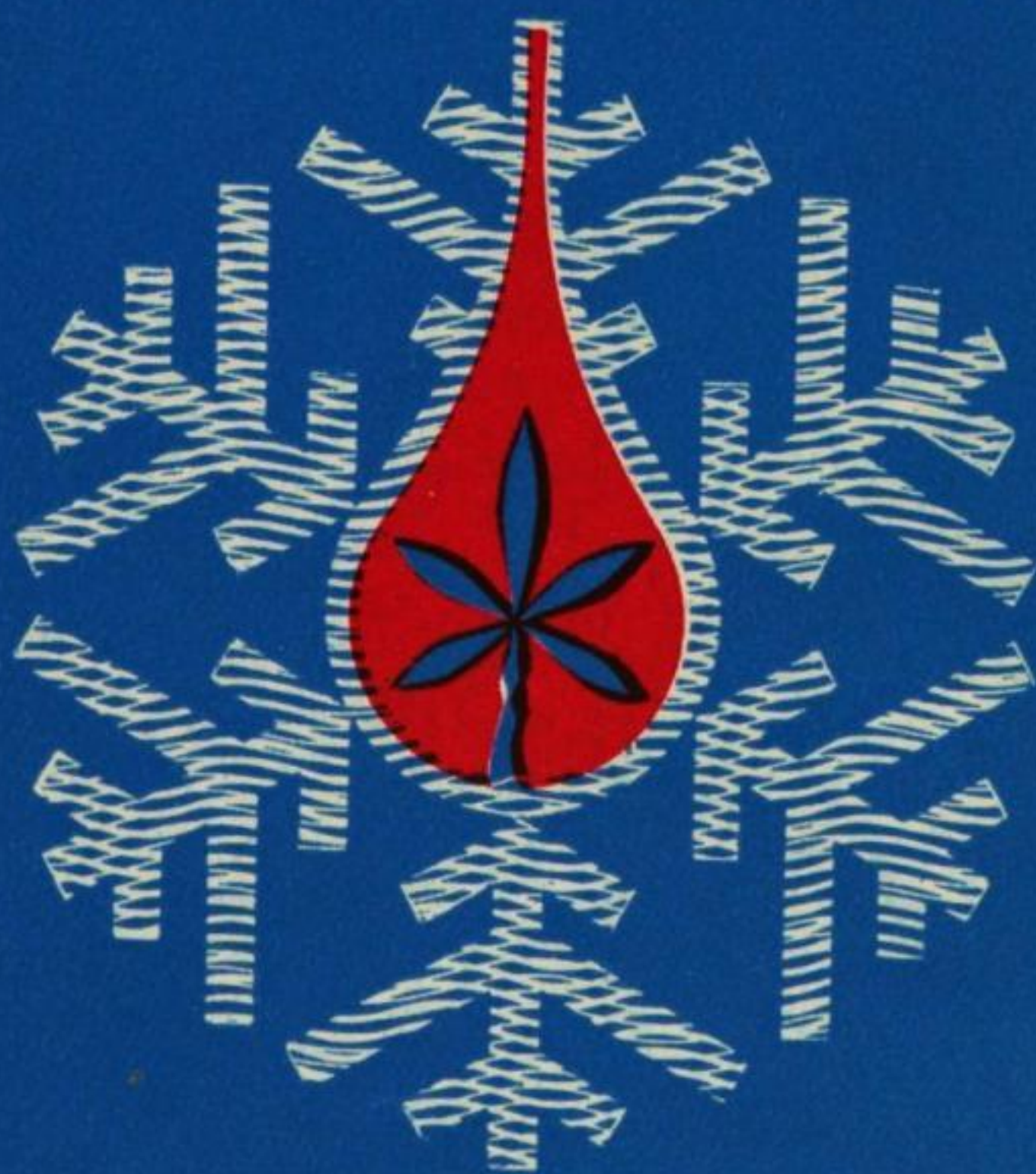
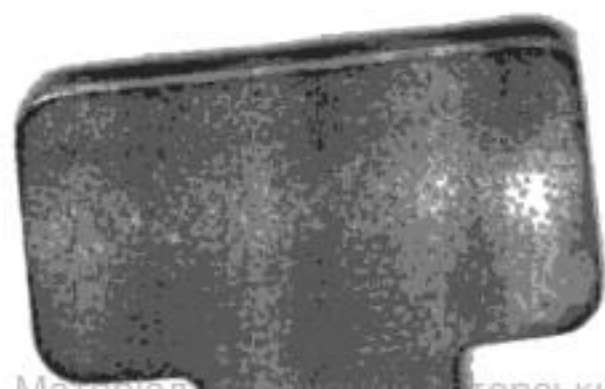


КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА



6

1980



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК

6

КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1980

В сборнике представлены статьи, посвященные основным научным направлениям криобиологии и криомедицины, разрабатываемым в нашей стране. Освещены вопросы криоповреждения и криозащиты различных биообъектов, рассмотрены проблемы механизма действия криопротекторов в отношении конкретных биообъектов на примере глицерина и поливинилпирролидона (ПВП) и проблемы моделирования некоторых физико-химических процессов, происходящих при замораживании-оттаивании. Представлены материалы о влиянии низких температур и криопротекторов на морфо-биохимическое и функциональное состояние биологических образований.

Для широкого круга биологов и медиков, а также специалистов, разрабатывающих теоретические и прикладные аспекты низкотемпературного консервирования биологических объектов.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Редакция межведомственных сборников

П. А. Бездетко

К ВОПРОСУ О ВЫБОРЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ КРИОТЕРАПИИ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

За последние годы криотерапевтические методы получили распространение в различных областях клинической медицины. В офтальмологии криометоды применяются при лечении заболеваний роговой оболочки, сетчатки, при глаукоме, болезнях век, конъюнктивы. Однако, несмотря на большой клинический опыт, в литературе недостаточно освещен вопрос о выборе температурных параметров для того или иного метода криотерапии. Вместе с тем вопрос этот чрезвычайно важен, ибо криотерапия — терапевтическое повреждение холодом со строго ограниченным дозированным действием, находящимся в прямой зависимости от уровня охлаждения объекта лечения и времени холодового воздействия [12, 14].

В офтальмологии применяются два принципиально различных вида криовоздействия: 1 — манипуляции, при которых используется эффект прилипания (примораживания) активного наконечника криоинструмента к объекту криовоздействия (криоэкстракция катаракты, удаление амагнитных инородных тел, сгустков крови, цистицерка из стекловидного тела); 2 — манипуляции, при которых прилипание активного наконечника криоинструмента должно быть исключено (криоаппликация при заболеваниях век, конъюнктивы, кератитах, глаукоме, криопексия при отслойке сетчатки).

Большинство применяемых в офтальмологии криоинструментов имеют температуру рабочего наконечника от -20 до -70°C [1, 3, 4, 10, 11, 15]. При этой температуре во время контакта активного наконечника криоинструмента с тканями глаза примораживание последней неизбежно. Попытка отделить примерзший инструмент приводит к значительной травматизации, а ожидание, когда наступят естественные нагревание и отмораживание предмета (инструмента), затягивает продолжительность криолечения и снижает его эффективность.

В некоторых криотерапевтических аппаратах после соответствующего по силе и времени криовоздействия рабочий наконечник быстро нагревается, в результате чего приморозившаяся ткань оттаивает и отлипает без травматизации. Но такие аппараты сложны и дорогостоящи [14, 17].

Указанную проблему можно решить другим, более простым путем. Из данных литературы последних лет [1, 3, 4, 10] известно, что при охлаждении рабочего наконечника криоаппликатора от -160 до -110°C прилипания ткани к инструменту не наблюдается. Этому факту до настоящего времени нет достаточно обоснованного теоретически объяснения. Л. И. Казанец [3] считает, что при сверхнизких температурах охлаждения инструмента прилипания тканей не происходит потому, что вследствие очень низкой температуры уже при приближении наконечника к ткани последняя замерзает и в момент контакта

оказывается твердой, а при контакте двух твердых тел (замороженной ткани и наконечника криоинструмента) спайка между ними образоваться не может.

Иное толкование этого феномена дают Амоилс и Валкер [11]. Они объясняют отсутствие прилипания конденсацией влаги на криоде и образованием между наконечником криода и тканями глаза слоя из кристаллов льда, плохо проводящих холод к тканям.

Нам представляется, что первое и второе объяснения ошибочны, так как они не базируются на экспериментальных и теоретических данных о физических процессах образования льда.

Известно, что физические свойства льда (форма и величина кристаллов, их механическая прочность) зависят от температуры и скорости охлаждения [2, 5, 6, 8, 9]. Чистая вода, замерзая в интервале температур от 0 до -80 , -100°C , образует кристаллы гексагональной формы, при температуре от -80 до -140°C — кубической формы, а при быстром охлаждении от -110°C и ниже возникает особое некристаллическое (аморфное) состояние льда или витрификация. Образование чистого стеклообразного льда можно наблюдать только при особых условиях, когда охлаждение воды происходит со скоростью в несколько сотен градусов в секунду [8, 16]. В практических условиях между криоинструментом и тканью образуются структуры, в которых смешиваются различные типы льда [9, 16]. В физике известно около 10 кристаллических модификаций льда. Точные границы, при которых образуются кристаллы определенной формы, окончательно не установлены [5, 6]. При нагревании наблюдается обратный процесс перехода одной кристаллической формы в другую — рекристаллизация [5, 8, 9, 16]. Так, при быстром и глубоком охлаждении формируются кристаллы льда малой величины. При повышении температуры (рекристаллизации) возникает слияние мелких кристаллов в более крупные агрегаты (единый блок).

С изменением формы и величины кристаллов меняются и механические свойства льда: сопротивление к разрыву, раздавливанию, срезу [2, 6, 7]. Этими физическими процессами, по нашему мнению, и следует объяснять тот факт, что при одних температурах (от -120 , -100°C до -40 — -30°C) образуется механическая прочная ледяная спайка между криоинструментом и подвергаемой охлаждению тканью, при других температурах (от -100 , -110°C и ниже) образующиеся ледяные кристаллы не имеют между собой прочной механической связи и ткань «не прилипает».

Исходя из описанного выше, можно рекомендовать для криотерапии, в частности для криоаппликаций, охлаждать криоинструменты до температуры ниже -100°C , регулируя глубину криовоздействия изменением времени аппликации. Целесообразность такой рекомендации можно проиллюстрировать двумя примерами из клинической практики.

В первом случае криоаппликация области цилиарного тела (криоциклопексия) проводилась больному с первичной гиперсекреторной глаукомой, некомпенсированной медикаментозным лечением. Для криовоздействия использовался криоаппликатор в виде медного покрытого хромом стержня, масса которого равнялась 80 г, а диаметр рабочей части наконечника аппликатора — 2 мм. Инструмент был охлажден сжиженной углекислотой до -76°C . Наконечник приложен к конъюнктиве склеры в 6 мм от лимба в меридиане в течение 12 ч. При этом произошло прочное примораживание конъюнктивы к криоаппликатору, в результате чего их невозможно было разделить без значительного травмирования ткани, сопровождавшегося кровотечением. В связи с этим от дальнейших криоаппликаций пришлось отказаться.

Во втором случае (больной со вторичной некомпенсированной миотиками глаукомой) тот же криоаппликатор был охлажден в жидком

азоте до -196°C и приложен к конъюнктиве глазного яблока в 6 мм от лимба в меридиане 6 ч. Через 20 с криоаппликатор без каких-либо усилий (прилипания не наблюдалось) отделен от конъюнктивы и поставлен к ней на новом месте. Через 20 с нанесена следующая аппликация. Всего сделано 10 аппликаций, и прилипание ткани конъюнктивы к криоаппликатору при этом не наблюдалось. Реакция глаза на криоаппликацию была минимальной. Признаков повреждения конъюнктивы при клиническом и биомикроскопическом исследовании не отмечено.

Таким образом, в отличие от криохирургических манипуляций, преследующих цель получить примораживание оперируемой ткани к криоинструменту, криотерапевтические аппликации должны исключить возможность примораживания.

С этой целью целесообразно применять активный наконечник криоинструмента, охлажденный до температуры, при которой примораживания тканей не происходит, т. е. до -100 — -110°C .

1. Абрамов В. Г., Артамонов В. П. Применение холода в офтальмологии. — Ярославль: Верхне-Волж. кн. изд-во, 1973. — 151 с.
2. Войтовский К. Ф. Механические свойства льда. — М.: Изд-во АН СССР, 1960. — 232 с.
3. Казанец Л. И. Материалы по механизму криоэкстракции хрусталика. — В кн.: Материалы III Всесоюз. съезда офтальмологов СССР. Волгоград, 1966, т. 2, с. 192—194.
4. Криохирургия / Под ред. Э. И. Канделя. — М.: Медицина, 1974. — 302 с.
5. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. — Л.: Наука, 1972. — 288 с.
6. Паундер Э. Р. Физика льда: Пер. с англ. — М.: Изд-во АН СССР, 1967. — 232 с.
7. Пинегин В. П. Предварительное сообщение об исследованиях прочности речного льда в связи с температурными изменениями. — Вестн. Инж. ин-та, 1923, 4, с. 52—56.
8. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 343 с.
9. Рэ Л. Консервация жизни холодом. — М.: Медгиз, 1962. — 101 с.
10. Чередниченко В. М. Интракапсулярная экстракция катаракты с помощью низких температур: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Днепропетровск, 1969. — 26 с.
11. Amoils S. P. The thermal and mechanical factors involved in ocular surgery. — Proc. Roy. Soc. Med., 1966, 59, N 10, p. 1056—1064.
12. Bettman J. W. Cryotherapy of the eye. — Surv. Ophthalmol., 1965, 11, N 1, p. 1—6.
13. Dowell L. G. Low temperature forms of ice, as studied by X-ray diffraction. — Nature, 1960, 188, N 47, p. 1144—1148.
14. Farlani D., Fiberio G., Negroni L. Die Kryotherapie in der Ophthalmologie. — Büch. Augenarzt. Bosen, 1970, 55, S. 54.
15. Krawicz T. Intracapsular extraction of intumescent cataract by application of low temperature. — Brit. J. Ophthalmol., 1961, 45, N 4, p. 279—283.
16. Meryman H. T. The mechanism of freezing in biological systems. — In: Recent research in freezing and drying. Oxford, 1960, p. 23—39.
17. Moreau P., Hant J. Cryoophthalmologie. — Paris: Masson et Cie, 1971. — 718 p.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.04.78

УДК 57.043

А. Д. Бугров, Ф. И. Осташко

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ РАЗМОРАЖИВАНИИ СПЕРМИЕВ

В литературе имеются сообщения, свидетельствующие о повышенном интересе многих исследователей к процессу размораживания биологических объектов и спермы сельскохозяйственных животных, сохраненной в жидком азоте. Это связано с восстановлением жизнеспособности спермиев, зависящей от скорости отогрева [1—3, 7, 8, 11—14].

В то же время только отдельные работы направлены на выявление повреждающих факторов при деконсервации [1—10], поэтому механизм повреждений спермиев при отогреве недостаточно изучен и требует уточнения.

Очередным этапом раскрытия механизма гибели спермиев при размораживании, по-видимому, станет нахождение критических (повреждающих) зон при размораживании спермы быков, замороженной с эндо- и экзоцеллюлярными криопротекторами. Одна из задач настоящей статьи — определение этих зон при размораживании.

Методика и результаты исследований. В опытах использовали нативную сперму быков, отвечающую требованиям стандарта. В первой серии опытов брали для разбавления и замораживания среду следующего состава: 11,5%-ный раствор лактозы — 63 мл, желтка — 30 мл, глицерина — 7 мл. Сперму разбавляли 1 : 1 при температуре 30—35°C. Для последующих опытов использовали среду следующего состава: вода дистиллированная — 100 мл, лактоза — 11,5 г, желток — 20 мл и криопротекторы на 100 мл среды: этиленгликоль — 6 мл, полиэтиленоксид молекулярной массы (Мм) 100 — 6 мл, ПЭО-400 — 8 мл, диметилсульфоксид — 6 мл. В качестве криопротекторов также использовали 11,5%-ную лактозу и сахарозу, 22%-ную рафинозу с 20 мл желтка на 100 мл раствора. Сперму разбавляли указанными средами в два раза (тогда соответственно уменьшалось конечное содержание криопротекторов), выдерживали в холодильнике в течение 4—5 ч при температуре 2—4°C. Замораживали сперму в гранулах на фторопластовой пластине с температурой от —70 до —76°C. Гранулы после двухминутной выдержки на пластине погружали в жидкий азот и хранили их в нем не менее суток.

Для нахождения критических зон при размораживании готовили спиртовую баню в пищевом термосе при постоянном помешивании электромешалкой. Минусовую температуру в ванне создавали добавлением в спирт жидкого азота и контролировали ее термометром с точностью до —0,5°C.

По достижении температуры —10°C в спиртовую ванну погружали стерильный пенициллиновый флакон на 2/3 его высоты с постоянной фиксацией в этом положении. Спустя 4—5 мин во флакон из жидкого азота переносили гранулу и выдерживали ее при —10°C в течение 30 мин. Оттаивали гранулу во флаконе, содержащем 1 мл 2,8%-ного натрия лимоннокислого, трехзамещенного, пятиводного при температуре 38—40°C. Через 1—2 мин оценивали подвижность спермиев в баллах, а флаконы со спермой ставили в термостат для инкубирования при температуре 38°C. Активность спермиев определяли через каждый час инкубирования до полной гибели всех клеток. Переживаемость исчисляли в часах, включая появление единичных спермиев с прямолинейно-поступательными движениями.

