печени по поводу опухолевых и паразитарных заболеваний сопровождается обширной кровопотерей, часто влияющей на исход вмешательства. Применение нового хирургического инструмента, плазменного потока, позволяет значительно уменьшить объем кровопотери. Однако при обширных резекциях, когда пересекаются крупные сосудистые отводы, кровопотеря неизбежна в случаях, если печень полностью не выключается из кровообращения [3,5]. Кроме того, раскаленный поток газа плазменной струи способен вызывать эмболию пересекаемых сосудов. Как показали наши исследования, плазменная струя с успехом может использоваться и при рассечении замороженных тканей. При этом соседние участки тканей практически не меняют своей температуры и, следовательно, их размораживания не происходит. Низкие температуры также оказывают гемостатическое действие [2, 4, 7, 8]. После рассечения замороженных участков тканей имеется возможность по мере их оттаивания проводить коагуляцию плазменным потоком или лигировать обычными методами.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния резекции печени плазменным потоком и локального применения глубокого холода на некоторые биохимические показатели сыворотки крови, характеризующие функциональное состояние печени.

Работа проведена на 21 кролике породы шиншилла, массой 3—3,5 кг. Под внутривенным нембуталовым наркозом в 3-х сериях экспериментов (по 7 кроликов в каждой серии) проведена сравнительная оценка криовоздействия, резекции печени плазменным потоком, сочетанного использования этих двух методов воздействия на печень по данным биохимических показателей сыворотки крови. Во всех случаях объем выключаемой части органа составлял 10 % от массы печени. Замораживание ткани печени проводилось методом аппликации на всю глубину до температуры -30 °C.

Через 1, 3, 7, 14 и 21 сут после операции в сыворотке крови животных определяли следующие биохимические показатели: содержание общего количества белка и липидов, концентрацию глюкозы, активность щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинфосфокиназы (КФК), а также накопление малонового диальдегида (МДА), характеризующего активность перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Результаты исследования, представленные в табл. 1, 2, 3, свидетельствуют о том, что резекция печени плазменным потоком и криовоздействие

Таблица 1

Изменение содержания некоторых метаболитов после резекции печени плазменным потоком

Срок исследования, сут	Белок, г/л ($M \pm m$)	ЩФ, Е/Л ($M \pm m$)	Общие липиды, г/л ($m \pm M$)	Глюкоза, ммоль/л ($M \pm m$)	МДА, ммоль/л ($M \pm m$)	КФК, Е/Л ($M \pm m$)
Фон	77,9 $\pm$ 2,6	105,3 $\pm$ 16	4,0 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 0,46	3513 $\pm$ 114,7	27,0 $\pm$ 3,0
1	66,3 $\pm$ 5,5	103,5 $\pm$ 15	3,8 $\pm$ 0,7	1,58 $\pm$ 3*	7247 $\pm$ 286*	76,0 $\pm$ 12*
3	48 $\pm$ 7,6*	57,1 $\pm$ 4,1*	3,6 $\pm$ 1,8	3,0 $\pm$ 0,7	4430 $\pm$ 850	47,7 $\pm$ 4,5*
7	68 $\pm$ 5	97,5 $\pm$ 5,5	3,96 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,5*	6506 $\pm$ 816*	24,0 $\pm$ 5,3
14	68 $\pm$ 4,1*	89,2 $\pm$ 22	4,2 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,09*	5871 $\pm$ 113,7	20,0 $\pm$ 1,3
21	78,5 $\pm$ 2,1	95 $\pm$ 26,9	4,0 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,2*	1185 $\pm$ 311*	18,3 $\pm$ 2,1*
30	74,8 $\pm$ 16,1	95 $\pm$ 18	3,88 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,05*	6614 $\pm$ 132,6*	—

Примечание. Во всех таблицах звездочкой отмечены статистически достоверные цифры по сравнению с исходным уровнем.

Таблица 2

Изменение содержания некоторых метаболитов после криовоздействия

Срок исследования, сут	Белок, г/л ($M \pm m$)	ЩФ, Е/Л ($M \pm m$)	Общие липиды, г/л ($M \pm m$)	Глюкоза, ммоль/л ($M \pm m$)	ДМА, ммоль/л ($M \pm m$)	КФК, Е/Л ($M \pm m$)
Фон	77,9 $\pm$ 2,6	105,3 $\pm$ 16	4,0 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 0,46	3513 $\pm$ 114,7	27,0 $\pm$ 3,0
1	70,3 $\pm$ 0,22*	126,9 $\pm$ 9	3,8 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,4	2532 $\pm$ 790	56,1 $\pm$ 5,8*
3	54 $\pm$ 5,3*	91,3 $\pm$ 11*	3,6 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 1,7	2885 $\pm$ 108	47,1 $\pm$ 2,7*
7	69 $\pm$ 3*	57,8 $\pm$ 9*	4,1 $\pm$ 1	5,3 $\pm$ 0,5*	1751 $\pm$ 360	21,3 $\pm$ 3,8
14	71 $\pm$ 2*	60 $\pm$ 6,5*	3,7 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 0,5	1537 $\pm$ 316	22,4 $\pm$ 7
21	52 $\pm$ 6,1*	71,2 $\pm$ 4,2*	3,9 $\pm$ 0,8	4,6 $\pm$ 0,8	—	23,0 $\pm$ 5
30	58 $\pm$ 0,9	80 $\pm$ 11	3 $\pm$ 0,9	5 $\pm$ 1,2	—	—

Таблица 3

Изменение содержания некоторых метаболитов после резекции печени плазменным потоком с замораживанием

Срок исследования, сут	Белок, г/л ($M \pm m$)	ЩФ, Е/Л ($M \pm m$)	Общие липиды, г/л ($M \pm m$)	Глюкоза, ммоль/л ($M \pm m$)	МДА, ммоль/л ($M \pm m$)	КФК, Е/Л ($M \pm m$)
Фон	77,9 $\pm$ 2,6	105,3 $\pm$ 16	4,0 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,46	3513 $\pm$ 114,7	27,0 $\pm$ 3,0
1	69,0 $\pm$ 0,4*	151,5 $\pm$ 35*	2,8 $\pm$ 0,3*	3,97 $\pm$ 0,9	3112 $\pm$ 743,6	29,8 $\pm$ 7,8
3	70 $\pm$ 0,5*	82 $\pm$ 17,4*	5,6 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 0,8	2145 $\pm$ 730*	28,1 $\pm$ 7,6
7	78 $\pm$ 0,4	55 $\pm$ 5,5*	4,4 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,5	1560 $\pm$ 50*	24 $\pm$ 5,4
14	73 $\pm$ 3	46,6 $\pm$ 4,7*	4,7 $\pm$ 0,2	5,55 $\pm$ 0,4*	1644 $\pm$ 130*	26,6 $\pm$ 0,4
21	76 $\pm$ 4,2	28,3 $\pm$ 4,2*	4,4 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,4	—	—
30	81 $\pm$ 5,3	60,2 $\pm$ 3,8*	5,2 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,4*	—	—

не оказывали влияния на содержание липидов в сыворотке крови, в то время как сочетанное использование этих двух факторов сопровождалось гиперлипидемией даже через 30 дней после операции ($p < 0,01$, табл. 3). Резекция печени плазменным потоком без замораживания вызывала некоторую гипогликемию, а криовоздействие способствовало развитию гипергликемической реакции, особенно значительной через 2 недели после операции, когда концентрация глюкозы возрастала на 45 % ($p < 0,001$, табл. 3). Содержание общего белка в сыворотке крови после резекции плазменным потоком достоверно снижалось, затем к 14 сут, достигая исходного уровня, стабилизировалось. При криовоздействии количество белка во все сроки наблюдения имело тенденцию преимущественно к снижению ($p < 0,05$, табл. 2). При сочетанном воздействии замораживания и резекции содержание белка оставалось в пределах физиологических норм.