Аналогичные операции получасовой выдержки гранул проводили при температурах спиртовой ванны соответственно —5, —15, —20, —30, —40, —50, —70, —196°C (табл. 1). В контроле сперму оттаивали путем переноса гранул из жидкого азота в изотонический раствор того же цитрата натрия при температуре 38—40°C. Каждый опыт ставили на 5—10 разделенных эякулятах.

Из таблицы видно, что количество и живучесть клеток после получасовой выдержки при минусовых температурах варьируют не только от температуры, но и от вида криопротектора и его защитных свойств.

Количество живых спермиев после 30-минутной выдержки при температуре —70°C было на уровне контроля. Не изменился и показатель живучести, однако он имел тенденцию к снижению при консервировании спермы с 7,5% глицерина лактозой, ПЭО-400.

**Влияние получасовой выдержки замороженной спермы
при минусовых температурах на ее качество**

Показатель	Криопро- тектор	Температура выдержки спермы, °С										
			0	-5	-10	-15	-20	-30	-40	-50	-70	-196
Активность Живучесть	Глицерин, %	3,5	2,55 3,97	— —	0,1 0,05	— —	0,81 0,46	1,77 2,55	3,6 8,0	4,0 11,1	4,2 13,4	4,15 13,3
Активность Живучесть		7,5	4,25 12,7	— —	2,75 3,0	— —	1,68 1,65	2,68 4,5	3,68 7,46	3,62 6,99	3,87 8,93	4,18 11,8
Активность Живучесть	Этилен- гликоль		2,5 4,25	0,1 0,1	0,5 0,25	— —	1,3 1,15	3,5 18,05	3,9 20,35	4,2 34,3	4,8 37,7	4,8 47,5
Активность Живучесть	Полиэти- леноксид	Мм 100	0,9 3,75	0,7 0,67	1,2 2,0	— —	1,4 6,0	1,8 23,2	2,8 23,9	2,9 25,9	2,8 22,3	3,25 23,6
Активность Живучесть		Мм 400	0 0	0 0	0 0	— —	0,5 0,75	1,7 5,5	2,9 10,6	2,9 15,1	2,9 14,1	3 17,5
Активность Живучесть	Саха- роза		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1,8 3,75	2,85 4,9	2,4 5,0	3,3 14,4	3,4 15,8
Активность Живучесть	Лак- тоза		0 0	0 0	0 0	0 0	1,8 6,2	2,8 15,2	3,3 18,3	3,5 18,7	3,5 18,6	3,6 16,7
Активность Живучесть	Рафи- ноза		0 0	0 0	0 0	0 0	0,75 0,75	1,75 5,5	3,0 8,0	3,35 15,6	3,5 16,8	3,5 16,9

С повышением температуры спиртовой ванны до -50°C и выдержки спермы, консервированной с 3,5% глицерина, качественные показатели снижались незначительно. Активность спермиев после выдержки при -40°C также понизилась на недостоверную величину. В то же время показатель живучести значительно уменьшался ($p < 0,01$). Выдержка спермы в спиртовой ванне при температуре -30° и выше до 0° достоверно снижала подвижность и живучесть спермиев. Максимальная гибель клеток отмечалась при температуре около 10°C . Получасовая выдержка спермы, консервированной с конечным 7,5%-ным содержанием глицерина, по-иному влияла на характер изменения качества спермы в приведенных диапазонах. Так, выдержка при -70°C снизила показатель живучести на 3 условные единицы ($p < 0,1$). При -50 и -40° активность снизилась на 0,4 балла ($p < 0,1$), а живучесть соответственно на 4,9 и 4,6 условных единиц ($p < 0,05$). Выдержка спермы в ванне с температурой -30 , -20 и -10°C достоверно понижала активность и показатель живучести спермиев. Наибольшая гибель наблюдалась при температуре около -20°C . Выдержка спермы и ее последующий отогрев при 0° не снизили качественных показателей спермы в сравнении с контролем.

Получасовая выдержка спермы, замороженной с 3% этиленгликоля, показала, что снижение количества живых клеток и их живучесть при задержке замораживания были аналогичны показателям для спермы, консервированной с 3,5% глицерина. Максимальная гибель отмечалась в диапазоне температур около -10°C . Аналогичные результаты получены на сперме, консервированной с ДМСО и ПЭО-100.

Следует отметить, что ПЭО-400, в отличие от ПЭО-100, не защищает спермиев при размораживании и после выдержки при температурах -5 , -10 и -15°C . Спермии, консервированные в сахарозной

среде после получасовой выдержки, не защищены от повреждений при температурах от -5 до -20° , в рафинозной и лактозной — от -5 до -15 — -18°C .

Вероятно, защитные свойства проникающих и непроникающих криопротекторов неоднозначны. В первом случае защитное свойство эндоцеллюлярных соединений проявляется внутри клетки и в окружающей среде. Экзоцеллюлярные действуют непосредственно на внеклеточную среду и опосредовано через цитоплазматическую мембрану на внутриклеточное содержимое, ограждая клетку от повреждений. Известно, что с появлением жидкой фазы при температуре -50°C образуются каналцы, мало изменяющие объем с повышением температуры до -30°C . По-видимому, при этих температурах получасовая выдержка обуславливает длительное воздействие повреждающих факторов. В это время происходит как бы повторное замораживание или рост кристаллов, так как температурная остановка создает условия для замораживания с малой скоростью. Такая длительная остановка, или задержка, отогрева приводит к возникновению центров кристаллизации внутри клетки или возникновению в процессе миграционной рекристаллизации более крупных эндоцеллюлярных кристаллов, если таковые имели место ранее.

Постепенное повышение температуры вызывает перемещение кристаллов [6]. Поэтому не исключается и механическое повреждение спермиев.

С повышением температуры выше -30° сеть каналцев расширяется. При температуре около -20° пространства между кристаллами заполняются гипертоническими растворами. При этих температурах масса льда составляет около 98%. Повышение температуры до -8 — -10°C снижает объем льда до 90%. Можно полагать, что в этом диапазоне температур повреждение и гибель спермиев наступают от рекристаллизационных процессов и от воздействия гипертонических солей.

Дальнейшее повышение температуры до -5° и выше сопровождается увеличением межкристаллической жидкости. Кристаллы приобретают однородные контуры. Вероятно, в этих условиях повреждение спермиев наступает от длительной экспозиции с концентрированными растворами.

Нашими опытами установлена более высокая повреждаемость клеток при размораживании спермы, консервированной в непроникающих криопротекторах. Очевидно, степень проявления повреждающего действия перекристаллизации и концентрированных растворов в этом случае проявляется в большей степени, поскольку глицерин и другие эндоцеллюлярные криопротекторы снижают интенсивность рекристаллизационных процессов при оттаивании и, разбавляя концентрированные растворы, уменьшают их вредное действие. Об этом свидетельствует меньшая повреждаемость клеток в разбавителях, содержащих большой процент глицерина.

Известно, что защитные свойства непроникающих криопротекторов (сахарозы, лактозы и др.) при замораживании спермы ниже, чем эндоцеллюлярных (глицерина, ПЭО-100 и др.). По-видимому, это частично связано с повреждением клеток при отогреве, как показано в нашей статье.

1. Бугров А. Д. Способ оттаивания замороженной спермы быков в различной упаковке. — Животноводство, 1976, № 12, с. 57—59.
2. Бугров А. Д. Повреждения спермиев при оттаивании и пути устранения. — Животноводство, 1977, № 12, с. 57—59.
3. Бугров А. Д., Осташко Ф. И., Олексенко Т. И. А. с. 552967 (СССР). Способ размораживания биологических объектов. — Оpubл. в Б. И., 1977, № 13.
4. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. — Киев: Колос, 1968. — 248 с.

5. Пушкарь Н. С., Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И. Повреждения клеток при размораживании и некоторые пути их устранения. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 26—27.
6. Рэ Л. Консервирование жизни холодом. — М.: Изд-во иностр. лит., 1962. — 176 с.
7. Сердюк С. И. Методика глубокого замораживания семени хряков. — В кн.: Тез. докл. на науч. конф. НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР. Харьков, 1964, с. 130—132.
8. Смирнов И. В. К теории глубокого охлаждения спермы. — Животноводство. 1974, № 11, с. 65—70.
9. Тимошенко Ю. П., Гаврилова И. И. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. Термодинамические свойства крови при ее размораживании. — В кн.: Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 47—49.
10. Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. III. Размораживание консервированной крови. — В кн.: Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 49—52.
11. Фропин Г. В. Организация глубокого замораживания спермы быков в Эстонской ССР. — Молоч. и мяс. скотоводство, 1975, № 11, с. 29—31.
12. Aamdal J. O., Andersen K. Fast thawing of bull semen frozen in straws. — VI Int. Congr. Animal Reprod. Artif. Insem. 1968, vol. 2, p. 973—974.
13. Almquist J. O., Wiggin H. B. Effect of different combinations of freezing and thawing rates upon survival of bull spermatozoa in U. S. plastic straws. — Animal J. Digest, 1973, 21, N 9, p. 116—118.
14. Wiggin H. B., Almquist J. O. Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility bull spermatozoa frozen in plastic straws. — J. Animal Sci., 1975, 40, N 2, p. 302—305.

Научно-исследовательский
институт животноводства
Лесостепи и Полесья УССР

Поступила в редколлегию
08.03.78

УДК 57.043.612.42:536.48

Т. Н. Воскобойникова, Ю. Е. Микулинский

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ НА ТКАНЕВЫЕ ЛИМФОЦИТЫ МЫШЕЙ

Цель настоящей статьи — изучение влияния некоторых режимов низкотемпературной консервации на клеточный состав, содержание жизнеспособных клеток и активность течения биосинтеза белка, нуклеиновых кислот в популяции клеток, полученной из лимфоидных органов (тимуса, селезенки, лимфатических узлов) мышей линии Balb/c. Замораживание суспензии тканевых лимфоцитов проводили в полиэтиленовых ампулах до -196°C по программе, применяемой для лимфоцитов периферической крови, которая предусматривает охлаждение на I этапе со скоростью $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от $+20$ до -30°C , на II этапе — от -30 до -196° со скоростью $300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; по программе, предложенной в работе [2] и заключающейся в медленном охлаждении образцов со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -26° , затем выдержка в криостате при -26° в течение 10—20 мин и от -26 до -196° со скоростью $300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; по трехэтапной программе, включающей охлаждение от $+20$ до -5° со скоростью $45^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, от -5 до 28° со скоростью $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, выдержка при -28° в течение 20 мин и от -28 до -196° со скоростью $300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Клеточные суспензии замораживали под защитой криопротектора ПЭО-400, добавляемого с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация в замораживаемом образце составляла 10%. После кратковременного пребывания в жидком азоте ампулы с клетками оттаивали на водяной бане при температуре $+41^{\circ}\text{C}$. Так как суспензия клеток после деконсервации сразу же вводится в организм и при этом криопротектор не удаляется, представляло несомненный интерес изучить в эксперименте свойства клеток после отмывки от

криопротектора. В этой связи к суспензии деконсервированных клеток добавляли двойной объем инактивированной гомологичной сыворотки и 5 мл раствора Хенкса (близкие условия создаются в живом организме, так как взвесь клеток попадает в кровоток и там происходит разведение криопротектора во много раз сывороткой крови реципиента). Затем образцы центрифугировали при 200 g в течение 15 мин, после чего надосадочную жидкость удаляли, а клетки ресуспендировали в растворе Хенкса, содержащем 50% инактивированной гомологичной сыворотки.

После удаления криопротектора в пробах подсчитывали количество ядродержащих клеток. Жизнеспособность определяли с помощью суправитального красителя трипанового синего. Для изучения морфологической сохранности лимфоцитов готовили мазки из деконсервированных клеточных суспензий, которые фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому—Гимза. Просмотр проводили в световом микроскопе МБИ-3. В деконсервированных клетках определяли интенсивность синтеза белка, РНК и ДНК с помощью меченых предшественников — ^{14}C -гидролизата белков хлореллы (уд. активности 10,9 мк/мл) в дозе 2,5 мкКи/мл; ^{14}C -уридина (уд. активности 24,5 мк/мл) в дозе 1 мкКи/мл; ^{14}C -тимидина (уд. активности 31 мк/мл) в дозе 1 мкКи/мл на $2,5 \times 10^6$ клеток. Клетки инкубировали с предшественниками в течение 60 мин при температуре $+37^\circ\text{C}$. Обработку радиоактивных проб проводили на нитроцеллюлозных фильтрах по методу, указанному в работе [1]. Радиоактивность проб определяли на сцинтилляционном спектрометре SL-40 Interteknique в толуоловом сцинтилляторе. Статистическую обработку данных проводили по Фишеру—Стьюденту.

Результаты исследований по изучению влияния 10%-ной концентрации ПЭО-400 на тканевые лимфоциты показали, что обработка клеток криопротектором существенно не влияла на жизнеспособность ядродержащих клеток (количество клеток уменьшалось на 5—10%, а жизнеспособность на 1,0—4,2%). При просмотре мазков, приготовленных из суспензий клеток, отмытых от криопротектора, обнаружено, что морфология их не отличима от морфологии интактных клеток. При изучении влияния криопротектора на активность течения процессов синтеза нуклеиновых кислот и белка в тканевых лимфоцитах установлено, что ПЭО-400 в 10%-ной концентрации (время экспозиции клеток с криопротектором 15 мин) снижает уровень включения меченых предшественников в среднем на 25% (таблица). Наиболее интенсивно под влиянием 10%-ного ПЭО-400 ингибировалась активность биосинтеза ДНК и белка в клетках лимфатических узлов и ДНК в спленоцитах.

В следующей серии экспериментов проведено изучение влияния низкотемпературной консервации на количество ядродержащих клеток, их жизнеспособность и уровень синтеза белка и нуклеиновых кислот в тканевых лимфоцитах.

Количество жизнеспособных клеток в пробах, замороженных по II-этапной программе, включающей замораживание на I этапе со скоростью $1-3^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -30° и на II этапе от -30 до -196° со скоростью $300^\circ\text{C}/\text{мин}$, составляло 43—48%, а количество ядродержащих клеток снижалось максимум на 8%. Применение выдержки образцов при -26° в течение 10—20 мин было дополнительным фактором, повышающим жизнеспособность деконсервированных клеток в среднем на 8—10%. Жизнеспособность тканевых лимфоцитов после низкотемпературной консервации по трехэтапной программе была наиболее высокой и составила: для клеток лимфатических узлов $68,21 \pm 4,28$, для спленоцитов $76,91 \pm 2,42$ и тимоцитов $80,60 \pm 2,13$. Количество ядродержащих клеток для всех видов лимфоидных клеток снижалось в среднем на 10—12%. В клеточном спектре лимфограмм происходило

перераспределение, которое заключалось в уменьшении процента средних и больших лимфоцитов, юных клеток и увеличении количества малых лимфоцитов. При изучении активности течения биосинтеза нуклеиновых кислот и белка в консервированных по оптимальной программе лимфоцитах обнаружено достоверное снижение уровня включения меченых предшественников в ДНК, РНК и белок (таблица). Уровень биосинтеза белка в деконсервированных лимфоидных клетках составлял 34,03—48,97% интактного контроля, ДНК и РНК — соответственно 34,40—73,03%, 36,19—62,71%. Минимальное включение предшественников в РНК деконсервированных клеток отмечено у тимоцитов (36,19%), а в ДНК — у спленоцитов (31,40%). Это снижение синтеза нуклеиновых кислот и белка можно объяснить следующими причинами: 1) снижением количества ядродержащих клеток; 2) перераспределением клеточной популяции в сторону снижения количества метаболически активных клеток; 3) нарушением процессов биосинтеза белка и нуклеиновых кислот в тканевых лимфоцитах после низкотемпературной консервации. Не исключено, что перечисленные механизмы вносят определенный вклад в снижение жизнеспособности тканевых лимфоцитов.

Изучение влияния низкотемпературной консервации (-196°C) и криопротектора ПЭО-400 в концентрации 10% на уровень синтеза белка, РНК и ДНК в тканевых лимфоцитах мышей (имп/мин на $2,5 \cdot 10^6$ кл)

Показатель	Клетки	Контроль	+10% ный ПЭО-400	+замора- живание по III этап- ной про- грамме	p	p_1	p_2
Белок	Тимоциты	$14\,859 \pm 604$	$11\,033 \pm 636$	6854 ± 812	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$
	Спленоциты	9123 ± 1107	6689 ± 377	4468 ± 386	$<0,05$	$<0,01$	$<0,01$
	Клетки лимфоузлов	8536 ± 700	3956 ± 532	2906 ± 660	$<0,01$	$<0,01$	$>0,05$
РНК	Тимоциты	$11\,720 \pm 972$	7872 ± 480	4242 ± 621	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$
	Спленоциты	7638 ± 1071	5151 ± 796	4791 ± 1046	$<0,05$	$<0,05$	$>0,05$
	Клетки лимфоузлов	4208 ± 244	3134 ± 272	2432 ± 92	$0,01 < p < 0,05$	$0,01 < p < 0,05$	$0,01 < p < 0,05$
ДНК	Тимоциты	4639 ± 165	2479 ± 164	2446 ± 137	$<0,01$	$<0,01$	$>0,05$
	Спленоциты	3438 ± 93	1370 ± 80	1080 ± 68	$<0,01$	$<0,01$	$0,01 < p < 0,05$
	Клетки лимфоузлов	2952 ± 75	2191 ± 56	2156 ± 233	$<0,01$	$<0,01$	$>0,05$

Примечание: p — степень достоверности различий между интенсивностью обмена в нативных клетках и клетках, контактировавших с ПЭО-400 в течение 15 мин; p_1 — степень достоверности различий между интенсивностью обмена в нативных и деконсервированных клетках; p_2 — степень достоверности различий между интенсивностью обмена в клетках, обработанных ПЭО-400 и деконсервированных.

Следовательно, криопротектор ПЭО-400, несмотря на выраженный защитный эффект при замораживании, вместе с тем не лишен некоторых токсических свойств по отношению к тканевым лимфоцитам, о чем свидетельствует снижение интенсивности метаболических процессов в лимфоидных клетках, обработанных ПЭО-400. Замораживание под защитой ПЭО-400, являясь эффективным методом консервации, все же вызывает некоторое снижение интенсивности обменных процессов в тканевых лимфоцитах.

1. Кеннел Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1970, с. 138—145.
2. Farrant J., Knight S. C., Morris D. J. Use of different cooling rates during freezing to separate populations of human peripheral blood lymphocytes. — Cryobiology, 1972, 9, N 6, p. 516—525.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
10.03.78

УДК 57.043:517.174.5

Н. Ф. Губина

ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ НА ЗАХВАТ НОРАДРЕНАЛИНА И АДРЕНАЛИНА НЕКОТОРЫМИ ОРГАНАМИ

В связи с тем что симпато-адреналовая система осуществляет регуляторное адаптационно-трофическое влияние на все процессы жизнедеятельности [2], функциональное состояние адренергических звеньев консервируемых органов и тканей может иметь существенное значение для прогноза восстановления функций обеспечения адекватных условий криоконсервирования биологических объектов. Одним из наиболее важных в обмене катехоламинов является активный процесс связывания и транспорта их через биологическую мембрану: нейрональную, везикулярную и др. [1].

В настоящей статье исследовалось состояние процесса захвата катехоламинов в адренергических структурах: семявыносящий проток *Vas deferens* крыс, иннервируемый преимущественно адренергическими (норадренергическими) нейронами, гипоталамус крыс (нервная структура), предсердия крыс и быка.

Таблица 1
Захват *L*-норадреналина
семявыносящим протоком крыс
и срезами предсердий быка
после выдерживания их
при различных температурах,
мкг/г ткани

Температура °C	Семявыно- сящий проток крыс	Предсердие быка
37	13,3±0,7	38,8±5,6
20	10,9±0,8	28,2±2,7
4	15,3±0,5	25,8±3,3
0	17,2±2,2	34,4±3,9
-20	7,4±0,5*	27,6±1,7

* Статистически достоверные различия по отношению к 37°C.

Ткани выдерживали 60 мин при температуре +37, +20, +4, 0, —20, —196°C и затем инкубировали их с гормонами-медиаторами в течение 30 мин при 37°C. Запасы катехоламинов в семявыносящем протоке опустошали предварительной инкубацией с тирамином (0,2 мМ, 120 мин). В опытах использовали *L*-норадреналин (30 мкг/мл) и радиоактивный препарат *D, L*-адреналин-³H (0,05 мCi/мл) с удельной радиоактивностью 4 Ки/мМ. Захват норадреналина определяли с помощью флюориметрического триоксииндолового метода В. О. Осинской, захват радиоактивного адреналина-³H на жидкостном сцинтиляционном счетчике «Интертекник» (Франция). Проведенные опыты показали, что захват норадреналина клетками семявыносящего протока крыс имеет тенденцию к снижению при экспозиции +20° и к восстановлению при +4 и 0°C.

Подобная зависимость наблюдается при воздействии этих температур на срезы предсердий быка (табл. 1), однако тенденция к реституции процесса отмечена только при 0°C. Аналогичные опыты проведены с применением *D, L*-адреналина-³H. Получены следующие данные: под влиянием охлаждения до 20 и 4°C снижается способность семявыносящего протока крыс к захвату адреналина-³H и увеличивается при предварительном выдерживании при 0°C (табл. 2). В результате замораживания (—20°, —196°C) отмечается резкое угнетение спо-

способности семявыносящего протока к захвату гормона-медиатора. Подобные результаты обнаружены при охлаждении гипоталамуса крыс. Для данной структуры характерно сохранение процесса захвата при температуре, близкой к нулю, с последующим ингибированием при дальнейшем охлаждении. Предсердия крыс и быка при понижении температуры также частично теряют способность к захвату адреналина- 7^3H .

Влияние температуры на захват адреналина — 7^3H некоторыми органами животных, имп/мин на 1 г ткани

Температура, °C	Vas deferens крыс	Предсердие крыс	Гипоталамус крыс	Предсердие быка
37	17306±647	31266±3200	8353±387	3454±248*
20	12228±1130*	24771±3520	—	2376±253
4	13429±1462*	17176±972*	9365±652	—
0	17780±2070	22749±1021*	—	2631±494*
— 20	4309±290*	12471±1203*	4562±290	—
—196	3697±405*	16995±238	—	1895±158*

* Достоверные различия по отношению к 37° C.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о существовании определенной закономерности в изменении активности захвата адреналина и норадреналина адренергическими структурами при их выдерживании при положительных и отрицательных температурах. Это проявляется в ингибировании процесса захвата после 60 мин выдерживания исследованных тканей при 20 и 4° и восстановлении при 0°С. Указанная закономерность может быть связана с вызванными температурой фазовыми изменениями липидных компонентов мембран рецепторного аппарата [3].

1. Авакян О. М. Симпато-адреналовая система. — Л.: Наука, 1977. — 184 с.
2. Орбели Л. А. Лекции по физиологии нервной системы. — Л.: Наука, 1938. — 269 с.
3. Mc Murchie E. J., Raison J. K., Cairncross K. D. Temperature induced phase changes in membranes of heart: a contrast between the thermal response of poikilotherms and homeotherms. — Comp. Biochem. and Physiol. B, 1973, 44, № 4, p. 1017—1026.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08.05.78

УДК 57.043:616.419—089.843:612.119

О. А. Дроздова, А. Н. Гольцев, Л. В. Останкова

ХАРАКТЕР ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРОВЕТВОРЕНИЯ У ЛЕТАЛЬНО ОБЛУЧЕННЫХ РЕЦИПИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТРУПНОГО КОСТНОГО МОЗГА

Результаты изучения биологической полноценности трупных миеелокариоцитов [1—6] свидетельствуют о том, что трупный костный мозг, как и донорский, может успешно применяться в клинике для лечения гемодепрессий различного генеза.

Цель данной статьи — изучение функциональной активности трупных миеелокариоцитов в организме летально облученных реципиентов.

В опытах использовали мышей линии СВА — доноры и (СВАХ × С₅₇Bl); F₁ — реципиенты. Для получения трупного костного мозга мышей забивали и тушки в течение 2; 6; 12 ч хранили при температуре +4°С. Костный мозг вымывали из бедренных костей раствором ЦОЛИПК-3. Количество жизнеспособных клеток в образцах донорско-

го костного мозга составляло $(96,1 \pm 3,9\%)$. В трупном костном мозге, полученном спустя 2, 6, 12 ч после смерти, этот показатель был равен соответственно $92,6 \pm 4,1\%$; $88,4 \pm 4,3\%$; $83,7 \pm 3,8\%$.

Через 4—5 ч после облучения мышам внутривенно вводили мие-локарициты в количестве 5×10^6 ядерных клеток. В крови реципиен-тов определяли количество лейкоцитов и эритроцитов, изучали кле-точный состав гемо- и миелограмм с помощью мазков-отпечатков, уро-вень метаболической активности (по интенсивности включения мече-ных предшественников). Пролиферативную активность и характер диф-ференцировки пересаженных миелокарицитов определяли по указан-ному в работе методу [7].

На 8-е сут. под влиянием трансплантаций донорского (ДКМ) и трупного костного мозга, изъятых через 2; 6; 12 ч после смерти, соответственно ТКМ₂, ТКМ₆, ТКМ₁₂, в крови реципиентов достоверно увеличилось количество лейкоцитов и эритроцитов по сравнению с их содержанием у облученных животных. Причем эти показатели в крови реципиентов при пересадке ТКМ₂, ДКМ и ТКМ₆ достоверно не отли-чались ($p > 0,05$). Только при трансплантации ТКМ₁₂ число лейкоцитов и эритроцитов в крови было достоверно ниже, чем у мышей, которым вводили ДКМ, ТКМ₂, ТКМ₆ (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Показатели восстановления гемопоза в организме летально облученных мышей на 8-е сутки после трансплантации донорских и трупных миелокарицитов

Воздей- ствие на костный мозг	Количество лейкоцитов				Количество эритроцитов			
	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}} \pm$	p^*	p_1^{**}	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}} \pm$	p	p_1
Облучение	$0,2 \times 10^3$	0,01			$4,9 \times 10^6$	0,2		
ДКМ	$1,0 \times 10^3$	0,07	$< 0,05$		$8,8 \times 10^6$	0,8	$< 0,05$	
ТКМ ₂	$0,9 \times 10^3$	0,05	$< 0,05$	$> 0,05$	$8,5 \times 10^6$	0,6	$< 0,05$	$> 0,05$
ТКМ ₆	$0,8 \times 10^3$	0,08	$< 0,05$	$> 0,05$	$7,8 \times 10^6$	0,6	$< 0,05$	$> 0,05$
ТКМ ₁₂	$0,5 \times 10^3$	0,06	$< 0,05$	$< 0,05$	$6,1 \times 10^6$	0,4	$< 0,05$	$< 0,05$

* p — по сравнению с контролем; ** p_1 — ТКМ₂, ТКМ₁₂ по сравнению с ДКМ.

В гемограммах реципиентов опытных групп по сравнению с облу-ченным контролем значительно возросло число нейтрофилов ($51,3 \pm \pm 2,4\%$), снизилось содержание ретикулярных клеток ($p < 0,05$).

При сравнении количественных соотношений между клеточными элементами в гемограммах реципиентов с трансплантатами ДКМ, ТКМ₂, ТКМ₆ достоверных отличий не выявлено ($p > 0,05$).

Лишь при пересадке ТКМ₁₂ в крови реципиентов количество ней-трофилов было достоверно ниже, а содержание ретикулярных клеток — выше ($p < 0,05$) по сравнению со значениями аналогичных показателей в гемограммах облученных животных, получающих ДКМ, ТКМ₂, ТКМ₆.

Параллельно в костном мозге реципиентов всех опытных групп происходила активная пролиферация эритроидно-миелоидного ростка кроветворения, о чем свидетельствовало появление бластов, миелоци-тов, юных, мегакариоцитов, достоверно увеличился процент пронормо-бластов, нормобластов, нейтрофилов, лимфоцитов по сравнению с со-держанием этих клеточных элементов в миелограммах облученных мышей.

В то же время существенных различий в характере миелограмм реципиентов, которым вводили ДКМ и ТКМ₂, не отмечалось. При вве-дении ТКМ₆, ТКМ₁₂ в костном мозге реципиентов содержание ретику-лярных клеток достоверно было выше ($32,7 \pm 1,7\%$ и $6,5 \pm 1,2\%$) ($p < < 0,05$), а количество бластов, миелоцитов, метамиелоцитов, нейтрофи-лов, пронормобластов, нормобластов было ниже (p во всех случаях

$<0,05$) по сравнению с таковыми в миелограммах мышей, получавших ДКМ, ТКМ₂. Подобные различия отмечались при сравнении миелограмм реципиентов с трансплантатом ТКМ₁₂ или ТКМ₆. Количество лимфоцитов в костном мозге реципиентов опытных групп было низким и в среднем составляло $13,3 \pm 0,9\%$, причем достоверных различий не было.

В костном мозге реципиентов опытных групп процент клеток, меченных ^3H — Т, ^3H — У, ^3H — Л, был выше ($p < 0,05$), чем их количество в облученном контроле. Число меченых клеток в костном мозге реципиентов с пересадкой ДКМ, ТКМ₂, ТКМ₆ было одинаковым ($p > 0,05$) и достоверно выше, чем содержание их в костном мозге реципиентов с трансплантатом ТКМ₁₂.

На 8-е сут после пересадки ДКМ, ТКМ₂, ТКМ₆, ТКМ₁₂ в селезенках реципиентов появлялись макро- и микроскопические колонии.

При гистологическом исследовании в селезенках реципиентов опытных групп определялись в основном зрелые колонии эритроидного, миелоидного, смешанного, мегакариоцитарного типов. Количество колоний миелоидного типа в селезенках реципиентов с трансплантатом ДКМ, ТКМ₂ и ТКМ₆ достоверно не различалось ($p > 0,05$). В свою очередь количество колоний миелоидного типа в селезенках реципиентов при пересадке ТКМ₁₂ было ниже ($p < 0,05$), чем при пересадке ДКМ, ТКМ₂, ТКМ₆. Содержание других типов колоний в селезенках животных опытных групп достоверно не различалось ($p > 0,05$).

Таким образом, успех трансплантации трупных миелокариоцитов зависит от их исходного состояния. С увеличением срока от момента смерти в гемопоэтической ткани происходят определенные изменения, обусловленные, по всей видимости, действием постмортальных факторов. Не исключено, что эти факторы могут оказывать ингибирующее действие и на стволовые клетки костного мозга, в результате чего скорость их дифференцировки будет снижена. Это, в свою очередь, может обуславливать более поздний выход из гемопоэтических колоний зрелых клеточных элементов в кровотоки, что и наблюдается у реципиентов с трансплантатом костного мозга, полученного через 12 ч после смерти.

1. Лаврик С. С., Кейсевич Л. В., Карабанова Л. Л., Глухенькая Г. Т., Когут Г. И., Афанасьева Ю. Е. Оптимальные сроки заготовки посмертного костного мозга. — В кн.: Гематология и переливание крови. Киев: Здоров'я, 1973, с. 59—64.
2. Пушкарь Н. С., Шенберг М. Г., Иткин Ю. А., Обозная Э. И., Симонова Л. И., Останкова Л. В. Сохранность трупной миелоидной ткани в условиях глубокого холода. — В кн.: Трансплантация органов и тканей: Материалы VI Всесоюз. науч. конф. по пересадке органов и тканей. Рига, 1972, с. 496—497.
3. Федоров Н. И. Влияние условий хранения трупа на состояние родоначальных клеток костного мозга. — В кн.: Трансплантация тканей в восстановительной хирургии: Тез. докл. VII Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Ростов н/Д, 1976, с. 77—78.
4. Холодный А. Я., Петренко Г. И., Багаутдинов Ш. М., Турбина И. Л., Руденко Н. Н., Киселева М. В. Опыты применения полиэтиленоксида-400 (ПЭО-400) при низкотемпературном замораживании клеток посмертного костного мозга. — Пробл. гематологии, 1976, № 12, с. 49—50.
5. Fiala J. On the transplantability of cadaver bone marrow. In vivo determination of the viability of mouse bone marrow cells. — *Physiol. bohemosl.*, 1970, 19, N 5, p. 441—445.
6. Perry I. P., Stevenson R. E., McFarland W., Link C. A. Motility studies of human postmortem bone marrow. — *Blood*, 1960, 16, N 1, p. 1020—1028.
7. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. — *Rad. Res.*, 1961, 14, N 2, p. 213—222.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.03.78

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ВОДЫ НЕКОТОРЫМИ БИОМАТЕРИАЛАМИ

Существование в дисперсных системах биологической природы некоторой части воды, не переходящей в льдоподобное состояние ниже точки замерзания основной массы растворителя, подтверждается экспериментально. Например, исследования теплоемкости различных биологических объектов методом дифференциальной сканирующей калориметрии показали, что часть воды в системе не испытывает фазового перехода в лед при охлаждении вплоть до температуры жидкого гелия и не плавится при последующем нагревании [2].

Методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) показано, что при температурах от -70 до -80°C некоторая часть воды в биологических системах сохраняет более высокую подвижность, чем в кристаллической решетке льда [4, 5]. Такая вода была идентифицирована как связанная с гидрофильными центрами макромолекул.

Цель настоящей статьи — исследование причин, препятствующих переходу связанной воды в кристаллическое состояние при охлаждении.

Для этого мы исследовали состояние связанной с биоматериалами воды, используя различные физические методы: разработанный нами метод десорбционной калориметрии [3], методы термогравиметрии и ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения.

В работе использованы следующие материалы: *L*-серин производства фирмы «Реанал» и *L*-лизин производства той же фирмы, а также вирусные вакцины — противобруцеллезная и против болезни Нью-Касла (штамм Ла-Сота) в разных защитных средах: из сахарозы, желатины, декстрана и обезжиренного молока.

Чистоту *L*-лизина и *L*-серина проверяли хроматографически на приборе Хром-2. В пределах чувствительности прибора примесей других аминокислот не обнаружили. Вирусвакцины в защитных средах предоставлены Всесоюзным научно-исследовательским и технологическим институтом биологической промышленности МСХ СССР и использовались в таком виде, в каком они применяются при промышленном производстве бакпрепаратов.

Теплоту испарения воды измеряли с помощью дифференциального микрокалориметра, описанного в работе [3]. Дериватографические исследования проводили на приборе типа «ОД-102» системы Ф. Паулик, И. Паулик, Д. Эрдей. Спектры ЯМР снимали на спектрометре высокого разрешения РЯ-2305, система термостатирования образца позволяла поддерживать температуру с точностью до $\pm 1^{\circ}$.