Активность щелочной фосфатазы, характеризующей состояние паренхимы печени, после резекции плазменным потоком снижалась в первую неделю после операции, а затем возвращалась к норме, оставаясь без изменений в течение всего периода наблюдения. Локальное воздействие холодом или в сочетании с резекцией печени, как видно из табл. 2 и 3, после кратковременного повышения активности ЩФ вызывало ее снижение, достигающее к третьей неделе наблюдения ($28,3 \pm 4,25$) Е/Л при исходном ($105,3 \pm 12,5$) Е/Л, $p < 0,001$.

В изменении активности КФК установлена следующая закономерность: при плазменной резекции печени, также как и после криовоздействия, кратковременная гиперферментемия переходила в гипоферментемию, сохранившуюся на значениях ниже нормы в течение второй половины срока исследования. Проводимое холодное воздействие в сочетании с резекцией печени не приводило к изменению активности КФК (табл. 3).

После резекции печени плазменным потоком уровень МДА, одного из конечных продуктов ПОЛ, возрастал, статистически достоверное снижение концентрации МДА, как видно из табл. 1, наблюдалось лишь на 21 сут после операции (количество МДА снижалось примерно в 4 раза по сравнению с исходным уровнем, $p < 0,01$). При применении только криовоздействия, также как и в сочетании с резекцией печени, происходило снижение активности ПОЛ во все сроки наблюдения.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что метаболические изменения, наблюдаемые в сыворотке крови в первую неделю после различных вариантов воздействия, могут быть результатом адаптивно-компенсаторных реакций организма на различные повреждающие воздействия, в которых сочетаются влияния разных факторов, сопутствующих оперативному вмешательству. Причем в основе гиперферментемии может лежать выход ферментов в кровь из различных органов, прямо или косвенно вовлекаемых в процесс, и из мышц, травмируемых во время операции. Об этом свидетельствуют данные литературы, констатирующие факт увеличения активности ряда ферментов (альдолазы, трансаминаз, щелочной фосфатазы) в сыворотке крови животных в первые дни после обычной резекции печени и нормализации их активности к 10—14-му дню [1,6].

Метаболические нарушения, обнаруженные в более поздние сроки наблюдения после отдельного применения изучаемых хирургических методов лечения (такие как гипогликемия, гипопротеинемия, увеличение концентрации МДА при плазменном воздействии, гипергликемия и гипопротеинемия при криовоздействии), при сочетанном применении этих факторов воздействия нивелируются. Сочетанное использование (плазменной) резекции печени после криодеструкции, судя по представленным данным, не сопровождается дополнительным усилением воспалительно-деструктивной реакции печеночной ткани на травму.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровков А. С., Блюгер А. Ф., Виноградов Г. Е. Активность ферментов как показатель функции печени // Методы исследования при хирургических заболеваниях печени. — М.: Медицина, 1973. — С. 169—179.
2. Криохирургия / Под ред. Э. И. Канделя — М.: Медицина, 1974. — 303 с.
3. Савельев В. С., Серых Л. А., Берснев А. С. и др. Перспективы использования плазменного скальпеля в хирургии // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. — 1986. — № 1. — С. 7—10.
4. Сандромирский Б. П., Коцько Н. И., Золочевская Л. И. Эффективность криовоздействия при резекции печени в эксперименте // Там же. — № 4. — С. 24—26.
5. Ступин И. В., Волкредов В. С., Берснев А. С., Сапелкина И. М. Экспериментальные испытания плазменного скальпеля для рассечения биологических тканей // Острые и хронические поражения холодом. Тромбоэмболия легочных артерий: Сб. науч. трудов. — М.: Б. и., 1982. — С. 171—172.
6. Шелегия Ш. Я., Цуцашвили Э. М. Изменение активности ферментов после резекции печени // Ферменты в лабораторной диагностике: Материалы I Всесоюз. съезда врачей-лаборантов. — М.: Б. и. — 1973. — С. 74—75.
7. Sahar W. G. Cryosurgery of malignant and benign tumors // Fed. Proc. — 1965. — 24, N 2. — 241—248.
8. Cooper G. S. Cryogenic surgery for cancer // Fed. Proc. — 1965. — 24, N 2. — P. 237—240.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков; 2-й МОЛГМИ

Поступила 21.01.87

I. V. STUPIN, N. P. MIKAELIAN, B. P. SANDOMIRSKY, I. V. SLETA,
N. I. KOTSKO

THE EFFECT OF PLASMA LANCET RESECTION AND CRYOAPPLICATION ON BIOCHEMICAL INDICES OF BLOOD SERUM

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov; 11 State Medical Institute of Moscow

The comparative evaluation of cryoapplication, plasma lancet resection and combined use of these treatments showed that metabolic changes observed in the first week after different treatments may result from the adaptive compensatory body response to damaging exposures. Metabolic changes revealed later due to these treatments were not observed after their combined use.

УДК 611.127:615.832.9:616—003.96

**А. Ф. Яковцова, Н. Н. Питенько, Т. В. Ганулич, В. С. Васюта,
В. Д. Марковский**

КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИОКАРДЕ ПРИ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Представлены результаты изучения 1- и 6-часового воздействия краниocereбральной гипотермии ($32 \div 30^\circ\text{C}$) на структуру миокарда крыс. Показано развитие компенсаторно-приспособительных изменений в миокарде в ответ на действие гипотермии, выражавшихся угнетением метаболизма в миокарде и переходом на более щадящий анаэробный путь обмена. Относительная стабильность структуры и функции при охлаждении есть результат сбалансированных процессов энергообразования, биосинтеза и функции миокардиальных клеток в условиях приспособления сердца к умеренной КЦГ.

Улучшение лечения больных инфарктом миокарда (ИМ) может быть достигнуто при разработке эффективных мероприятий по защите ишемизированного миокарда и ограничению зоны некроза. Активного воздействия на зону ишемии миокарда можно добиться созданием условий, способствующих повышенной устойчивости сердца к кислородному голоданию, в частности при снижении температуры тела с помощью краниocereбральной

ной гипотермии (КЦГ). В ряде работ указывается на кардиопротекторное действие гипотермии при остром ИМ в эксперименте и возможности применения ее в практике [2, 3, 4, 6, 7, 9, 10]. Однако до настоящего времени не решен вопрос об оптимальной температуре охлаждения, не разработаны рациональные режимы гипотермии, недостаточно изучено влияние КЦГ на структуру миокарда.

Целью настоящего исследования явилось изучение компенсаторно-приспособительных процессов в миокарде под действием КЦГ в среднем режиме ($32 \div 30^\circ\text{C}$ в течение 1 и 6 ч).

В настоящем сообщении приводятся изменения в миокарде 30 сердец белых крыс, возникшие при действии КЦГ. КЦГ проводилась на установке, разработанной в конструкторском бюро Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, в среднем режиме ($32 \div 30^\circ\text{C}$) в течение 1 и 6 ч. Миокард изучался в динамике от 1 ч до 3 сут после воздействия КЦГ.



Рис. 1. Миокард левого желудочка после 1-часового воздействия КЦГ: а — диффузное снижение реакции на общий белок. Реакция Даниелли. $\times 400$; б — неравномерное снижение реакции на сукцинатдегидрогеназу. Окраска по Нахласу. $\times 400$; в — разрыхление цитоплазмы эндотелия капилляра с большим количеством пиноцитозных пузырьков. $\times 15000$; г — очаговые повреждения кардиомиоцитов контрактурного характера вокруг расширенных полнокровных вен. Окраска по Ли. $\times 400$

Применен комплекс морфологических методов исследования: гематоксилин + эозин, пикрофуксин по ван Гизону; специальные гистологические методы для определения ранних стадий повреждения кардиомиоцитов (КМЦ): железный гематоксилин по Гейденгайну, Рего, основной фуксин по Ли; гистохимическое определение общего белка по Даниелли, гликогена по Шабадашу, гликозаминогликанов (ШИК + Хейл), РНК по Браше, ДНК по Фельгену; ряда ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), цитратдегидрогеназы (ЦДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф), НАД- и НАДФ-диафораз по Нахласу, щелочной фосфатазы по Гомори. Гистохимические изменения содержания ДНК и общего белка в миокарде контролировались биохимическими показателями скорости синтеза ДНК и белка в миокарде крыс по методу Каннелля (1970). Для изучения миофибриллярного аппарата и характеристики повреждений КМЦ были использованы поляризационная и фазово-контрастная микроскопия. В некоторых случаях проведено электронно-микроскопическое исследование. В лаборатории гипотермии Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР исследовались основные гемодинамические показатели и ЭКГ-контроль.

Изменения КМЦ через 1 ч после 1-часового воздействия КЦГ характеризовались снижением и потерей поперечной исчерченности, снижение манизотропии А-дисков и плотности Z-полос. Уменьшалась интенсивность реакций на общий белок (рис. 1, а), ДНК, гликоген, на ферменты окислительно-восстановительного ряда (рис. 1, б). Отмечено усиление реакции на ЛДГ. Электронно-микроскопически выявлялось просветление цитоплазмы, умеренная гетерогенность митохондрий и изменение формы ядра. Артерии в интерстиции миокарда спазмированы, вены его, особенно в перемизии, рас-

ширены, полнокровны. Отмечена повышенная проницаемость стенок вен, обладающих ШИК-положительной реакцией, фуксинофилией по Ли и повышением реакции на щелочную фосфатазу. Микроциркуляторное русло (МЦР) с неравномерным снижением тонуса. Стенки его хорошо выявляются ШИК-реакцией и железным гематоксилином, с повышенной реакцией на щелочную фосфатазу. Электронно-микроскопически отмечалось разрыхление цитоплазмы эндотелия капилляров с большим количеством пиноцитозных пузырьков, расположенных по краю, обращенному к базальной мембране (рис. 1, в). В строме миокарда обнаруживался умеренный стек, преимущественно вокруг расширенных вен, с накоплением в стенке их Хейл-положительных субстанций. Фуксиноррагический метод Ли и окраска железным гематоксилином выявляли очаговые повреждения единичных КМЦ контрактурного характера, локализующихся в центральных отделах миокарда левого желудочка вокруг расширенных полнокровных вен (рис. 1, г).

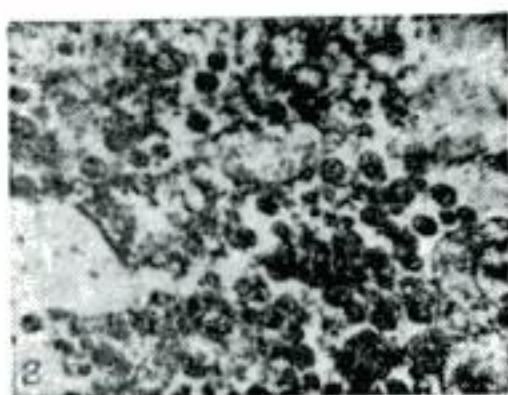
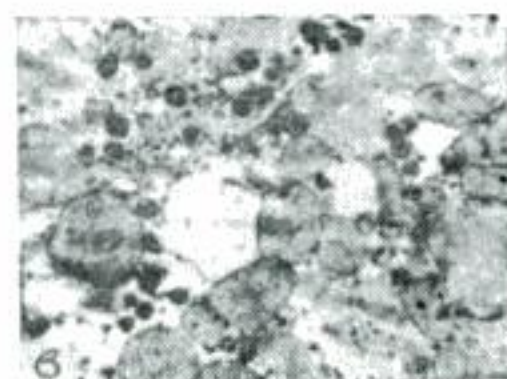
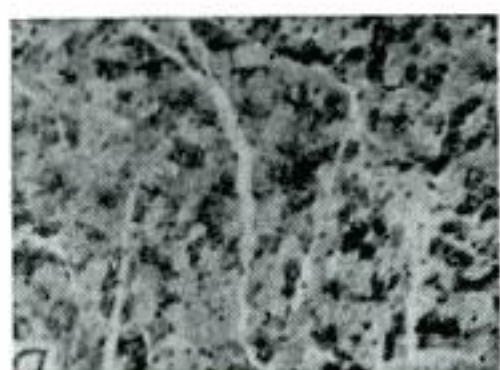


Рис. 2. Изменения кардиомиоцитов предсердий при 1-часовой КЦГ: а — очаговые контрактурные повреждения кардиомиоцитов. Окраска по Ли. $\times 400$; б — дистония капиллярного русла с выраженным периваскулярным отеком. $\times 15000$; в — предсердные гранулы в контроле. $\times 15000$; г — увеличение количества и плотности предсердных гранул при КЦГ. $\times 15000$

В зонах повреждения отмечалась усиленная реакция на общий белок и значительное снижение активности окислительно-восстановительных ферментов, однако полного их исчезновения не обнаруживалось. По литературным данным [1, 8], указанные контрактурные повреждения являются начальными стадиями изменений и носят обратимый характер (I стадия).

В субэндокардиальных отделах предсердий, особенно правого, обнаруживались одиночные очаговые повреждения КМЦ (рис. 2, а). Они характеризовались некоторым уменьшением количества и набуханием миофибрилл при фазово-контрастной микроскопии. Анизотропные свойства КМЦ соответствовали количеству сохранившихся миофибрилл. Ядра КМЦ гипохромные, набухшие. Поврежденные сегменты утолщены с увеличением диаметра в 2—2,5 раза и захватывали несколько саркомеров. Указанные повреждения относятся к миоцитоллизису [8]. Участки волокон с явлениями миоцитоллизиса окрашивались кислыми и основными красителями слабее, чем неповрежденные волокна. Зона миоцитоллизиса не обладала ШИК-положительными свойствами, не окрашивалась железным гематоксилином по Гейденгайну и основным фуксином по Ли. В зонах миоцитоллизиса также снижена реакция на общий белок, РНК, ДНК и окислительно-восстановительные ферменты. Электронно-микроскопически миоцитоллизис сочетался с дистонией капиллярного русла, замедлением кровотока и выраженным периваскулярным отеком (рис. 2, б).

Нами обнаружены специфические гранулы в предсердиях, ультраструктурная характеристика которых описана в литературе при ЭИМ [5]. Количество специфических предсердных гранул значительно увеличено. Они гетерогенны и разнятся между собой как по размерам, так и по степени электронной плотности (рис. 2, в, г).

Описанные очаговые изменения КМЦ в виде миоцитоллизиса относятся к ранним повреждениям и являются обратимыми. Спустя 6 ч после 1-часовой КЦГ отмечалось восстановление структуры КМЦ.

Морфологическое исследование сердца крыс после 6-часового воздействия КЦГ выявляло изменения, аналогичные таковым при 1-часовой КЦГ. Эти изменения были более распространенными и более глубокими, однако носили обратимый характер. Так, электронно-микроскопически в КМЦ отмечалась гетерогенность и набухание митохондрий, нечеткость контуров крист и частичное разрушение последних. Отмечено количественное, хотя и небольшое, увеличение описанных КМЦ, локализовавшихся в зонах с наибольшим замедлением кровотока вблизи расширенных интрамуральных вен. Указанные изменения сопровождались угнетением активности ферментов окислительно-восстановительного ряда и снижением реакции на гликоген, общий белок, РНК и ДНК. Биохимические показатели ДНК и белка свидетельствуют о резком угнетении скорости их синтеза в миокарде животных, причем наибольшее снижение скорости синтеза их обнаружено в левом желудочке и предсердии (таблица).