Из измерений теплоты испарения воды мы стремились получить информацию об энергии, которую нужно сообщить молекулам H_2O , связанным с гидрофильными центрами биоматериалов, чтобы разорвать эти связи. При этом полагали, что за связывание воды в лиофильно высушенном состоянии и в растворе ответственны одни и те же участки исследуемых молекул. Теплоту испарения измеряли из лиофильно высушенных до постоянного веса материалов, которые затем увлажняли, выдерживая их в парах воды при фиксированном значении P/P_s (P_s — давление насыщенных паров воды при данной температуре, P — давление паров воды в сосуде с образцом). Степень увлажнения меняли, изменяя величину P/P_s . Увлажненный таким образом образец помещали в рабочую ячейку микрокалориметра и после установления теплового равновесия в камере микрокалориметра создавали вакуум. При этом происходила десорбция молекул H_2O , погло-

щенных биоматериалом, а тепловая мощность десорбции P как функция от времени регистрировалась на самописце. Теплоту испарения в расчете на 1 г испаренной воды находили по формуле

$$Q_{\text{исп}} = \frac{\int_0^T P(t) dt}{m} \tag{1}$$

где $P(t)$ — тепловая мощность испарения как функция от времени; T — время, в течение которого происходило испарение, m — масса испаренной воды. Интеграл в формуле (1) вычисляли методом графического интегрирования.

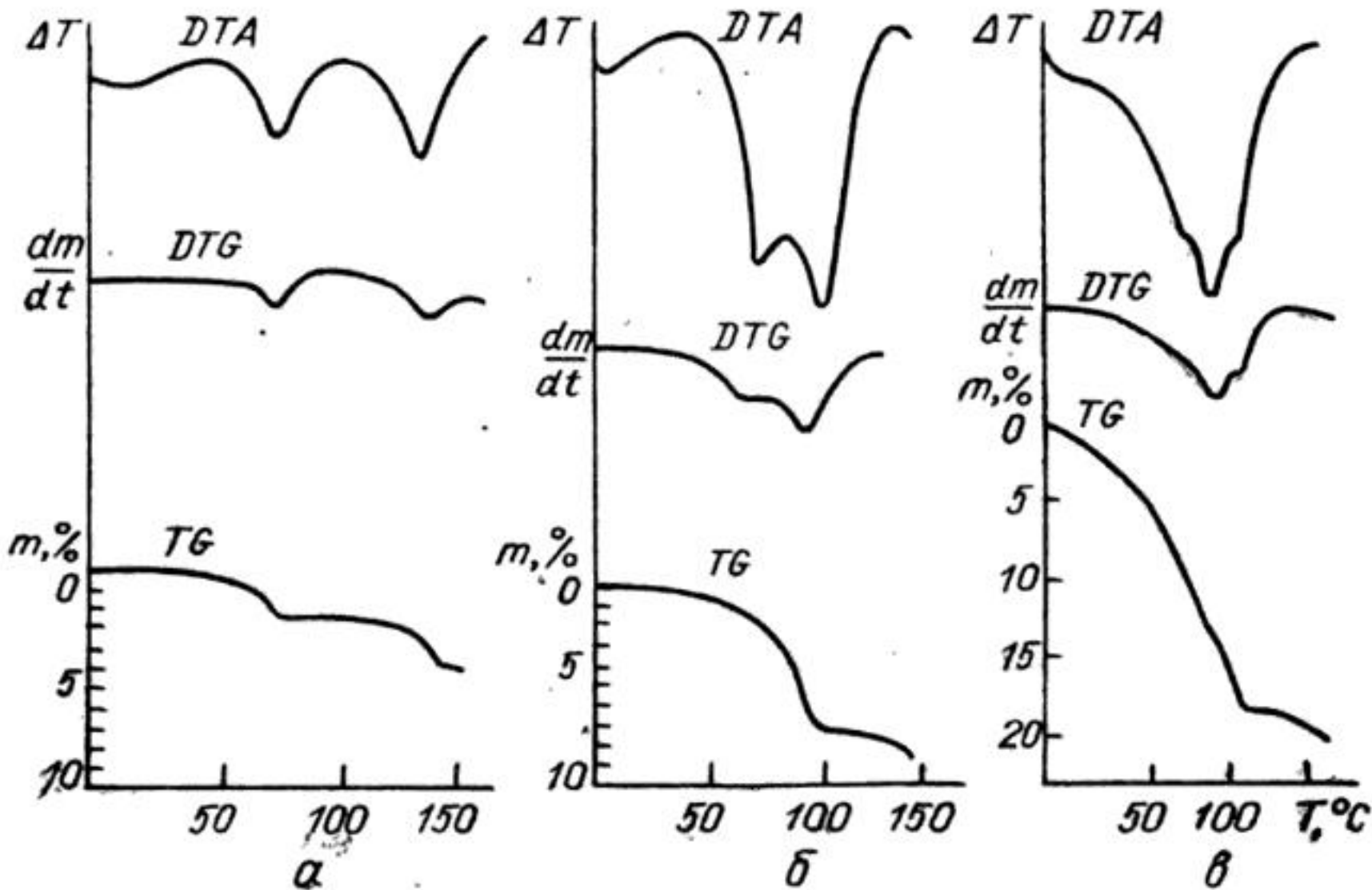


Рис. 1. Изменение TG, DTG и DTA образцов лизина различной степени влажности:
а — 3,5; б — 8; в — 25%. Скорость нагрева 5°С/мин.

Значения теплот испарения воды из образцов лизина $Q_{\text{исп}}$ различной влажности при температуре +22°С представлены ниже. Влаж-

Влажность, %	$Q_{\text{дес}} \pm 20$ кал/г	Влажность, %	$Q_{\text{дес}} \pm 20$ кал/г
1,8	714	4,2	700
2,4	715	4,5	700
2,92	705	16	616
3,14	696	20	550

ность образцов указана как количество воды, приходящейся на единицу веса лизина ($\Delta m/m$) в процентах. Видно, что в области малых влагосодержаний (1,8—4,5%) величина $Q_{\text{исп}}$ на 125—135 кал/г превышает теплоту испарения чистой воды. По мере увлажнения лизина теплота испарения воды уменьшается и при $\Delta m/m \geq 18\%$ (что соответствует 1,47 молекул воды на молекулу лизина) становится равной теплоте испарения чистой воды. Следовательно, при этой влажности заканчивается заполнение связей воды с лизином, а при дальнейшем увлажнении молекулы H_2O образуют водородные связи между собой (таблица).

Аналогичные результаты получены и для вирусвакцин в различных защитных средах. Теплоты испарения воды из образцов лизина раз-

личной влажности приведены ниже. Эти системы имеют более сложное строение и содержат в своем составе вирусы, белки и другие органические вещества.

Таблица 1

Результаты исследования испарения воды, связанной с образцами биопрепаратов исходной влажности 3,5%

Препарат	Состав защитной среды	Навеска, мг	Количество испарившейся воды, %	Теплота испарения на 1 г H ₂ O	Температура, °C
Чистая среда для бруцеллезной вакцины	Сахароза (5%) + желатин (1,2%) + декстран (2%)	362,6	1,6	664	40
	Сахароза (5%) + желатин (7%) + декстран (5%)	248	0,9	604	50
Противобруцеллезная вакцина в различных средах	Сахароза (5%) + декстран (5%)	259,8	1,1	640	50
	Сахароза (5%) + желатин (0,7%) + декстран (5%)	237,2	0,7	670	50
	Сахароза (5%) + желатин (5%) + декстран (5%)	453,8	0,8	690	50
Противобруцеллезная вакцина в различных средах, штамм 82	Сахароза (5%) + желатин (0,7%) + декстран (5%)	473,8	0,8	710	50
Сухая вирусвакцина против болезни Нью-Касла, штамм «Ла-Сота»	Обезжиренное молоко Пептон (5%)	117	1,2	674	50
		149,2	0,8	616	50
		149	1,0	624	50

При влажности образцов менее 20% теплота испарения воды превышает этот показатель для чистой воды, причем различие составляет 80—120 кал/г H₂O. Принимая во внимание, что теплота кристаллизации воды равна примерно 80 кал/г, на основе полученных данных можно сделать вывод, что в растворах биоматериалов переход связанной воды в кристаллическую решетку льда энергетически невыгоден.

С целью получения дополнительной информации о характере связывания молекул H₂O с лизином мы исследовали испарение воды из него при различной начальной влажности в процессе нагрева образцов в дериватографе. Лизин увлажняли тем же методом, что и для калориметрических исследований.

На рис. 1 представлены данные весового изменения (*TG*), скорости изменения веса (*DTG*), скорости изменения энтальпии (*DTA*) в зависимости от ее температуры при нагреве увлажненных образцов лизина со скоростью 5° в 1 мин.

На кривой *DTA* наблюдаются два пика, свидетельствующие о двух эндотермических процессах, связанных с испарением воды. Максимальная скорость изменения энтальпии приходится на 65 и 130° при влажности 3,5%, а также на 65 и 100° при влажности 8%. При этих же температурах возрастает скорость потери веса образцов, что видно из кривых *TG* и *DTG*. В образце влажностью 25% (рис. 1, в) испарение начинается практически при комнатной температуре, а максимум эндотермичности приходится на 100°C и связан, вероятно, с потерей сво-

бодной воды. Пики от связанной воды на фоне интенсивного сигнала свободной воды различаются слабо.

Наблюдаемые два максимума эндотермичности позволяют сделать заключение о существовании воды в двух состояниях, отличающихся по степени связи с молекулами лизина. По-видимому, в области высоких температур регистрируется испарение воды, молекулы которой связаны с лизином более прочно, чем в чистой воде. По мере увеличения влажности возрастает доля воды, теплота испарения которой близка к таковой в чистой воде, в результате чего максимум эндотермического эффекта смещается к низким температурам.

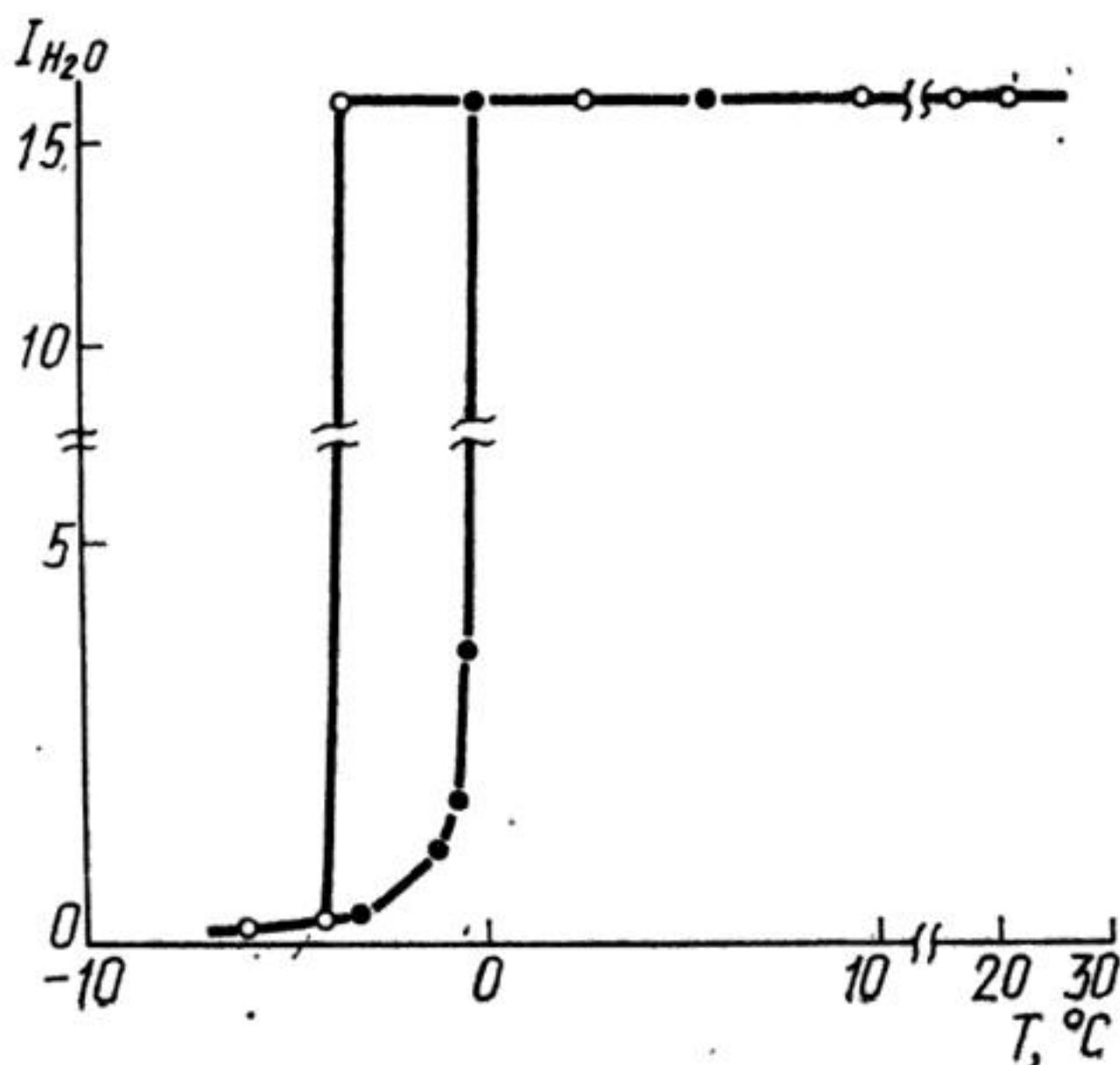


Рис. 2. Температурная зависимость интенсивности линии протонов воды в спектрах ЯМР водного раствора серина.

Методом ЯМР исследовали подвижность молекул воды в растворе *L*-серина в интервале температур от 30° до -10° . Температура менялась медленно, после каждого изменения ее на один-два градуса смеси выдерживали в течение 1—2 ч для установления равновесия.

На рис. 2 представлена температурная зависимость интенсивности линии протонов воды в спектрах ЯМР водного раствора серина. На оси ординат отложено количество подвижной воды в системе в граммах на 1 г сухого вещества, вычисленное из площади под кривой поглощения протонов H_2O .

Как видно из рис. 2, на кривой охлаждения интенсивность линии протонов воды выше 0°C не зависит от температуры. При некоторых температурах ниже 0°C , различных для разных концентраций смеси, происходит сильное уменьшение интенсивности линии, что может быть объяснено вымораживанием основной массы свободной воды, в результате чего сигнал ЯМР сильно уширяется и не регистрируется в спектре. Молекулы связанной воды сохраняют относительно высокую подвижность, причем их количество в расчете на 1 г серина составляет при температуре -8°C примерно 0,3 г H_2O .

Возрастание интенсивности линии H_2O при повышении температуры идет по другим ветвям, расположенным ниже кривых замораживания и совпадающим с ними выше 0°C (рис. 2). Существование температурного гистерезиса и форма гистерезисной петли обусловлены, по-видимому, особенностями льдообразования системы вода — се-

рин, подобно тому как это имеет место в системах, содержащих воду и водорастворимые полимеры [1], в которых кристаллизация начинается в переохлажденном состоянии системы, а фазовый переход в жидкое состояние растянут на интервал температур.

Таким образом, приведенные данные указывают на существование воды, сохраняющей подвижность ниже точки замерзания основной массы растворителя. Переход связанной воды в кристаллическую решетку льда энергетически невыгоден в силу ее прочной связи с гидрофильными участками растворенных молекул. Последнее заключение вытекает из измерений теплот испарения воды и анализа результатов исследования состояния воды в системе методом дериватографии.

1. Зинченко В. Д., Манк В. В., Моисеев В. А., Овчаренко Ф. Д. Исследование водных смесей полиэтиленгликолей методом ЯМР. — Коллоид. журн., 1977, 39, № 1, с. 30—35.
2. Мревлишвили Г. М., Бакрадзе Н. Г., Монаселидзе Д. Р., Джапаридзе Г. Ш. Гидратация биополимеров. — В кн.: Конформационные изменения белков в растворах. М.: Наука, 1973, с. 137—140.
3. Пушкарь Н. С., Моисеев В. А., Зинченко А. В., Зинченко В. Д. А. с. № 553529 (СССР). Устройство для измерения интегральной теплоты десорбции жидкостей и газов. — Оpubл. 12.05.77.
4. Sussman M. V., Chin L. Liquid water in frozen tissue: Study by nuclear magnetic resonance. — Science, 1976, 151, N 3708, p. 324—325.
5. Kuntz I. D. Hydration of macromolecules. IV. Polypeptide conformation in frozen solution. — J. Amer. Chem. Soc., 1971, 93, N 2, p. 516—518.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.03.78

УДК 57.043.576.3.347:578.69

А. С. Капрельянц, Ю. И. Анисимов, Л. Ю. Курасова

АЛГОРИТМЫ АВТОМАТИЧЕСКОГО МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛЕТКИ

В различных областях биологии и медицины все большее распространение получают количественные методы оценки ультраструктуры клеток и тканей. Наиболее широко используются «ручные методы» расчета параметров с фотографий, негативов и т. д., основанные на использовании стереологических подходов, сформулированных в работах [2, 3] и др. Такое положение обусловлено почти полным отсутствием специальных приборов, позволяющих проводить автоматический анализ электронно-микроскопических объектов в процессе исследования.

В СССР группой авторов [1] разработан новый прибор — электронный микроскоп-анализатор (ЭМВ-100А, АК), позволяющий производить автоматический анализ электронно-оптической плотности исследуемого объекта. Дальнейшее развитие этих работ привело к созданию комплекса технических средств, состоящих из электронного микроскопа, блоков согласования и ЭВМ, которые обеспечивают преобразование изображения в «цифровую матрицу» для машинного морфометрического анализа.

Цель настоящей статьи — разработка алгоритмов получения ряда морфометрических показателей клетки для их машинной реализации. Основными морфометрическими показателями, которые можно использовать в дальнейшем с целью решения различных задач, нами были выбраны следующие: площадь клетки, площадь ядра, площадь гранул, периметр клетки и ядра, максимальные размеры клетки (по длине и ширине), максимальные размеры ядра, размеры гранул. При на-

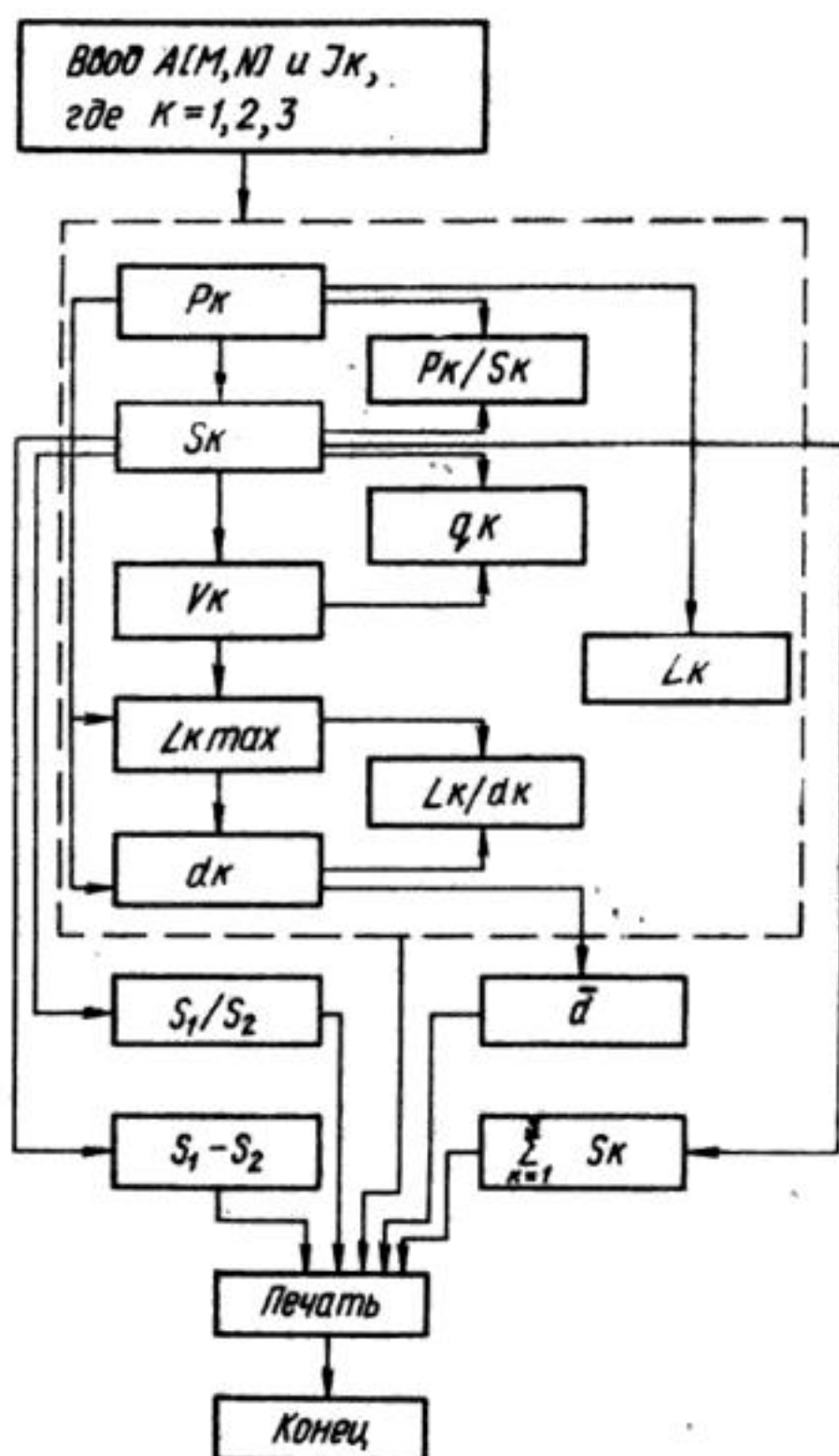


Рис. 1. Блок-схема алгоритма определения основных морфометрических параметров клетки.

алгоритм выделения контура объекта (рис. 2), где ВІ — массив элемента матрицы, образующей периметр; КВ — число элементов массива ВІ; Х и У — массив координат граничных точек. Согласно алгоритму граничный элемент должен удовлетворять трем условиям: принадлежать нашей клетке, число рядом лежащих элементов не должно быть равно 0 или 8 и искомый граничный элемент должен лежать рядом с другим граничным элементом. Сформированный при этом массив граничных точек может быть использован при нахождении максимальной ширины клетки. Для этого применен геометрический подход (рис. 3), где К — порядковый номер граничной клетки (I, K, M).

Предложенные алгоритмы реализованы в виде программ и могут быть использованы не только для получения морфометрических показателей, но и применимы для решения задач по классификации и распознаванию объектов.

1. Барзилович П. П., Пушкарь Н. С., Кобыляков В. А., Гладких Т. П., Яременко В. М., Капличный В. Н., Шуляк Э. А., Капрельянец А. С., Иткин Ю. А., Цуцаева А. А. А.с. 399937 (СССР). Электронный микроскоп-анализатор просвечивающего типа, например, биологических объектов. — Оpubл. в Б. И., 1973, № 39, с. 156.
2. Вейбель Е. Морфометрия легких человека: Пер. с англ. — М.: Мир, 1970. — 153 с.
3. Салтыков С. А. (1935). — Цит. по: Автандилов Т. Г. Морфометрия в патологии. — М.: Медицина, 1973. — 247 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.04.78

хождении количественных значений этих показателей легко вычисляются отношения площади ядра к площади клетки, площади гранул к площади клетки, периметра клетки к ее площади, периметра ядра к его площади, а также некоторые другие. Таким образом, для получения перечисленных выше показателей необходимо определение в первую очередь значений площади, периметра, длины, ширины, «объема поглощенного вещества» и удельной оптической плотности. Блок-схема алгоритмов нахождения этих морфометрических показателей электронно-микроскопического изображения клетки представлена на рис. 1, где J_k — уровень фоновой оптической плотности, окружающей объект (клетку, ядро и т. д.); $A(M, N)$ — цифровая матрица, характеризующая оптическую плотность электронно-микроскопического изображения, где M — максимальное число строк, N — число элементов в строке; $A(I, J)$ — элемент матрицы, где M номер строки (I, M); N — номер элемента в строке ($1, N$).

Для получения значения периметра предлагается следующий ал-



Рис. 2. Блок-схема алгоритма выделения контура изображения.

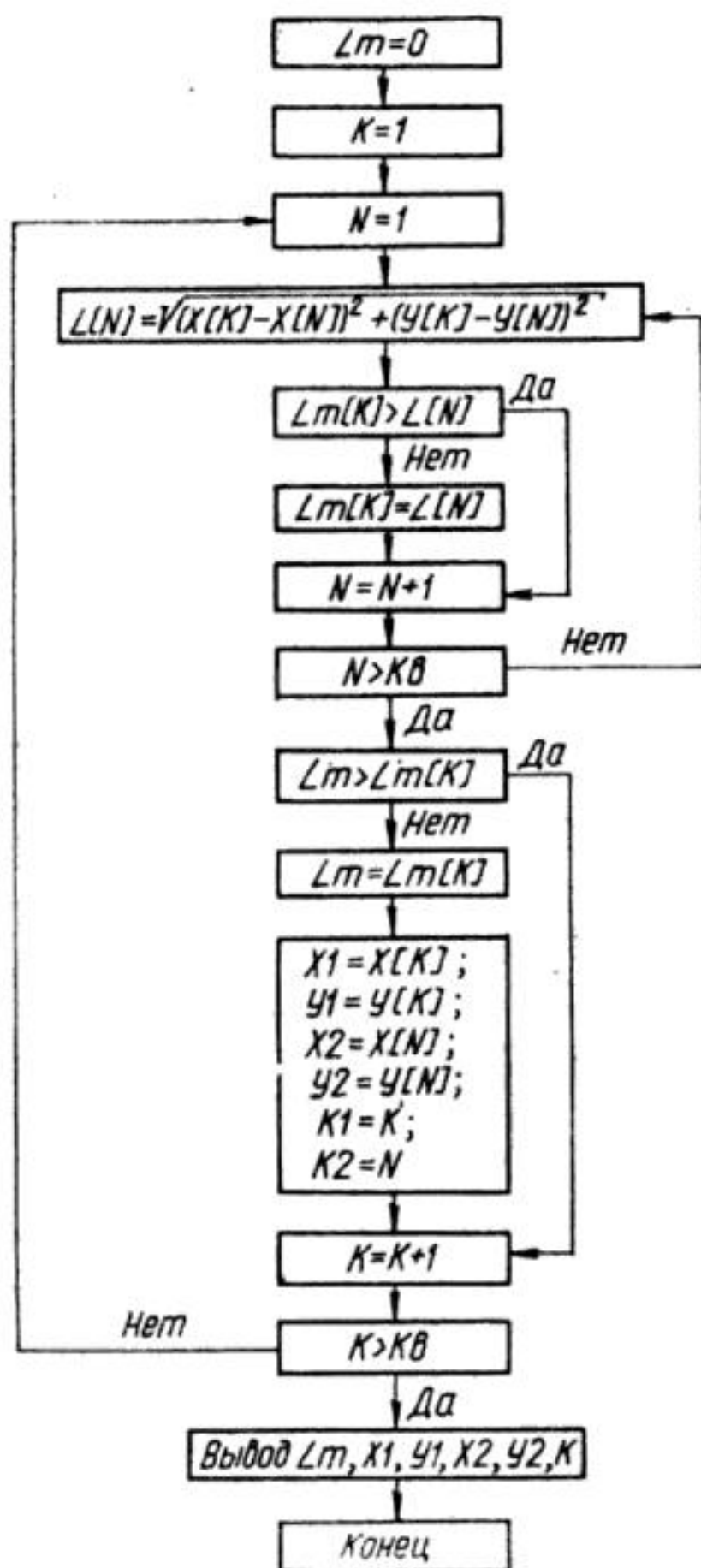


Рис. 3. Блок-схема алгоритма нахождения максимальной ширины клетки.

УДК 57.043

Л. П. Киндзельский, В. А. Курлянд

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ КРИОГЕННОГО И ЛУЧЕВОГО МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

В настоящее время криохирургические воздействия применяют с целью повышения эффективности лечения онкологических больных [1, 3—6]. Несмотря на то что метод внедряется в клинику, его нельзя считать теоретически и экспериментально обоснованным. Недостаток метода — невозможность девитализации только опухолевых клеток, инфильтрирующих нормальные ткани. Поиск средств, способных разрушать опухолевые клетки, диссеминирующие в нормальных тканях, привели к сочетанному применению лучевой терапии с криодеструкцией. При радиотерапии достигается в первую очередь гибель низкодифференцированных клеток и клеток периферических отделов опу-

ли, а также рассеянных в окружающих тканях микродиссеминатов опухоли [2].

Указанные и другие особенности механизмов повреждающего действия криохирургии и лучевого лечения явились предпосылкой для их совместного применения в терапии злокачественных опухолей. Поскольку результаты исследований эффективности лечения опухолей комбинированным методом ни в отечественной, ни в зарубежной литературе не приводились, нам представляется целесообразным провести апробацию его в эксперименте.

Материал и методы. Исследования проведены на 468 крысах с перививной карциномой Герена. Опухоли у подопытных животных подвергались криовоздействию, лучевой терапии, комбинированному лечению.

Криовоздействие (методом аппликации) на опухоли производили на приборе (криотоме), сконструированном в Институте физики АН УССР. Диаметр аппликатора — 9 мм, температура на его рабочей поверхности равна $-180 \div -196^\circ$. Хладоагент — жидкий азот. Замораживание каждой опухоли производили однократно. Для регистрации температуры в тканях термопары, вмонтированные в иглы, устанавливались в нормальных тканях на предполагаемых границах их с опухолью. Показания термопар регистрировались самописцем прибора КСП-4. Оттаивание опухолей происходило самопроизвольно. В проведенных ранее экспериментах по криохирургии опухолей обнаружено, что подведение температуры к границе опухоль — нормальная ткань ниже -40°C повреждает нормальные ткани и близлежащие органы, а выше $-15 \div -20^\circ\text{C}$ чаще всего ведет к прогрессированию опухолевого роста в ранние сроки после криодеструкции. Поэтому наиболее рациональным температурным режимом мы избрали условия, когда температура на максимально отдаленных от криоаппликатора участках опухоли составляла $-20 \div -40^\circ\text{C}$. В случае приложения аппликаторов диаметром 9 мм к опухолям, превышающим в объеме 15 см^3 и наибольшим диаметром более 2,8 см, не было отмечено положительного действия криодеструкции. Дальнейшие исследования проводились на опухолях, объем которых составлял $6,1 \pm 0,1\text{ см}^3$.

Облучение опухолей осуществляли на аппарате РУМ-17 при следующих технических условиях: 180 КВ, 10 мА, фильтры 0,5 Си+1Ае, мощность дозы — 100 рад/мин. Суммарные дозы локального фракционированного облучения составляли 6000 рад за 10 сеансов или 3000 рад за 5 сеансов, с интервалами между фракциями в 48 ч.

Опыты по сочетанному применению криовоздействия и облучения проводили по следующим схемам: 1 — облучение 6000 рад+криодеструкция; интервал между воздействиями 2 сут; 2, 3 — облучение 3000 рад+криодеструкция с интервалами соответственно 2 и 7 сут; 4—6 — криодеструкция+облучение 300 рад с интервалами соответственно 3, 7, 10 сут.

Контрольную группу составляли животные, опухоли которых не подвергались никаким воздействиям. Во всех сериях исследования для определения эффективности терапии после различных видов воздействия изучали: динамику роста (регрессии) опухолей, процент излеченных животных, продолжительность жизни неизлеченных животных, частоту и сроки возникновения истинных рецидивов.

Результаты и обсуждение. Одна из характеристик перививной карциномы Герена — отсутствие саморассасывания опухолей. В результате криохирургического лечения животных полная регрессия опухолей наблюдалась в 26% случаев. В результате облучения суммарной дозой 6000 рад излечено 40% животных, а суммарной дозой 3000 рад — 7% (рис. 1).

При лечении животных комбинированным методом — лучевая

терапия 6000 рад и криодеструкция — количество излеченных животных было наименьшим — 10%. Животные в этом опыте погибали от различных осложнений. В опытах, в которых животные получали лучевую терапию в сокращенной вдвое суммарной дозе (3000 рад), и криохирургическое воздействие, через 2 сут после окончания курса облучения оказалось наибольшее количество излеченных — 53%. При применении криодеструкции через 7 сут после лучевой терапии (3000 рад) излеченность составила 42,9%.



Рис. 1. Динамика гибели животных и эффективность криодеструкции и лучевой терапии карциномы Герена:

1 — контроль; 2 — лучевая терапия 6 000 рад; 3 — лучевая терапия 3 000 рад; 4 — криохирurgia.

облучении 6000 рад) наблюдался при применении сочетанной терапии с интервалом между воздействиями, равным 3 сут, — 35,5% (рис. 2). Значительное повышение числа излеченных животных, отмеченное при некоторых условиях комбинированного лечения, определяет перспективность применения сочетания изученных повреждающих факторов.

Достоверность полученных результатов, свидетельствующих о преимуществе некоторых способов комбинированного лечения по сравнению с эффективностью только криохирургии либо лучевой терапии, подтверждается также данными о продолжительности жизни животных, которая составляла 75 ± 14 ; 81 ± 7 и $83 \pm$

± 8 сут после различных методов комбинированного лечения по сравнению с 61 ± 3 и 50 ± 3 сут при лучевой терапии и криодеструкции.

Анализ данных о рецидивировании опухолевого роста свидетельствует также о целесообразности применения крио- и лучевой терапии опухолей. Так, при всех трех способах комбинированного лечения рецидивирование опухолевого роста не наблюдалось. В то время как при криохирургическом методе лечения количество рецидивов составляло 10,8%, при лучевой терапии (6000 рад) — 13%. Положительный эффект сочетания криохирургии с лучевой терапией подтвержден также при лечении животных с индуцированными ДМБА опухолями.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о предпочтительном применении лучевой терапии в сокращенном вдвое курсе с последующим криохирургическим воздействием через 2 сут и применении криохирургии с последующим облучением в сниженной вдвое суммарной дозе через 7—10 сут. Такие способы комбинированного лечения способствуют повышению терапевтической эффективности, что выражается в увеличении числа излеченных животных, удлинении продолжительности жизни неизлеченных крыс, предотвращении появления истинных рецидивов.

В случаях применения криодеструкции и последующего облучения 3000 рад самый высокий процент излеченных животных — 70 — достигнут в тех случаях, когда интервал между воздействиями составлял 10 сут. Несколько ниже этот показатель был в опытах с интервалом между воздействиями 7 сут (63,9%), и отрицательный эффект комбинированной терапии (ниже 40% при



Рис. 2. Динамика гибели животных и эффективность комбинированной криорадиотерапии карциномы Герена:

1 — контроль; 2 — 6000 рад+«крио», 2 с; 3 — 3000 рад+«крио», 2 с; 4 — «крио»+3000 рад, 3 с; 5 — «крио»+3000 рад, 10 с.

Большое значение в повышении эффективности лечения злокачественных новообразований комбинированным методом имеет возможность снижения вдвое дозы облучения. Это позволяет существенно снизить уровень повреждения окружающих опухоль здоровых тканей, уменьшить лучевое цитостатическое влияние на кроветворение, депрессивное влияние на реактивность организма и, естественно, создать лучшие условия для реализации терапевтического эффекта.

Полученные результаты дают основание полагать, что сочетанное применение криовоздействий и облучения может занять одно из ведущих мест в лечении различных злокачественных опухолей.