Скорость синтеза ДНК и белка в миокарде крыс при КЦГ (6 ч), имп/мин

Объект исследования	Предсердие		Желудочек		Межжелудочковая перегородка
	левое	правое	левый	правый	
Белок	440±31,6	810±22,8	310±70,1	550±60,1	640±100,0
ДНК	860±91,2	1101±121,4	650±91,6	996±140,5	1250±121,0

Примечание. В норме скорость синтеза в миокарде: ДНК — $950 \pm 14,5$ имп/мин·мг ДНК; белка — $3670 \pm 98,6$ имп/мин·мг белка; $P < 0,05$.

Изучение МЦР, включая ультраструктурный уровень, показало стабильное снижение тонуса капилляров и периваскулярный отек. Наибольшее снижение тонуса в капиллярах отмечено в зонах, где имелись очаговые изменения КМЦ. Эритроциты в этих сегментах капилляров теряли свои тинкториальные свойства. Стромальный отек был более выражен (в сравнении с предыдущей группой наблюдений) и распространялся на эндомизий. В КМЦ субэндокардиальных отделов предсердий электронно-микроскопически выявлен миоцитоллизис обратимого характера с выраженным внутриклеточным отеком. Количество специфических биологически активных гранул в описанных КМЦ высок. Они гетерогенны по оптической плотности и размерам, оттеснены за счет внутриклеточного отека далеко от ядра. Следует отметить довольно выраженный отек вокруг поврежденных клеток с разобщением последних. В этих же зонах предсердий отмечались наибольшие реологические изменения МЦР.

В течение первых суток после 6-часовой КЦГ продолжали обнаруживаться изменения КМЦ и МЦР, индуцированные холодным фактором, и только на вторые сутки отмечены признаки нормализации структуры миокарда, постепенное восстановление сосудистого тонуса, а затем и реологических свойств крови. Снижение концентрации и депонирования содержимого предсердных гранул прямо пропорционально восстановлению сосудистого русла в миокарде.

Таким образом, проведенное исследование показало, что КЦГ в среднем режиме ($32 \div 30^\circ\text{C}$ в течение 1 и 6 ч) приводит к возникновению обратимых компенсаторно-приспособительных изменений в миокарде в ответ на действие холода. Это выражалось снижением аэробного энергообразования и метаболизма в миокарде с переходом сердечной мышцы на более щадящий анаэробный путь обмена. Реологические нарушения в МЦР при-

водили к обратимым очаговым изменениям в отдельных КМЦ левого желудочка. Очаговые изменения КМЦ предсердий, вероятно, объясняются концентрацией и депонированием содержимого специфических гранул и относятся к метаболическим. Отмеченная концентрация и депонирование не реализующихся катехоламинов и невозможность их утилизации до конца действия холодового фактора и в первые часы после эксперимента, по-видимому, обусловлены изменениями МЦР и снижением метаболизма в миокарде. Это, очевидно, позволяло избежать выброса в кровь аварийных аминов при стрессовой ситуации, которые при высокой концентрации в сосудистом русле вызывают кардиотоксическое действие. Относительная стабильность структуры и функции при охлаждении есть результат сбалансированных процессов энергообразования, биосинтеза и функции миокардиальных клеток в условиях приспособления сердца к умеренной КЦГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Бабийчук Г. А. Влияние гипоксии и краниocereбральной гипотермии на ультраструктуру миокарда белых крыс // Кробиология. — 1987. — № 1. — С. 32—38.
2. Малая Л. Т., Власенко М. А. Кардиозащитные эффекты гипотермии и состояние систем нейрогуморальной регуляции при инфаркте миокарда // II Всесоюз. конф. «Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов»: Тез. докл. Т. II. — Харьков. — 1984. — С. 160.
3. Малая Л. Т., Пушкарь Н. С., Яковцова А. Ф. и др. Особенности метаболизма миокарда при экспериментальном некрозе и краниocereбральной гипотермии // Съезд патологоанатомов Украины, 3-й: Тез. докл. Т. I. — Ивано-Франковск, 1981. — С. 73—74.
4. Малыгин А. М. Взаимоотношение функций при пролонгированной краниocereбральной гипотермии // II Всесоюз. конф. «Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов»: Тез. докл. Т. II. — Харьков, 1984. — С. 161.
5. Марковский В. Д. Морфологические особенности предсердий при инфаркте миокарда (клинико-экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1981. — 19 с.
6. Мурский Л. И. Краниocereбральная гипотермия (в эксперименте). — М.: Медицина, 1975. — 246 с.
7. Покровский В. М., Шейх-Заде Ю. Р., Воверейдт В. В. Сердце при гипотермии. — Л.: Наука, 1984. — 140 с.
8. Целлариус Ю. Г., Семенова Л. А. Гистопатология очаговых метаболических повреждений миокарда. — Новосибирск: Наука, Сибирское отд., 1972. — 210 с.
9. Яковцова А. Ф., Гейко Д. Е., Питенько Н. Н. и др. Структурно-функциональные изменения в миокарде и синтез белка при краниocereбральной гипотермии (экспериментальное исследование) // II Всесоюз. конф. «Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов»: Тез. докл. Т. II. — Харьков, 1984. — С. 189.
10. Яковцова А. Ф., Питенько Н. Н., Васюта В. С., Марковский В. Д. Метаболические повреждения в заинфарктной зоне миокарда при краниocereбральной гипотермии (экспериментальное исследование) // Съезд патологоанатомов Украины, 4-й: Тез. докл. — Донецк, 1986. — С. 128—129.

Харьковский мед. ин-т

Поступила 24.12.87

A. F. YAKOVTSOVA, N. N. PITENKO, T. V. GANULICH, V. S. VASUTA,
V. D. MARKOVSKY

COMPENSATORY ADAPTIVE PROCESSES IN MYOCARDIUM UPON CRANIOCEREBRAL HYPOTHERMIA

Medical Institute of Kharkov

The results of 1 to 6 hrs craniocerebral hypothermia (32 to 30 °C) on the structure of rat myocardium are discussed. The development of compensatory adaptive changes in myocardium due to hypothermia manifested in metabolic depression and transmission to sparing anaerobic metabolism has been shown. The relative stability of structure and function of myocardium is a result of balanced processes of the energy production, biosynthesis and myocardial cell function under conditions of cardiac adaptation to moderate craniocerebral hypothermia.

В. Н. Низов

СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ И НИЗКОЧАСТОТНОЙ МАГНИТОТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ

Представлены результаты клинико-экспериментальных исследований влияния сочетанного воздействия криохирургии и низкочастотной магнитотерапии на ткани шейки матки. Обследовано 220 женщин с доброкачественными процессами шейки матки, из них 102 с сопутствующим хроническим сальпингоофоритом. В результате проведенных исследований выявлены некоторые механизмы лечебного действия сочетанного использования низких температур и магнитотерапии, установлено сокращение сроков регенерации тканей шейки матки в 1,5 раза, а также снижение числа послеоперационных осложнений в виде болевого синдрома по сравнению с изолированным криовоздействием на 24,1 %.

В настоящее время криохирургия получила широкое применение практически во всех областях медицины, в том числе и гинекологии для лечения патологии шейки матки [1, 3]. Однако наряду с высокой эффективностью отмечаются такие ее недостатки, как относительно длительные сроки регенерации тканей, а также возможность обострения хронического воспалительного процесса придатков матки в послеоперационном периоде [2].

Нами были изучены особенности развития некроза и последующей регенерации тканей при применении изолированного криовоздействия в сочетании с низкочастотной магнитотерапией с анализом динамики клинических, лабораторных показателей, системы гемостаза у больных с доброкачественными процессами шейки матки и сопутствующим сальпингоофоритом.

Таблица 1

Продолжительность воспалительных заболеваний придатков матки у обследуемой группы женщин

Количество женщин	Диагностировано впервые	Длительность заболевания, лет				Всего
		До 3-х	3-5	6-10	Более 10	
Абсолютное число	14	48	17	15	8	102
Процент к общему числу наблюдавшихся	6,4	21,8	7,7	6,8	3,6	46,4

Обследовано 220 женщин с доброкачественными процессами шейки матки в возрасте от 20 до 45 лет. Средний возраст больных составил $28,9 \pm 1,3$ г. Максимальное количество больных находилось в репродуктивном возрасте, а из их числа 74,6 % женщин — в возрасте от 20 до 34 лет. У ста двух (46,4 %) обследованных женщин имелось воспаление придатков матки, у 88 (40 %) из них — хроническое. Длительность заболевания представлена в табл. 1. Жалобы на боли внизу живота и пояснице предъявляли 45 (20,5 %) женщин, из них 31 (14,1 %) с хроническим сальпингоофоритом. Жалобы на бели предъявляли 65 (29,5 %) больных, из них 47 (21,4 %) с хроническим сальпингоофоритом, на сочетание болей с белями — 28 (12,8 %). Боли носили тупой, ноющий характер, периодически усиливались. Контактные кровянистые выделения отмечали 5 (2,3 %) женщин. Из общего числа обследованных жалоб не предъявляли 103 (46,8 %) женщины. Данные бимануального исследования представлены в табл. 2.

Большинство больных, 119 (54,1 %), ранее подвергались лечению по поводу патологии шейки матки различными консервативными и хирургическими методами, которые оказались неэффективными. Виды патологии шейки матки представлены в табл. 3.

Всем больным в динамике послеоперационного периода производили простую и расширенную кольпоскопию, проводили опрос о субъективных ощущениях в ответ на проведенное лечение, считали частоту пульса, изме-

ряли артериальное давление и температуру тела. Через 1, 2, 4, 6, 8 и 10 недель, а также через 6 мес., 1, 2, и 3 г после лечения с целью динамического контроля осуществляли бимануальное исследование. Биопсия шейки матки с последующим морфологическим исследованием биоптата производилась 65 (29,3 %) женщинам. Изучение функционального состояния свертывающей системы, общего белка и белковых фракций крови проведено у 85 женщин, у 60 осуществляли термотопографию органов малого таза. Распределение больных в зависимости от применяемых методов лечения представлено в табл. 4.

Для низкотемпературного воздействия на ткани шейки матки применялся криохиргический вакуумный зонд со съёмными наконечниками. В качестве хладагента использовали жидкий азот (-196°C). Воздействие осуществляли в течение 2—3 мин. Во всех случаях оттаивание инструмента происходило естественным путем. Для предупреждения обострения хронического воспаления придатков матки, а также для улучшения регенерации тканей в послеоперационном периоде, начиная с первых суток, проводили воздействие на область гипогастрия низкочастотным магнитным полем с помощью аппарата «Электроника АМТ-01». Напряженность магнитного поля составляла 250 мТл, воздействие проводили в течение 20 мин ежедневно на протяжении 10 дней. Общее состояние больных во время, а также после процедуры существенно не изменялось.

В результате проведенных исследований установлено, что по сравнению с изолированным криовоздействием под влиянием низкочастотной магнитотерапии происходит ускорение процессов регенерации тканей шейки матки. Первые двое суток кольпоскопическая картина после сочетанного воздействия не отличается от таковой после изолированного криовоздействия. На 3—5 сут после изолированного криовоздействия некротическая ткань имеет светло-серый цвет с матовой поверхностью, определяются микрогематомы. При сочетанном применении однократного низкотемпературного воздействия с магнитотерапией на шейку матки определяется белковый струп, обе стороны которого имеют белый цвет. Микрогематомы в большинстве случаев отсутствуют. Начинается краевое отторжение некротических масс. При двухкратном изолированном криовоздействии и в сочетании с магнитотерапией кольпоскопическая картина аналогична вышеописанной, за исключением того, что зона некроза по площади и глубине больше, чем при однократном воздействии. Развитие в зоне воздействия грануляционной

Т а б л и ц а 2

Данные бимануального исследования больных, страдающих воспалением придатков матки

Характер выявленных при вагинальном осмотре изменений	Число больных	
	В абсолютных цифрах	% к общему числу наблюдавшихся
Уплотнение придатков матки	27	12,3
Незначительное увеличение придатков	11	5
Чувствительность при пальпации	36	16,4
Уплотнение и ограничение подвижности придатков матки	28	12,7
Всего	102	46,4

Т а б л и ц а 3

Виды патологии шейки матки у обследуемых больных

Кольпоскопический диагноз	Число больных	
	В абсолютных цифрах	% к общему числу наблюдавшихся
Эктопия	110	50
Зона превращения	28	12,7
Коагуляционный цервикоз	23	10,5
Кисты шейных желез	22	10
Травматическая деформация шейки матки с эктропионом	15	6,8
Основа лейкоплакии	22	10
Всего	220	100

ткани и образование молодого эпителия по периферии способствует отторжению струпа. Очищение шейки матки от некротических масс после изолированного однократного криовоздействия происходит к 18—20 сут, а после

двукратного — на 25—30 сут, в то время как после сочетанного с магнитотерапией при однократном воздействии — на 8—10 сут, при двукратном — на 15 сут. Сроки полной эпителизации в зависимости от примененного метода воздействия представлены в табл.5. После изолированного низкотемпературного воздействия на шейку матки болевой синдром в раннем послеоперационном периоде возник у 38 (17,3 %) женщин, а после сочетанного криовоздействия с магнитотерапией — лишь у 9 (4,1 %) пациенток (табл. 6.)

Таблица 4

Распределение больных в зависимости от применяемых методов лечения

Больные	Изолированное криовоздействие		Сочетанное криовоздействие с магнитотерапией		Всего
	Двухкратное	Однократное	Двухкратное	Однократное	
С патологией шейки матки	43	24	23	28	118
С патологией шейки матки и сопутствующим сальпингоофоритом	25	28	25	24	102
Всего	68	52	48	52	220

У сорока четырех (20,0 %) из 47 (21,4 %) больных с жалобами на возникшие или усиливающиеся боли в послеоперационном периоде последние

Таблица 5

Сроки регенерации тканей шейки матки в зависимости от применяемого метода воздействия

Криовоздействие	Количество больных		Срок регенерации, недели ($M \pm m$)	Вероятность различий (P)
	n	%		
Изолированное однократное	52	23,6	$6,5 \pm 0,5$	—
Изолированное двукратное	68	30,9	$7,6 \pm 0,4$	$1:2 > 0,05$
Однократное в сочетании с магнитотерапией	52	23,6	$4,5 \pm 0,5$	$3:1 > 0,01$
Двукратное в сочетании с магнитотерапией	48	21,9	$5,8 \pm 0,4$	$4:2 < 0,01$

Таблица 6

Возникновение осложнений у больных после криогенного лечения патологии шейки матки

Больные	Изолированное криогенное воздействие (количество больных, %)		Всего	Сочетанное криогенное с магнитотерапией воздействие (количество больных, %)		Всего	Итого
	Двукратное	Однократное		Двукратное	Однократное		
С обострением хронического сальпингоофорита	31 (14,1)	7 (3,2)	38 (17,3)	8 (3,6)	1 (0,5)	9 (4,1)	47 (21,4)
Без обострения хронического сальпингоофорита	37 (16,8)	45 (20,5)	82 (37,3)	40 (18,1)	51 (23,2)	91 (41,3)	173 (78,6)
Всего	68	52	120	48	52	100	220