1. Кандель Э. И., Яворский В. В. Криохирургический метод в общей онкологии. — В кн.: Криохирургия. М.: Медицина, 1974, с. 290—302.
2. Киселева Е. С. Лучевая терапия при комбинированном лечении рака щитовидной железы. — Мед. радиология, 1975, 20, № 3, с. 44—48.
3. Пачес А. И., Птуха Т. П., Шенталь В. В. Криогенное воздействие в лечении больных опухолями головы и шеи. — Вестн. АМН СССР, 1974, № 4, с. 27—31.
4. Трушкевич Л. И., Птуха Т. П., Рикберг А. Б. Криохирургия опухолей кожи. — Онкология, 1973, № 4, с. 149—151.
5. Трушкевич Л. И. Криогенный метод при лечении злокачественных новообразований челюстно-лицевой области. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 118—122.
6. Schmidt I. D. Cryosurgical prostatectomy. — Cancer, 1973, 32, N 5, p. 1141—1144.

Киевский научно-исследовательский
рентгено-радиологический
и онкологический институт МЗ УССР

Поступила в редколлегию
06.04.78

УДК 57.043

Л. П. Киндзельский, В. Л. Юречко, Л. Л. Злочевская

РЕАКТИВНОСТЬ ОРГАНИЗМА ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ КРИОЛУЧЕВОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Классические методы лечения онкологических больных (лучевой и химиотерапии), применяемые самостоятельно или в комбинации, в большинстве случаев не дают желаемых результатов выздоровления и не всегда могут быть в силу различных причин применены. Эти методы оказывают особенно большое влияние на кроветворную и иммунную системы [1—3, 5]. В последние годы получены обнадеживающие результаты применения криотерапии при различных заболеваниях, в том числе и в онкологии.

Деструктивное замораживание ткани вызывает иммунную реакцию, и происходит образование антител против собственной ткани [6]. В ряде случаев после замораживания первичного очага отмечался регресс, или исчезновение, метастазов. Предполагается, что замораживание клеток опухоли ведет к высвобождению белковых молекул в кровяное русло, и это вызывает иммунологическую реакцию с образованием антител, которые разрушают метастазы опухоли [7].

Наличие в организме опухоли сопровождается полной перестройкой его реактивности, выражающейся в изменении специфического (противоопухолевого) и неспецифического иммунитета, в изменении состава крови, морфологии тканей и т. п. Все эти обстоятельства не могут не отразиться на количественном составе и биологических свойствах микрофлоры (аутофлоры), вегетирующей в организме опухоленосителя [4].

В настоящей статье мы определяли степень изменения иммунологических и гематологических показателей. Задачей исследований было

изучение количественных и морфологических показателей периферической крови, костного мозга и иммунологических сдвигов по тестам глубокой, и в том числе патогенной флоры кожи, способности организма к образованию бляшек гемолиза крови *in vitro* у крыс-опухоленосителей.

Указанные показатели исследовались у интактных животных, у крыс с привитой опухолью без лечения (контрольная группа) и на 3-и, 7-е, 15, 30-е и 60-е сут после криодеструкции, лучевой терапии в суммарной дозе 6000 рад на очаг (600×10), комбинированного (3000 рад и криовоздействие) лечения экспериментальных опухолей. Исследования были проведены на 250 белых беспородных крысах. Криодеструкция опухолей проводилась аппликационным методом с температурой на аппликаторе от -180° до -196°C .

В результате проведенных исследований установлено, что при лучевой терапии опухолей наблюдались значительные изменения в системе кроветворения и иммунологической системе. Количество миелокариоцитов на 3-и сут после облучения уменьшалось до 22% по сравнению с исходными показателями, а к 30-м сут наблюдалось их увеличение до 57%.

Несмотря на угнетение костномозгового кроветворения, количество лейкоцитов на 3-и, 7-е сут было в пределах нормы, а затем увеличилось до 21554 ± 4976 в 1 мм^3 на 15-е сут и 34334 ± 7356 в 1 мм^3 на 30-е сут. Количество эритроцитов и гемоглобина существенно не изменялось.

Глубокая аутофлора кожи в контрольной группе составляла $73,4 \pm \pm 2,1$ колонии, а после облучения в дозе 6000 рад резко возрастала. Так, на 15-е сут было $207,6 \pm 7,8$ колоний, на 30-е сут — $244,9 \pm 5,5$, а к 60-м количество их несколько снизилось и было равно $200,0 \pm 14,5$ колоний. Показатели патогенной флоры кожи также претерпевали изменения.

Так, если у опухолевых крыс патогенная флора кожи составляла 106,12 колоний и определялась в 8 случаях, то на 15-й день после облучения она выявлена в 14 случаях из 15, среднее количество колоний составляло 183. На этом уровне она оставалось до 30-х сут (180,1 колония), а к 60-м сут снижалась до исходных цифр.

Образование бляшек гемолиза у опухолевых крыс равнялось $0,143 \pm 0,001$, а после облучения значительно возрастало. Так, на 4-е сут их было $0,29 \pm 0,001$, на 15-е — $0,41 \pm 0,001$, на 30-е — $0,57 \pm 0,001$ и на 60-е сут несколько снижалось, но показатели были еще далеки от исходных, т. е. $0,46 \pm 0,001$.

При криодеструкции опухоли на 3-е, 7-е, 15-е сут наблюдался лейкоцитоз до $24\,792 \pm 2\,244$ в 1 мм^3 , однако количество лейкоцитов не превышало их содержания у контрольных опухолевых крыс. Количество эритроцитов существенно не изменялось, а содержание гемоглобина в эти периоды было несколько ниже, чем у интактных животных. На 30-е сут все показатели периферической крови нормализовались у вылеченных животных, а у крыс с рецидивами наблюдались значительные изменения. Так, содержание лейкоцитов повышалось в 2 раза по сравнению с опухолевым контролем, количество эритроцитов падало на 41%, содержание гемоглобина равнялось $10,9 \pm 1,1$. Интересно отметить, что уже на 15-е сут выявляются различия в показателях крови животных, у которых наступит выздоровление или разовьются рецидивы опухолей. При этом наблюдаются количественные различия в содержании эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина; при исследовании гемограмм отмечается сдвиг формулы влево за счет нейтрофилов.

Наблюдалось некоторое увеличение миелокариоцитов после криохирургии опухолей. На 7-е сут их количество увеличивалось в 1,5 раза,

а на 15, 30-е сут отмечалось уменьшение до $1\,952\,308 \pm 168\,973$ в 1 мм^3 , $1\,858\,334 \pm 329\,986$ в 1 мм^3 (рис. 1).

Глубокая аутофлора и патогенная флора кожи при криповреждении возрастает, но в меньшей степени, чем при облучении. Так, на 15-е сут глубокая аутофлора кожи составляла $203,8 \pm 6,4$ колонии, на 30-е — $173,6 \pm 11,6$ и на 60-е — $158,1 \pm 9,8$ колоний, т. е. наступает более быстрое восстановление иммунореактивности организма (рис. 2).

Патогенная флора претерпевает изменения в значительно меньшей степени. Так, на 15-е сут было 26,8 колонии и 8 случаев, на 30-е — 19,0 колоний, 2 случая, и на 60-е сут — 18,0 колоний и 4 случая.

Показатели образования бляшек гемолиза мало отличались от таковых в группе крыс после облучения и составляли на 15-е сут $0,42 \pm 0,004$, на 30-е — $0,47 \pm 0,0001$ и на 60-е — $0,56 \pm 0,007$.

У животных, получавших комбинированный курс лечения, количество лейкоцитов снижалось до $18\,940 \pm 2\,016$ в 1 мм^3 уже на 15-е сут после лечения, а к 30-м сут нормализовалось у вылеченных животных.

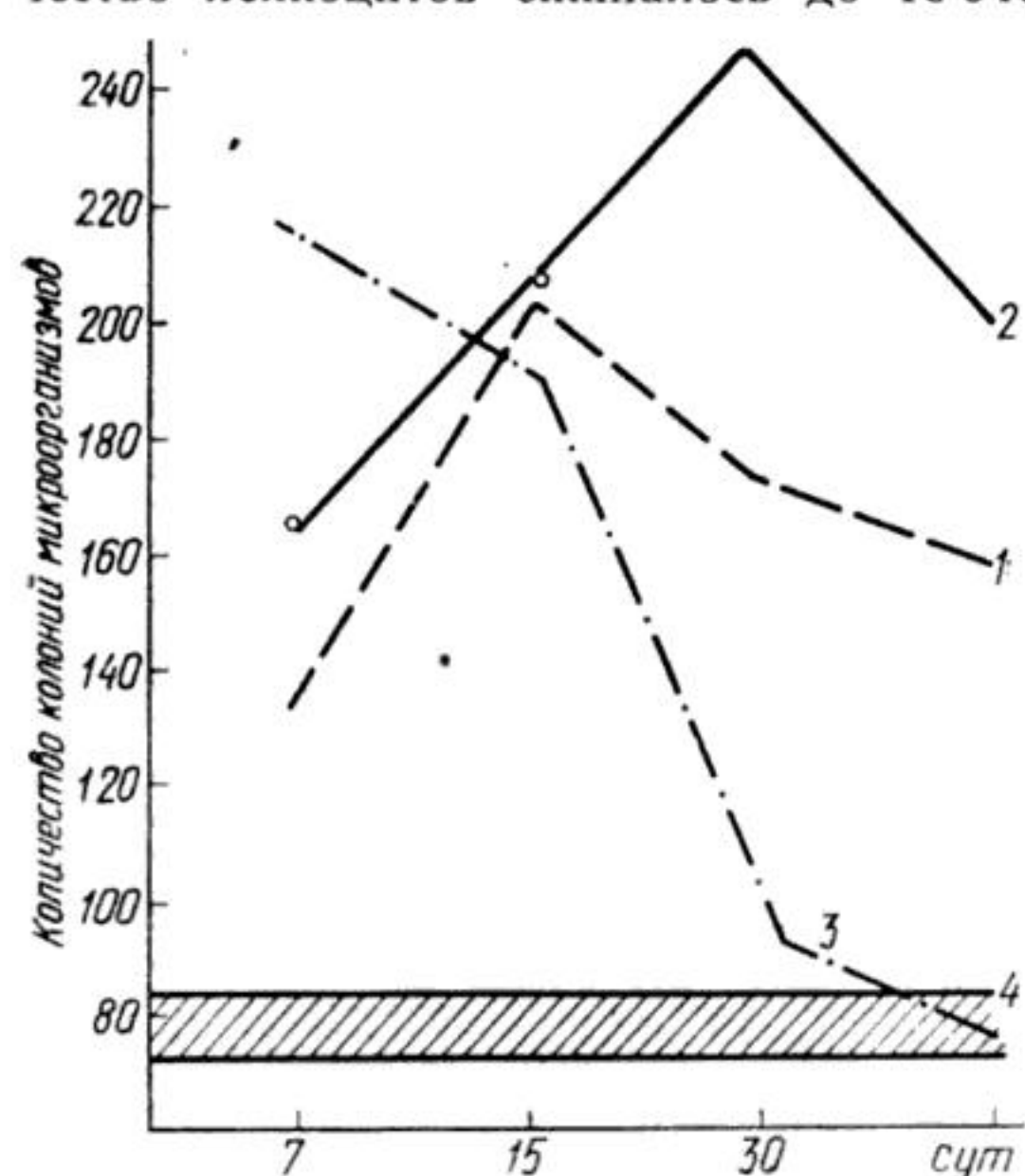


Рис. 2. Показатели глубокой аутофлоры кожи крыс:

1 — криповреждение; 2 — облучение в дозе 6000 рад; 3 — облучение в дозе 3000 Р+криповреждение; 4 — контроль

исходных данных. На 3-и, 15, 30-е сут оно равнялось соответственно $975\,000 \pm 81\,491$ в 1 мм^3 , $962\,727 \pm 141\,356$ в 1 мм^3 , $976\,333 \pm 23\,208$ в 1 мм^3 (при $1\,448\,800 \pm 62\,568$ в 1 мм^3 у интактных крыс). На 7-е сут

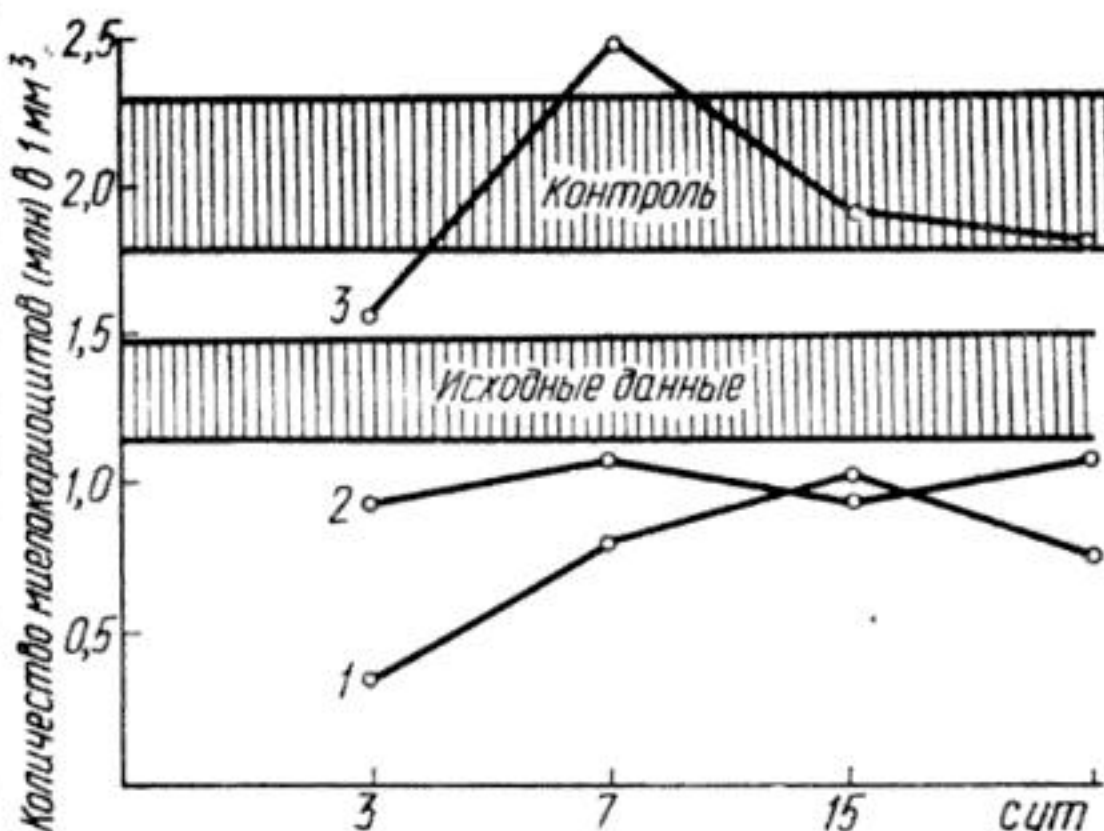


Рис. 1. Количественное содержание миелокариоцитов в различные сроки после лечения:

1 — облучение в дозе 6000 рад; 2 — облучение в дозе 3000 рад+криповоздействие; 3 — криповоздействие.

суд после лечения, а к 30-м сут нормализовалось у вылеченных животных. Количественное содержание эритроцитов и гемоглобина во все исследуемые сроки существенно не изменялось и было в пределах нормы. У крыс с рецидивами на 30-е сут наблюдалась анемия. Количество эритроцитов равнялось $2\,315\,333 \pm 935\,834$ в 1 мм^3 , гемоглобина — $8,4 \pm 0,7$ г. %. У этих животных количество лейкоцитов увеличивалось на 37% по сравнению с опухолевым контролем. Наряду с повышением общего содержания лейкоцитов наблюдались изменения со стороны лейкоцитарной формулы. Количество лимфоцитов снижалось до 22,3%, а нейтрофилов — резко увеличивалось. Количество миелокариоцитов было несколько ниже

количество миелокариоцитов увеличивалось до $1\,135\,181 \pm 119\,294$ в 1 мм^3 . У крыс с рецидивами на 30-е сут наблюдалось уменьшение их содержания до $675\,000 \pm 123\,379$ в 1 мм^3 .

Количество глубокой аутофлоры кожи в группе крыс после облучения в дозе 3000 рад с последующим криовоздействием возрастало более быстро и к 7-м сут составляло $218,2 \pm 10,7$, а затем наблюдалось снижение. Так, на 15-е сут — $188,9 \pm 17,5$ и на 30-е сут до контрольных цифр, т. е. $95,7 \pm 6,3$, чего не наблюдалось в остальных группах даже к 60-му дню исследования (рис. 2).

Патогенная флора кожи в исследуемой группе крыс претерпевала незначительные изменения. Так, на 15-е сут было 12,5 колоний и 2 случая из 10, на 30-е — 10 колоний при одном случае из 7 подопытных животных, на 60-е сут патогенная флора не высевалась. Патогенная флора обнаруживалась во всех исследуемых группах животных, но количественная характеристика, как видно из приведенных данных, отличается. Среди патогенной флоры кожи превалировал золотистый стафилококк.

Образование бляшек гемолиза при комбинированном лечении также претерпевает изменения в меньшей степени, чем в предыдущих группах крыс. Так, на 15-е сут бляшкообразующие клетки составляли $0,25 \pm 0,002$, на 30-е — $0,12 \pm 0,000$ и на 60-е — $0,074 \pm 0,000\%$, т. е. к 60-м сут показатели были в пределах нормы.

В результате проведенных исследований выявлено, что при лучевой терапии опухолей в дозе 6000 рад резко угнетаются костно-мозговое кроветворение и иммунная система, а при криохирургии и комбинированном лечении не наблюдается выраженного влияния на систему кроветворения и процесс образования бляшек гемолиза. Количество глубокой аутофлоры и патогенной флоры кожи возрастает к 7, 15-м сут во всех группах, однако после комбинированного воздействия значительно быстрее возвращается к исходным показателям. Таким образом, комбинированный метод криолучевого лечения оказывает менее выраженное нарушение реактивности организма, что сказывается на эффективности лечения животных. В группах животных, леченных комбинированным методом, удельный вес излеченных крыс был существенно выше, а число рецидивов меньше, чем у животных, леченных лучевым или криогенным методами.

1. Барабой В. А., Абдуллаев В. Д., Юречко В. Л. Кинетика показателей неспецифической реактивности больных раком шейки матки в процессе сочетанного лучевого лечения и иммунопрофилактики его осложнения. — Мед. радиология, 1976, 21, № 1, с. 27—35.
2. Баракина Н. Ф. О механизмах первичного опустошения кроветворной ткани млекопитающих под влиянием ионизирующей радиации. — Радиобиология, 1970, 10, № 5, с. 668—671.
3. Белоусова О. И., Трушина М. Н. Дозовая зависимость поражения и восстановления различных клеточных генераций костного мозга у собак, облученных в различных дозах. — В кн.: Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевых поражениях. Л.: Наука, 1973, с. 68—69.
4. Клемпарская Н. Н., Шальнова Г. А. Аутофлора как индикатор радиационного поражения организма. — М.: Медицина, 1966. — 110 с.
5. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. — Science, 1963, 140, N 3665, p. 405—406.
6. Linke A., Gemedé I., Faul I., Böhme H. Untersuchungen zur krebsindikativen Aussagekraft von Erythrozytenvenveränderungen des Behandlungsveränderungen während des Behandlungsverlautes maligner Erkrankungen. — Z. Ges. inn. Med., 1975, 30, N 6, S. 257—259.
7. Yantorno C., Gorder M. Y., Soanes W. A. The freezing of tissue during surgery and the production of antibodies. — Fed. Proc., 1966, 25, p. 731—740.

Киевский научно-исследовательский
рентгено-радиологический
и онкологический институт МЗ УССР

Поступила в редколлегию
05.04.78

В. Ф. Козлова**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕАКЦИИ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ
И ОРГАНОВ НА ВВЕДЕНИЕ
ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО ГЛИЦЕРИНА (ОЭГ)
В ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ**

В связи с тем что широко распространенный криопротектор глицерин обладает побочным действием, актуальным является изучение тех его производных, которые могут сохранять и усиливать криопротекторные свойства и быть менее токсичными. К числу таких веществ относится оксиэтилированный глицерин (ОЭГ) различной степени полимеризации (n), отличающийся от глицерина своими физико-химическими и биологическими свойствами [7]. В этом плане интересно изучить характер действия ОЭГ на структурные элементы организма, поскольку в справедливом принципе единства структуры и функции первичными изменениями всегда являются морфологические [6].

Цель настоящего исследования — выявление в организме подопытных животных начальных морфологических изменений и определение степени их развития в зависимости от дозы, концентрации и продолжительности введения ОЭГ п-30, установление практически безвредных доз, а также характера репаративных процессов в восстановительном периоде.

Исследование проведено совместно с сотрудниками токсико-фармакологической группы (руководитель — М. М. Гучок) лаборатории криопротекторов (руководитель — М. И. Шраго).

Опыты поставлены на 50 кроликах породы шиншилла и 46 белых половозрелых крысах. Кроликам однократно внутривенно и внутрибрюшинно вводили летальные и близкие к ним дозы (14,0—16,0 г/кг) ОЭГ п-30 в 20- и 50%-ной концентрации; однократно кроликам внутривенно (в 30%-ном растворе), крысам внутрибрюшинно (в 20%-ном растворе) вводили 1/2 ДЛ-50; трехкратно (через день) кроликам внутривенно, крысам внутрибрюшинно вводили 1/5 ДЛ-50 20%-ного и 1/10 ДЛ-50 10%-ного раствора, а также многократно в течение месяца животным вводили 1/20 ДЛ-50 и 10- и 20%-ного раствора ОЭГ п-30. Контрольным животным инъецировали соответствующие объемы физиологического раствора (внутривенно) и дистиллированной воды (внутрибрюшинно). Забой животных декапитацией осуществляли сразу, в части случаев через 10 дней после окончания опыта. Животные, выжившие после введения летальных доз ОЭГ п-30, были забиты через месяц.

Материалом для исследования послужили следующие органы животных: сердце, легкие, печень, почки, селезенка, надпочечники, головной мозг, желудок, тонкий и толстый отделы кишечника.

Методы исследования: патологоанатомическое вскрытие животных, гистологический и гистохимический анализы (окраска целлоидин-парафиновых срезов всех органов гематоксилин-эозином и комбинированным методом по Моури для выявления полисахаридов; избирательное окрашивание замороженных срезов печени и надпочечников на липиды суданом III и IV, а также суданом черным В).

В результате патоморфологического изучения установлено, что парентеральное введение кроликам летальных и сублетальных доз ОЭГ п-30 вызывает дистрофию органов, особенно печени и почек, гипертрофию клеток пучковой зоны коры надпочечника и уменьшение в них количества липидных соединений, распад эритроцитов и лимфоидных элементов селезенки, потерю гепатоцитами углеводных компонентов, а также перераспределение тканевой жидкости в организме,

что подтверждает выраженные гидратационно-дегидратирующие и осмотические свойства ОЭГ [2, 7]. Последнее зависит от концентрации и способа введения вещества. Так, внутрибрюшинное введение ОЭГ 50%-ной концентрации вызывает серозный отек подкожной клетчатки и кожи в месте введения препарата, образование небольшого количества серозного транссудата в грудной, брюшной полости и субдуральном пространстве головного мозга, кровенаполнение сосудов подкожной клетчатки и внутренних органов, гидропическую дистрофию паренхимы печени и почек, дегидратацию эпителия прямых канальцев почек. Особенность внутривенного введения 50%-ного раствора ОЭГ — развитие значительного серозного гидроторакса и асцита.

У кроликов, выживших после введения летальных доз ОЭГ п-30 в 20- и 50%-ной концентрации и забитых через месяц, отмечается почти полное восстановление структур, однако в печени и почках нередко наблюдаются очаги соединительнотканной пролиферации.

Однократное парентеральное введение животным 1/2 ДЛ-50 20- и 30%-ного раствора ОЭГ п-30 изменяет характеристику структурных компонентов в организме. Наиболее чувствительными органами оказались печень, почки, селезенка и надпочечники. В печени подопытных животных отмечаются кровенаполнение внутридольковых синусоидных капилляров, а также вен в зоне триад, расширение просветов некоторых центральных вен, реактивное увеличение купферовских клеток и гепатоцитов, появление в зоне триад тучных клеток, рассматриваемых [1] как своеобразный индикатор функциональной напряженности органа, очень чутко реагирующий на изменение функциональной нагрузки и уровня метаболизма ткани. Последнее также подтверждается потерей гепатоцитами нейтральных полисахаридов.

В почках наблюдаются гиперемия одних и спазм других капилляров, расширение просветов некоторых лимфатических сосудов, зернистая и гидропическая дистрофия эпителия извитых канальцев и эксикоз эпителия прямых канальцев.

В селезенке отмечаются кровенаполнение сосудов и синусов, усиленный распад эритроцитов и лимфоцитов, расширение герминативных центров некоторых лимфоидных фолликулов, лаброцитоз.

В надпочечниках заметны гипертрофия и обилие липидов в клетках пучковой зоны, дистрофия и атрофия некоторых клеток в ней, кровенаполнение сосудов сетчатой зоны и мозгового вещества. Кроме того, у некоторых подопытных животных обнаружены: гиперемия коронарных сосудов и гипертрофия мышечных клеток сердца; скопление жидкости в субдуральном пространстве головного мозга и расширение периваскулярных пространств коры головного мозга; уменьшение количества мукополисахаридов в бокаловидных клетках кишечника.

Трехкратная инъекция животным 1/5 ДЛ-50 20%-ного раствора ОЭГ вызывает морфологические изменения, характеризующие функциональное напряжение органов, особенно печени и почек, и появление в них признаков дистрофии. Об этом свидетельствуют реактивное состояние структурных элементов стромы органов, купферовских клеток печени, появление альцианофильных тучных клеток в зоне триад и обеднение паренхимы печени нейтральными полисахаридами, усиление митотической активности гепатоцитов (митотический индекс $= 2,2\%$) и выявление в отдельных клетках печени и почек признаков зернистой дистрофии, а также расширение полостей прямых канальцев и лимфатических сосудов почек.

О напряженности водно-солевого обмена у некоторых животных подопытной группы можно судить по активизации клеток клубочковой зоны коры надпочечников, что проявляется в расширении этой зоны и увеличении размеров клеток, ответственных за выработку минералокортикоидов, регулирующих водно-минеральный обмен.

ОЭГ в указанных условиях опыта, по-видимому, вызывает адаптацию животных к стрессу, так как наряду с гипертрофией клеток пучковой зоны коры надпочечников не обнаружено признаков атрофии лимфоидной ткани и изменений в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта.

При гистохимическом исследовании в бокаловидных клетках слизистой оболочки тонкого и толстого отделов кишечника преобладает фаза выведения секрета по сравнению с фазой накопления полисахаридов клетками в контроле. Несколько изменен и качественный состав

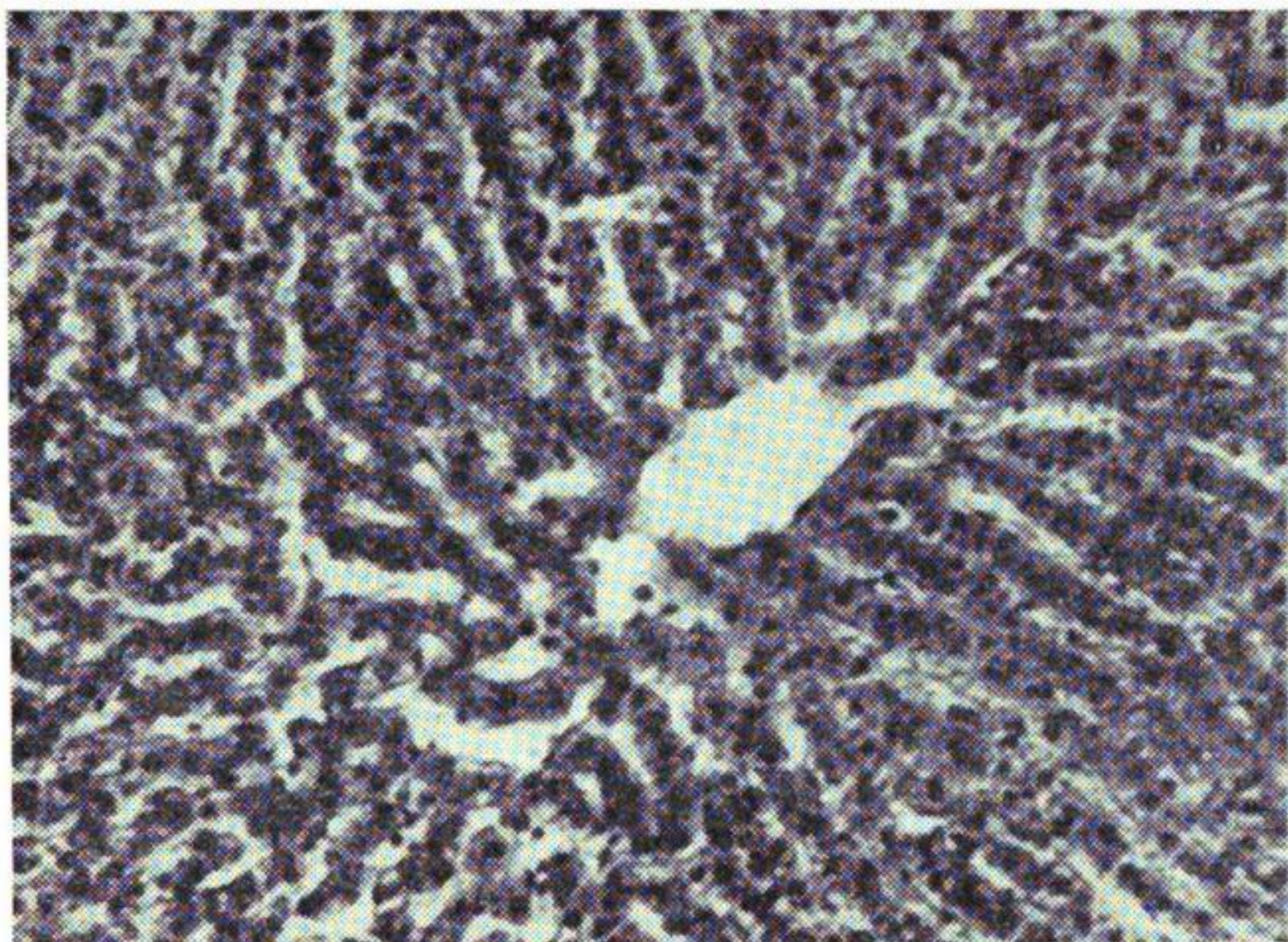


Рис. 1. Умеренно выраженная дегидратация клеток печени. Расширение синусоидных внутридольковых капилляров. Кролик; внутривенное введение в течение месяца 1/20 ДЛ-50 20%-ного раствора ОЭГ. Гематоксилин-эозин, $\times 112,5$.

секрета: в бокаловидных клетках слизистой оболочки кишечника контрольных животных обнаружены темно-фиолетовая смесь кислых и нейтральных мукополисахаридов, в опыте преобладают отдельно альцианофильные и PAS-положительные бокаловидные клетки, что, по-видимому, характеризует начальную стадию созревания секрета.

Трехкратное введение животным 1/10 ДЛ-50 10%-ного раствора ОЭГ существенно не влияет на структуру изучаемых органов. В печени подопытных крыс отмечается некоторое усиление митотической активности гепатоцитов (митотический индекс $= 0,33\%$) по сравнению с контролем, где митоз практически отсутствует. Однако это повышение числа митозов находится в пределах физиологических колебаний, наблюдаемых у данного вида животных.

При многократном длительном (в течение месяца) введении в организм животных 1/20 ДЛ-50 20%-ного раствора ОЭГ не обнаружено различий по сравнению с контролем в структурах сердца, легких, селезенки, коры головного мозга, желудка и кишечника. В печени и почках регистрируется мозаичность изменения микроциркуляции в виде расширения синусоидов печени, спазма одних и гиперемии других капилляров почки, а также умеренно выраженной дегидратации клеточных элементов этих органов (рис. 1, 2). В слизистой оболочке кишечника

отмечается усиление секреции белково-полисахаридных соединений бокаловидными клетками, однако не выходящее за пределы физиологической нормы (рис. 3).

В печени и почках животных этой группы, но забитых через 10 дней после окончания опыта, отмечаются гипертрофия и гиперплазия отдельных клеток, десятикратное усиление митотической активности гепатоцитов и статистически достоверное уменьшение числа двудер-

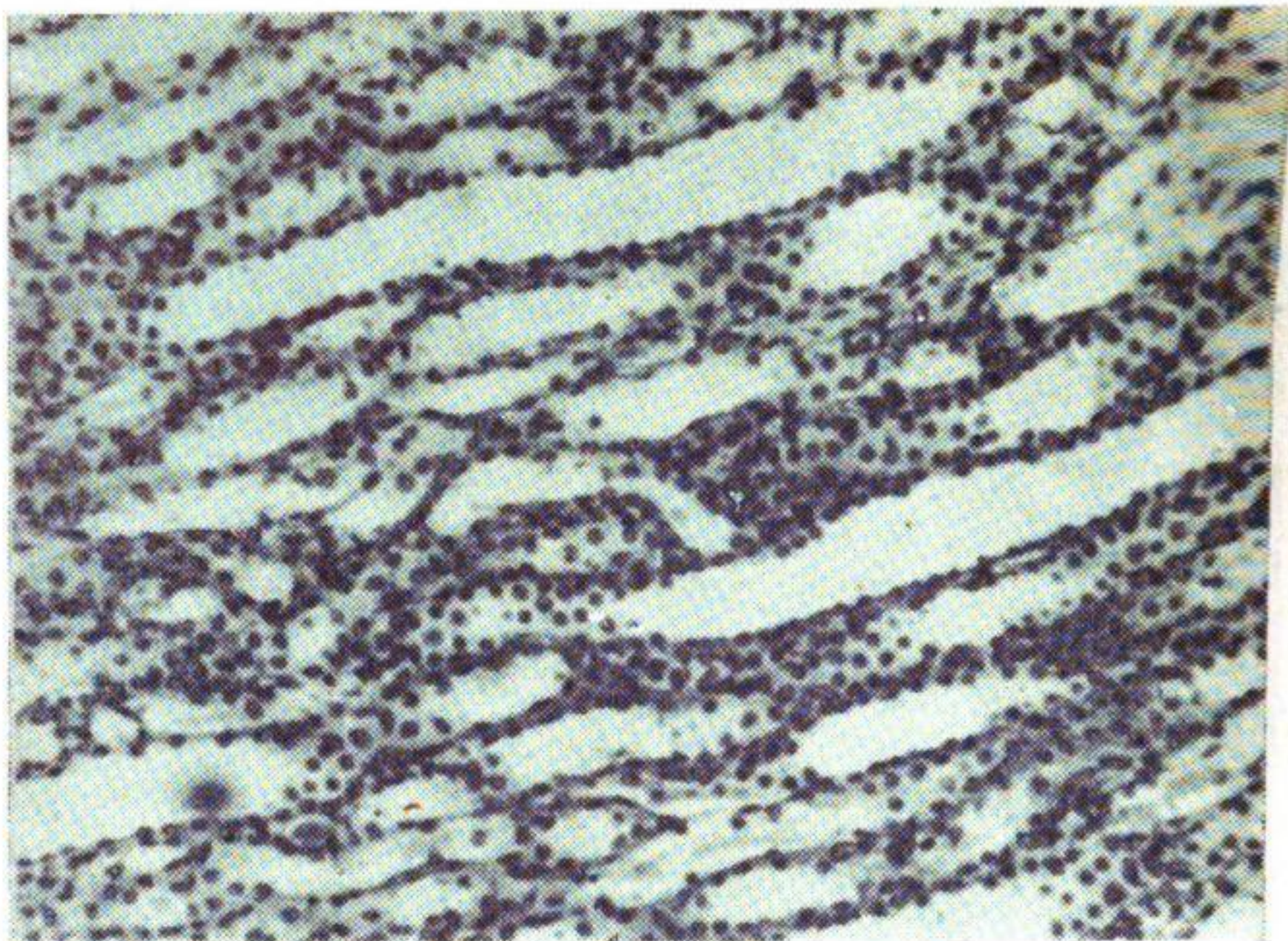


Рис. 2. Обезвоживание эпителия и расширение просвета прямых канальцев почки. Кролик; внутривенное введение в течение месяца 1/20 ДЛ-50 20%-ного раствора ОЭГ. Гематоксилин-эозин, $\times 112,5$.