прошли самостоятельно или были купированы на 5—7 сут назначением курса магнитотерапии без дополнительного лечения, трем женщинам потребовалось назначение дополнительного курса противовоспалительной терапии. У 8 из 12 женщин после примененного лечения произошла нормализация менструального цикла, причем 3 больным было произведено изолированное криохирургическое воздействие, а 5 — в сочетании с магнитотерапией. У 6 женщин из 8, у которых менструальный цикл до операции был ановуляторным, последний приобрел двухфазный характер. Из 10 больных, страдавших бесплодием, у трех наступила беременность, закончившаяся в двух случаях срочными родами, а в одном — самопроизвольным абортom. Семнадцать женщин детородного возраста в последующем рожали; разрывов шейки матки, промежности, кровотечений, а также стеноза, стриктур цервикального канала, спаек со стенками влагалища и других осложнений в родах не наблюдалось. Проведенные у 60 женщин, из которых у 23 в анамнезе имелось хроническое воспаление придатков матки, термотопографические исследования передней брюшной стенки показали, что при локальном низкотемпературном воздействии на ткани шейки матки наблюдается ответная реакция не только поврежденной слизистой, но и окружающих органов, что проявляется изменением температуры передней брюшной стенки. У большинства пациенток с хроническим воспалением температурная реакция на криовоздействие выражена значительно. Назначение в послеоперационном периоде курса магнитотерапии приводит к понижению температуры передней брюшной стенки уже на 3 сут (в то время как после изолированного криовоздействия температура снижается лишь на 7 сут), что свидетельствует о значительном улучшении течения послеоперационного периода.

Анализ показателей протеинового обмена продемонстрировал, что процентное соотношение показателей белковых фракций остается неизменным в течение всего послеоперационного периода как после изолированного криохирургического, так и после сочетанного с магнитотерапией воздействия на ткани шейки матки. Снижение содержания общего белка в крови наиболее значительно на 14 сут послеоперационного периода. При сочетанном воздействии низких температур и магнитотерапии восстановление концентрации общего белка происходит быстрее, чем после изолированного криовоздействия, что, вероятно, связано с более быстрой эпителизацией и соответственно меньшими потерями белка с раневым экссудатом.

Результаты исследования гемостаза свидетельствуют, что под влиянием магнитотерапии происходит нормализация показателей свертывающей системы крови у больных с пониженными исходными параметрами тромбоэластограмм. Вместе с тем в целом под влиянием магнитотерапии в послеоперационном периоде отмечается тенденция к гипокоагуляции.

Электронно-микроскопические исследования тканей шейки матки после изолированных криохирургического и магнитотерапевтического воздействий, а также сочетанного применения указанных физических факторов позволили уточнить некоторые механизмы криоповреждения клеток, последующей регенерации тканей. Непосредственно после криохирургического воздействия наблюдаются однотипные повреждения ядерного аппарата клеток: разделение с образованием вакуолеобразных выпячиваний ядерной оболочки. Далее развивается отек митохондрий с лизисом крист, что свидетельствует о нарушении процессов дыхания и энергетического баланса клетки. Аналогичные изменения обнаруживаются и при сочетанном воздействии низких температур и магнитотерапии. После воздействия на ткани шейки матки переменным магнитным полем происходит усиление синтетической и пластической функции клеток, что выражается в значительном развитии их гранулярной эндоплазматической сети, накоплении в цитоплазме конденсированных митохондрий.

Отдаленные результаты (спустя 2—3 г. после проведенного лечения) продемонстрировали высокую эффективность сочетанного применения низ-

ких температур и магнитотерапии при лечении доброкачественных заболеваний шейки матки. Определенной зависимости рецидивирования патологических образований шейки матки от метода воздействия нами не выявлено. После изолированного криохирургического и сочетанного с низкочастотной магнитотерапией воздействия положительный эффект лечения составил 92,3 %.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что сочетанное применение криовоздействия и низкочастотной магнитотерапии является высокоэффективным методом лечения доброкачественных заболеваний шейки матки, осуществимо в амбулаторных условиях и может быть рекомендовано как метод выбора, особенно у женщин, имеющих в анамнезе хроническое воспаление придатков матки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грин К. Д., Грищенко В. И. Низкие температуры в медицине и биологии // Наука и человечество. — М., 1985. — С. 58—71.
2. Запорожан В. Н. Комбинированное криогенное лечение гиперпластических процессов матки: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1982. — 36 с.
3. Ожиганова З. О. Криогенное лечение рецидивов предопухолевых заболеваний шейки матки после диатермокоагуляции // Акушерство и гинекология. — 1982. — № 10. — С. 55—56.

Одесский мед. ин-т им. Н. И. Пирогова

Поступила 29.02.88

V. N. NIZOV

THE COMBINED USE OF CRYOAPPLICATION AND LOW FREQUENCY MAGNETOTHERAPY FOR TREATING PATHOLOGY OF CERVIX UTERI

N. I. Pirogov Medical Institute of Odessa

Clinical and experimental data on the influence of the combined action of cryoapplication and low frequency magnetotherapy on tissues of cervix uteri are presented. 220 women with benign processes in cervix uteri were examined, 102 had accompanying chronic salpingoophoritis. Mechanisms of the therapeutic effect of the combined use of low temperatures and magnetotherapy were revealed. The period of regeneration of cervix uteri tissues decreased by a factor of 1.5, the number of post-operative complications such as pain syndrome diminished by 24.1 % as compared to isolated cryoapplication.

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

УДК 66:047.48(088.8)

**В. Н. Батраков, Ю. П. Белоусов, А. М. Полончук,
В. В. Прокопчик, В. А. Соколов**

СУБЛИМАЦИОННАЯ УСТАНОВКА УЗВ 1

Создана установка замораживания—высушивания УЗВ1 для исследования процесса сублимации и разработки режимов сублимационного консервирования. Особенностью установки является программное управление параметрами процессов замораживания—высушивания и расширенный диапазон изменения этих параметров за счет применения в качестве хладагента жидкого азота. Установка представляет собой стойку, в которой размещены камера замораживания—высушивания, системы охлаждения—отогрева и откачки, блок управления и контроля.

Сублимационное высушивание в силу своих преимуществ перед другими способами консервирования широко используется в микробиологии и вирусологии, производстве вакцин и сывороток [2, 4]. Требования, предъявляемые современной микробиологией к сохранности специфических свойств ряда биообъектов, заставляют изучать влияние параметров процесса на качество сублимированного препарата. Качество лиофилизированного

биологического объекта зависит как от его исходных свойств, так и от режимных параметров процессов замораживания — высушивания, таких как скорость и предельная температура охлаждения объекта, температура сублимации и досушивания, давление и состав газовой среды в камере [2,5].

Для исследования процесса и разработки оптимальных режимов сублимационного консервирования требуется оборудование с расширенным диапазоном изменения температуры и давления, с достаточной степенью автоматизации управления процессом [1, 2, 3].

В сублимационном оборудовании, выпускаемом как для промышленного производства, так и для экспериментальных исследований используются замкнутые циклы охлаждения с применением различных типов холодильных машин, что ограничивает диапазон изменения параметров.

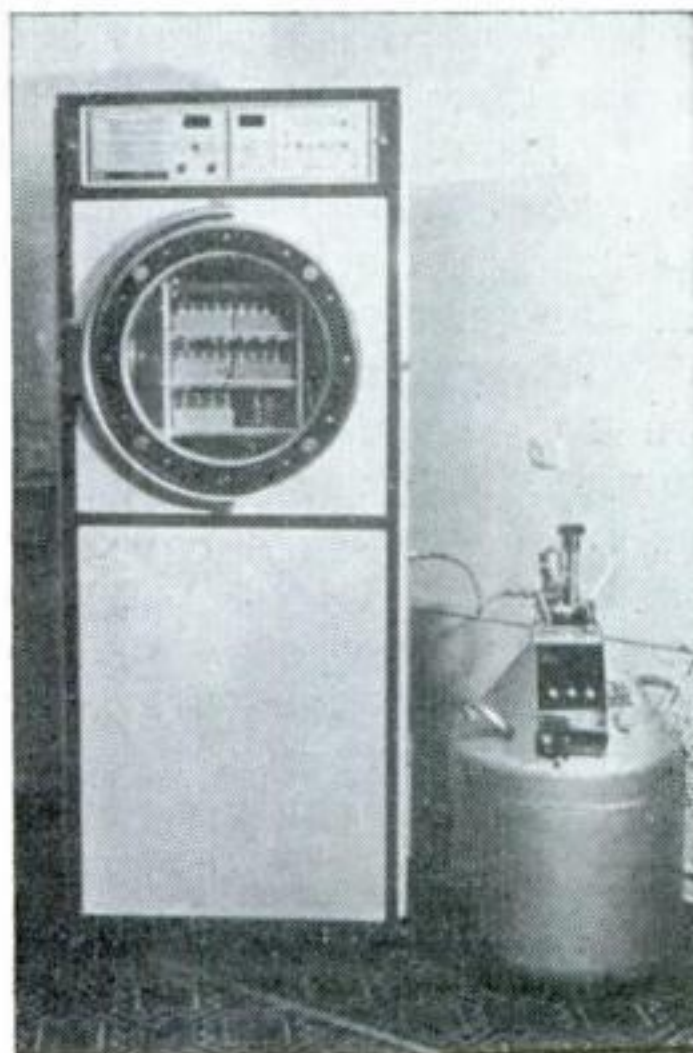
Отечественная промышленность не производит сублимационное оборудование для исследований. В импортных установках, которые в настоящее время эксплуатируются в научно-исследовательских институтах, лабораториях, на заводах бакпрепаратов, отсутствует программное управление, температура полок составляет $-40 \div 60^\circ\text{C}$, температура десублиматора — 70°C , предельный вакуум 10^{-2} мм рт. ст., что не отвечает современным требованиям, предъявляемым к аппаратуре для исследований. В оборудовании ведущих иностранных фирм температура десублиматора достигает $-90 \div -130^\circ\text{C}$, однако при этом значительно уменьшается его холодопроизводительность.

В СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработана установка замораживания—высушивания УЗВ1, предназначенная как для исследования процесса и отработки оптимальных режимов, так и для производства сухих препаратов, расфасованных в ампулы, пенициллиновые флаконы и противни. Особенности установки являются программное управление параметрами процессов замораживания—высушивания и расширенный диапазон изменения этих параметров за счет применения в качестве хладагента жидкого азота.

Установка представляет собой стойку, в которой размещены камера замораживания—высушивания, системы охлаждения—отогрева и откачки, блок управления и контроля. Установка комплектуется системами снабжения хладагентом, базирующимися на сосудах Дьюара различной емкости.

На рисунке представлена установка УЗВ1. В вакуумной камере из нержавеющей стали установлен блок терморегулируемых полок, верхняя из которых служит тепловым экраном. Рабочая поверхность полки 250×250 мм. Расстояние между полками и количество полок (от двух до четырех) может изменяться в зависимости от габаритных размеров контейнеров с объектом. Изменение температуры полок обеспечивается циркулирующей в них рабочей жидкостью, охлаждаемой жидким азотом и нагреваемой электронагревателем. Применяемая система охлаждения — отогрева позволяет снизить температуру охлаждения полок до -70°C , обеспечить диапазон скоростей программного охлаждения — отогрева от 0,05 до $5^\circ\text{C}/\text{мин}$, уменьшить неравномерность температуры по полкам. При скорости охлаждения $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ неравномерность температуры по полкам составляет $\pm 2^\circ\text{C}$, при скоростях меньших $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ неравномерность уменьшается.

Система откачки, состоящая из форвакуумного насоса, вакуумной арматуры и десублиматора, охлажденного жидким азотом, обеспечивает



Сублимационная установка УЗВ1

удаление из камеры парогазовой смеси и регулирование давления в камере. Количество влаги, удаляемой за цикл, составляет не более 1 кг. Для осуществления эффективного тепломассообмена предусмотрено управляемое натекание в камеру газообразного азота. Предусмотрена возможность отсекать камеру от системы откачки для осуществления барометрического контроля процесса сублимации и извлечения пробы на различных стадиях процесса.

Блок управления и контроля обеспечивает: программное охлаждение и отопление полок со скоростями от 0,05 до 5 °С/мин; стабилизацию температуры полок в диапазоне 40 ± 70 °С с точностью ± 1 °С относительно индицируемого сигнала; регулирование давления в камере в диапазоне $133 \div 1,33$ Па; автоматическую дозаправку десублиматора жидким азотом; сигнализацию аварийных ситуаций. Органы управления, контроля и сигнализации выведены на переднюю панель блока.

Контролируются температура и скорость охлаждения — отогрева полок, температура объекта, давление в камере, наличие жидкого азота в десублиматоре, наличие рабочей жидкости в системе охлаждения—отогрева. Температура объекта измеряется микротермопарами в герметичной оболочке из нержавеющей стали. Для записи температуры рабочей жидкости и объекта, давления в камере предусмотрен выход на самопишущий прибор. При аварийном отключении электроэнергии срабатывает блокировка, исключающая порчу образцов.

Автоматическое управление процессами охлаждения—отогрева и откачки позволяет осуществлять процесс с заданными параметрами, что обеспечивает повторяемость результатов, тем самым исключает влияние субъективных факторов, а применение жидкого азота в системе охлаждения и откачки позволяет расширить диапазон программного управления скоростями охлаждения, реализовать процесс сублимации объектов с низкими эвтектическими температурами без применения диффузионного насоса для досушивания, исключить попадание паров масла в полость камеры. Расход азота на цикл низкотемпературной сушки при полной загрузке составляет не более 60 кг.

Установка УЗВ1 прошла ведомственные приемочные испытания и с 1987 г. эксплуатируется в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. На установке были проведены исследования и отработаны режимы замораживания — высушивания различных по составу суспензионных сред, бифидобактерий, стрептомицитов, дрожжей и других биологических объектов.

Исследования показали, что благодаря программному охлаждению биоматериала, стабилизации необходимых температур и регулированию давлений в процессе сублимационного высушивания удалось повысить качество лиофилизированных биообъектов и сократить время высушивания

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Цветков В. Д. Научные основы технологии сублимационного консервирования. — Киев: Наук. думка, 1985. — 92 с.
2. Карпов А. М., Улумиев А. А. Сушка продуктов микробиологического синтеза. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. — 75 с.
3. Каухчешвили Е. И. Исследование процессов и научные основы разработки оборудования для сублимационного консервирования пищевых продуктов и биологических материалов: Автореф. дис. ... д-ра техн. наук. — М., 1968. — 32 с.
4. Подольский М. В. Высушивание препаратов крови и кровезаменителей. — М.: Медицина, 1973. — 6 с.
5. Kiprianoff J. Fundamental and practical aspects of the freezing of food stuffs // Aspects theoretiques et industriels de la lyophilization. — Paris: Hermann, 1964. — 314 p.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 03.11.88

V. N. BATRAKOV, Yu. P. BELOUSOV, A. M. POLONCHUK, V. V. PROKOPCHIK,
V. A. SOKOLOV

A LYOPHILIZATION UNIT UZV 1

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

A unit for freeze—drying UZV 1 has been developed for investigation of the lyophilization process and development of freeze—drying preservation regimes. The unit is provided with a program for monitoring freeze—drying parameters in a wider range due to the usage of liquid nitrogen as a cooling agent. The unit is a stand with a camera for freeze—drying, freeze—thawing and pumping system, and with a control block.

ХРОНИКА

II ИНТЕРНАЦИОНАЛЬНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КРИОГЕНИКЕ

В г. Калькутте (Индия) с 6 по 9 декабря 1988 г. состоялась II Интернациональная конференция по криогенике, организованная Индийским криогенным советом при Джадавапурском университете под руководством П. СENGУПТЫ. Участники конференции обсудили проблемы использования криогеники в технике и технологии, промышленности, космосе, ядерной физике, биологии, медицине, сельском хозяйстве. Большинство докладов было посвящено исследованиям в области физики низких температур. Сделаны сообщения о применении тканевых культур и методов криоконсервации для сохранения генетических ресурсов растений (К. Чандел), создании генных банков, материалы которых могут быть предметом обмена между разными странами (Г. Баджадж). Ряд докладов был посвящен вопросам криомедицины. Обсуждались проблемы криоконсервации крови и костного мозга для борьбы с тяжелыми заболеваниями, в том числе со злокачественными образованиями (С. Сумида). Дана оценка трансплантации костной, хрящевой и др. тканей. К. Эбинэ доложил о применении аутологичной замороженной крови в кардиохирургии. П. Мнержичка выступил с докладом о низкотемпературном хранении тканей (аллогенные и ксеногенные дермоэпителиальные пласты, перикард, твердая мозговая оболочка, конъюнктивы, хрящи) для клинического применения. Обсуждались вопросы криоиммунологии, использования методов криотерапии и криохирургии для лечения опухолей (Р. Аблин, Г. Сесиа). В. И. Грищенко выступил с докладом о криоконсервации эмбриональных печеночных гемопоэтических клеток человека и о перспективах их применения в клинике.

На конференции рассматривались также вопросы криотехнологии производства биопрепаратов для нужд медицины (для остановки капиллярных кровотечений из паренхиматозных органов, желудка, двенадцатиперстной кишки, лечения ран, в том числе ожоговых, ортопедических и травматических дефектов костей).

IX ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС ИММУНОЛОГОВ

С 14 по 17 сентября 1988 г. в г. Риме (Италия) проходил IX Европейский конгресс иммунологов, на котором обсуждались вопросы иммунологии вирусных инфекций, генной инженерии, механизмов активации Т- и В-клеток, роли гуморальных факторов в регуляции иммунитета, иммунных перестроек в патогенезе различных патологических состояний. Многие работы были посвящены проблемам функционирования естественных киллеров как универсальной популяции клеток, контролирующей процессы пролиферации и дифференцировки. Особое внимание уделено проблемам СПИД, в частности патогенезу, диагностике, способам профилактики. Оживленную дискуссию вызвали доклады по созданию новых вакцин. Большое значение придавалось вопросам аутоиммунных заболеваний в эксперименте и клинике. Членом советской делегации А. А. Цуцаевой был представлен доклад, посвященный развитию моноцитарно-макрофагального ростка из гемопоэтических клеток, подвергнутых глубокому замораживанию. Ряд докладов был посвящен изучению лимфокинов и других медиаторов иммунитета. Внимание привлекли сообщения о новых эффективных веществах, оказывающих иммуномодулирующее действие. Интересные доклады были сделаны по проблемам нейроиммунологии.

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищена диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук А. Н. Гольцева «Влияние факторов криоконсервирования на иммуно-

биологические свойства кроветворных клеток костного мозга». В работе показано значение исходного состояния кроветворных клеток в определении их криоустойчивости: это свойство не определяется уровнем их дифференцировки или пролиферативной активности (нахождение в S-периоде клеточного цикла), а в большей степени зависит от условий предварительной обработки костного мозга: гипотермического хранения, обработки цитостатиками, экспонирования при 37 °С. Полученные фундаментальные данные позволили теоретически обосновать возможность оптимизации метода криоконсервирования костного мозга, заключающегося в разработке безотмывочных сред и способа отогрева суспензии.

Показано, что криоконсервирование, не отменяя защитного потенциала костного мозга, вызывает снижение темпов восстановления гемопоэза. При этом впервые отмечена ингибция динамики восстановления функциональных свойств и фенотипических признаков Т-лимфоцитов, регулирующих гемопоэз. Впервые установлен факт нарушения структуры мембранных детерминант на криоконсервированных КОЕ_c и ингибции их синтеза на антигенмодулированных клетках.

Совокупность полученных данных позволила впервые сформулировать положение о развитии в кроветворных клетках после криоконсервирования нелетальных повреждений, временно ингибирующих их функциональную активность. Установлено, что изменения функциональных свойств клеток могут быть обусловлены также гибелью в процессе криоконсервирования клеток, регулирующих функциональную активность кроветворных предшественников.

В диссертационной работе Н. Г. Маловой на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Влияние гипотермии в различных температурных режимах на морфогенез регенерата кости» в экспериментах на белых крысах-самцах линии Вистар в 22 сериях с использованием аппарата «ПГ-01» (на модели дырчатого дефекта большеберцовой кости с применением гистологических, топо-оптических и электронно-микроскопических методов исследований, морфометрических и статистических методов обработки данных с использованием ЭВМ «Электроника-60») установлен оптимальный температурный режим гипотермического и гипертермического воздействий. Показано изменение течения фаз морфогенеза регенерата кости при различных температурных воздействиях с сокращением сроков восстановления при определенном в эксперименте оптимальном режиме. Отмечается, что оптимальные температурные режимы гипо- и гипертермии (32 ÷ 40 °С) используются в качестве специфического стимулятора остеогенных клеток.

На базе Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР создан низкотемпературный банк гепатоцитов свиньи, которые с большой эффективностью используются при лечении печеночной недостаточности, а также при исследовании биохимических процессов и метаболизма лекарственных препаратов. Заложенные в банк криоконсервированные ксеногепатоциты хранятся неограниченно долго и при деконсервации имеют высокую степень сохранности параметров метаболического статуса. Ксеногепатоциты поставляются с паспортом, в котором указываются параметры биообъекта. Концентрация клеток 60 млн/мл. Материал поставляется в стерильном виде в пластиковых пакетах емкостью 50 мл. Стоимость одной дозы (пакета) 97 р. без учета расходов на транспортировку.

Обращаться по адресу:
310015, г. Харьков-15, ул. Переяславская, 23.
Телефон для справок 70-29-35.

Проводится подписка на 1990 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «Криобиология». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Овещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

Журнал рассчитан на научных работников в области биологии и медицины, преподавателей и студентов вузов соответствующего профиля, практиков, использующих методы воздействия холода на биологические объекты.

Периодичность — 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес. — 65 к., на 6 мес. — 1 р. 30 к., на 12 мес. — 2 р. 60 к.

Подписка принимается в агентствах и отделениях «Союзпечать», отделениях связи и общественными распространителями печати.

Our journal KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by Naukova Dumka Publ. Co. in Russian with abstracts in English. The journal is designated for the communication of papers on aspects of low temperature studies covering the chemical and life sciences and their associated technologies. Coverage includes: physical and chemical changes accompanying freezing and thawing, low temperature biophysics; biochemistry and molecular biology at sub-zero temperatures; preservation of cells, tissues and organs; effects of low temperatures on cell physiology; the use and mode of action of cryoprotectants; cell damage and its avoidance; freeze-drying and substitution; chill and frost injury, cold acclimation and hardiness in plants; cold survival mechanisms in animals and micro-organisms; low temperature techniques and instrumentation, e. g. food and pharmaceuticals

ISSN 0233-7673. КРИОБИОЛОГИЯ 1989. № 3. 1-56.

Наукова думка