ных клеток печени крыс. У некоторых животных этой группы наблюдаются гипертрофия и насыщенность липидами клеток пучковой зоны коры надпочечников, что характеризует стадию резистентности в процессе адаптации органа к стрессу.

Многократное длительное (в течение месяца) введение в организм животных 1/20 ДЛ-50 10%-ного раствора ОЭГ п-30 не вызывает структурных изменений в изучаемых органах, тканях, клетках.

Таким образом, в результате патоморфологического исследования установлено, что парентеральное введение в организм животных летальных и сублетальных доз ОЭГ п-30, оказывая патогенное воздействие на органы и ткани, вызывает сложный многокомпонентный компенсаторно-защитный процесс, проявляющийся как в развитии общей неспецифической реакции (стадия тревоги и резистентности), так и в активации специфических механизмов защиты в каждом органе. Наиболее чувствительны к повреждающему действию ОЭГ печень, почки, селезенка и надпочечники.

Определены начальные морфологические изменения в органах подопытных животных, характеризующиеся гипертрофией и гиперплазией клеток печени, почек и надпочечников, появление в печени различной степени зрелости тучных клеток, которые рассматриваются [1, 4] как регуляторы тканевого гомеостаза и являются важным звеном в общей реакции адаптации на клеточном уровне.

Усиление митотической активности клеток печени крыс при трехкратном парентеральном введении 1/5 ДЛ-50 20%-ного раствора ОЭГ п-30 и многократном введении в течение месяца 1/20 ДЛ-50 20%-ного раствора можно рассматривать как проявление перехода физиологической регенерации в репаративную, а дозы, ее вызывающие, как повреждающие (1/5 ДЛ-50) и близкие к пороговым (1/20 ДЛ-50) [3].

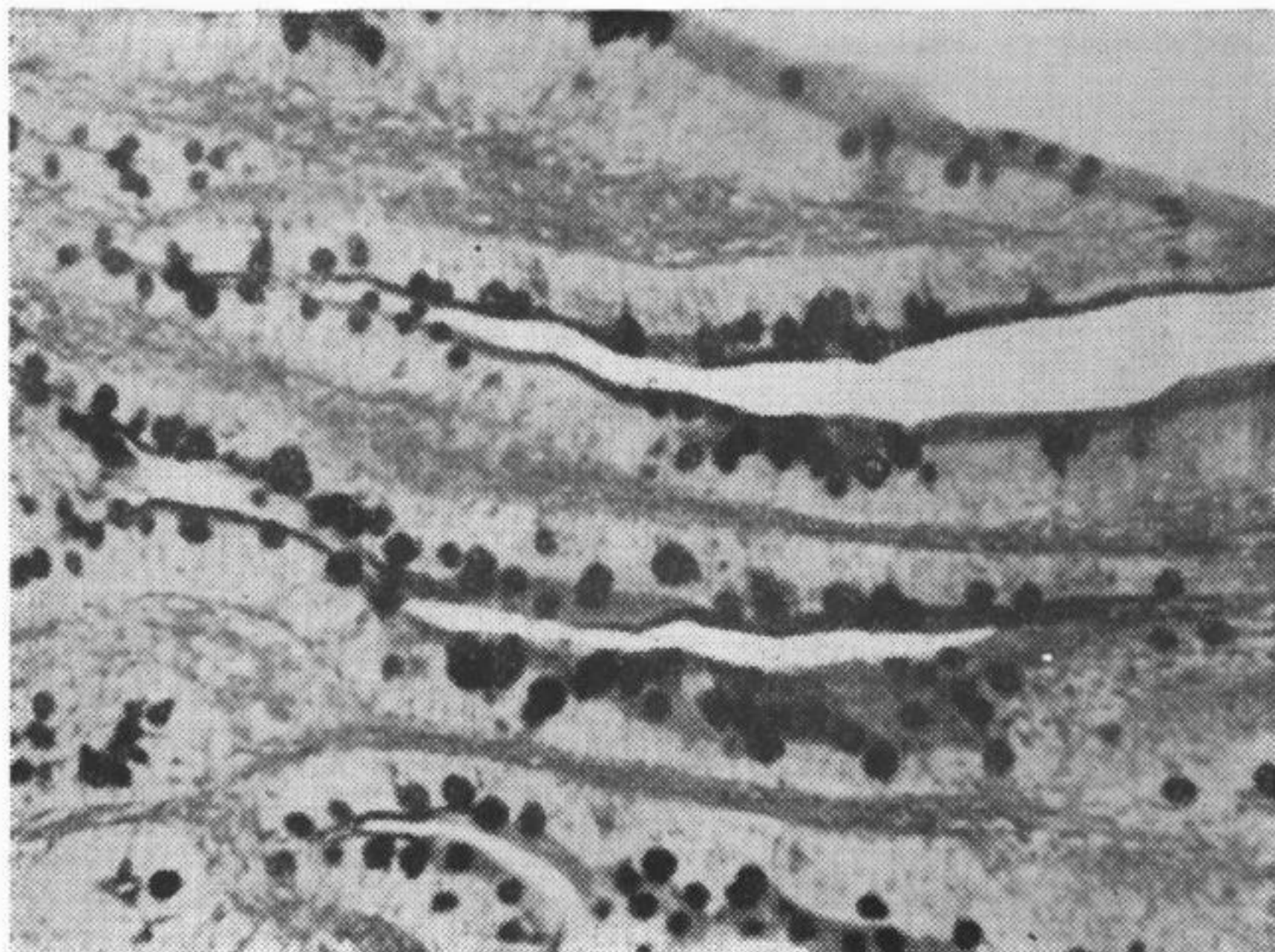


Рис. 3. Насыщение мукополисахаридами бокаловидных клеток слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. Кролик; внутривенное введение в течение месяца 1/20 ДЛ-50 20%-ного раствора ОЭГ. Окраска по Моури, $\times 112,5$.

Выявленный репаративный процесс в печени животных при действии изучаемого вещества, согласно современным представлениям [5, 6], можно рассматривать как клеточную и внутриклеточную формы регенерации.

Трехкратное парентеральное введение в организм животных 1/10 ДЛ-50 10%-ного раствора ОЭГ п-30 и многократное длительное введение в течение месяца 1/20 ДЛ-50 10%-ного раствора не вызвали морфологических изменений в изучаемых тканях и органах. Эти дозы по морфологическим показателям следует считать практически безвредными.

Итак, исследование характера и степени морфологических изменений в тканях и органах организма под воздействием изучаемого вещества может служить важным ориентиром при определении безвредных и токсических доз.

1. Виноградов В. В., Воробьева Н. Ф. Тучные клетки. — Новосибирск: Наука, 1973. — 128 с.
2. Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А. Итоги морфологического исследования действия некоторых криопротекторов на организм животных. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с 36—37.
3. Козлова В. Ф., Шенберг М. Г., Гучок М. М., Щетинский И. М. Митотический индекс и полиплоидия клеток как показатель порога вредного действия вещества. — В кн.: Материалы Второго Всесоюз. симпоз. по сомат. полиплоидии. Ереван, 1977, с. 52—54.

4. Линднер Д. П., Коган Э. М. Тучные клетки как регуляторы тканевого гомеостаза и их место в ряду биологических регуляторов. — *Арх. патологии*, 1976, № 8, с 3—14.
5. Саркисов Д. С. Регенерация и ее клиническое значение. — М.: Медицина, 1970. — 284 с.
6. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. — М.: Медицина, 1977. — 351 с.
7. Шраго М. И., Калугин Ю. В., Кочуровская Г. Г., Матвиец Н. М., Моисеев В. А., Марковский А. Л., Воротилин А. М., Карева Л. В., Вредихина Л. П. Влияние оксигенирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина. — *Криобиология и криомедицина*, 1976, вып. 2, с. 31—33.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
09.12.77

УДК 57.043

М. М. Кухарчик, Н. К. Барамбойм

ВЛИЯНИЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ НА ВОДНЫЕ РАСТВОРЫ И ДИСПЕРСИИ НЕКОТОРЫХ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Исследование изменений физико-химических свойств водорастворимых полимеров и природных высокомолекулярных соединений в результате криовоздействия на их растворы, дисперсии и прочие системы, содержащие воду, играет важную роль для решения ряда теоретических и практических задач химии, химической технологии, биологии и медицины [3, 9]. Сложность строения большинства природных объектов и специфичность их свойств создают известные затруднения при изучении явлений, сопровождающих цикл замораживания-оттаивания. Число работ, касающихся изменения свойств растворов синтетических водорастворимых полимеров после замораживания, весьма ограничено [5, 7].

Нами было исследовано влияние замораживания-оттаивания на свойства водных растворов и дисперсий неионогенных полимеров и полиэлектролитов. Объектами исследования были поливиниловый спирт (ПВС) марки ВТУ-582-55, молекулярный вес которого, определенный вискозиметрически, равен $3 \cdot 10^4$, полиакриламид (ПАА) — стандартный полимер марки ТУ-84-234-71, который диспергировался в воде при нагревании, фильтровался, переосаждался ацетоном, образцы нефракционированного пищевого желатина и уксуснокислые дисперсии коллагена, приготовленные по методике, разработанной на кафедре технологии кожи и меха МТИЛПа [2].

Для быстрого замораживания была использована смесь сухого льда с ацетоном. Объем замораживаемого раствора составлял 10—15 мл при средней скорости охлаждения $1,2—1,3^\circ$ в 1 с. Медленное замораживание проводилось с помощью охлаждающей смеси лед — хлористый калий при средней скорости $0,05^\circ$ в 1 с. Период оттаивания во всех случаях занимал 15—20 мин. Результатом криовоздействия на разбавленные растворы полимеров является усиление агрегации макромолекул, приводящее с повышением концентрации к усилению фазового разделения. Сочетание этого процесса с криодиспергированием в дисперсиях в результате многократного криовоздействия обуславливает сложный характер зависимости реологических и оптических свойств систем от числа циклов замораживания-оттаивания (рис. 1).

В связи с широким использованием в различных отраслях народного хозяйства анионоактивных производных ПАА, получаемых омылением исходного полимера при повышенных температурах, сопровождающимся целым рядом нежелательных изменений исходного продукта [10] и обладающим по ряду причин структурного характера невысокой

скоростью, была исследована возможность использования криовоздействия в качестве метода получения такого рода производных в условиях низких температур.

Данные по кинетике омыления, контролируемой по изменению содержания азота, вязкости и потенциометрического титрования, показывают увеличение средней скорости омыления при замораживании в гелеобразных системах в три раза (с концентрацией ПАА 6 г/100 мл) и в пять-шесть раз — в разбавленных растворах (с концентрацией

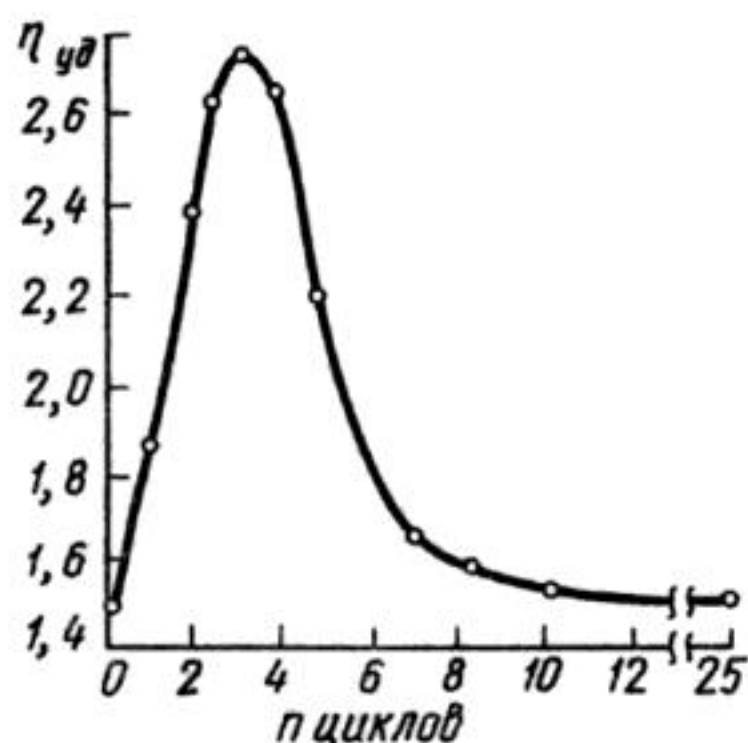


Рис. 1. Влияние количества циклов замораживания-оттаивания на удельную вязкость водных растворов ПВС ($c=10$ г/100 мл).

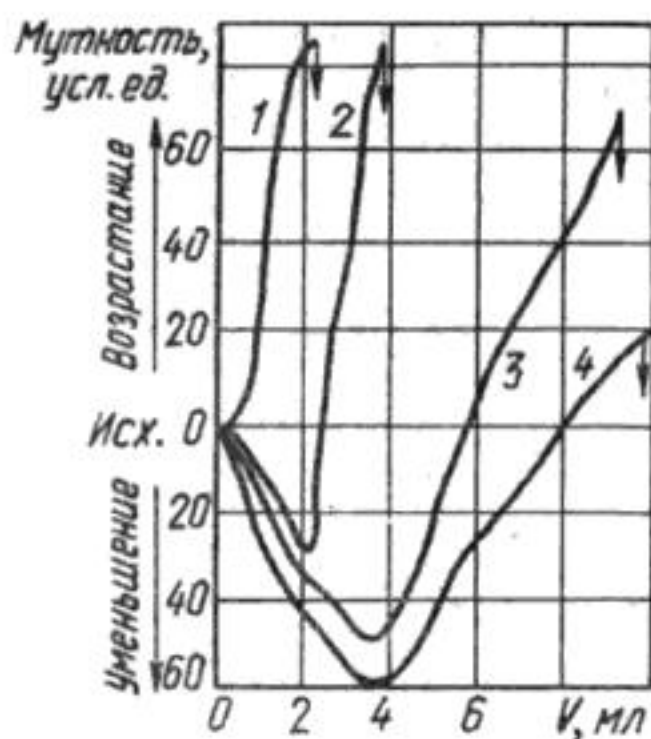


Рис. 2. Турбидиметрическое титрование растворов желатина этанолом при $pH=2,5$ после: 1 — 1, 2 — 3, 3 — 5, 4 — 10 циклов замораживания-оттаивания.

0,6г/100 мл). Возможно, это связано не только с увеличением концентрации омыляющих ионов при вымораживании воды, но и с созданием более благоприятных условий контакта их с функциональными группами полимера.

Известно, что охлаждение водных растворов желатина сопровождается активно проходящими в них процессами спирализации и ренатурации макромолекул, зависящими от pH системы. Поэтому для системы желатин—вода наибольший интерес представляло исследование влияния скорости охлаждения и числа циклов криовоздействия при различных pH . Установлено, что криолиз в водных растворах, содержащих желатин, в общем случае определяется соотношением скоростей охлаждения и конформационного перехода клубок—спираль. При медленном охлаждении (менее $0,1^{\circ}C/c$) процессы спирализации и ренатурации проходят достаточно полно, в случае быстрого охлаждения доля спирализованных структур в системе будет значительно меньше при прочих равных условиях. Повышение концентрации электролита при вымораживании воды создает условия для увеличения заряда макромолекул, который, в свою очередь, препятствует спирализации за счет электростатического отталкивания одноименно заряженных функциональных групп. Результаты криовоздействия на водные растворы желатина, оцениваемые изменением его устойчивости к осадителю — этанолу, показали (рис. 2), что многократное кристаллическое воздействие, проводимое с достаточно высокой скоростью (более $1^{\circ}C/c$), сопровождается соответственным возрастанием устойчивости растворов желатина к действиям осадителя. Наибольший эффект повышения устойчивости будет наблюдаться при pH 2,5, наименее благоприятном для спирализации [8]. Исследование влияния криовоздействия на физико-химические свойства продуктов растворения коллагена (ПРК) [2] в зависимости от концентрации, числа циклов замораживания-оттаивания и pH систем показало, что однократное замораживание в области низких и высоких значений pH не меняет существенно рео-

логические и оптические свойства системы. Криовоздействие при рН, близких к изоэлектрическому, резко снижает вязкость, увеличивая степень фазового разделения.

Исследование дисперсии оптического вращения показало, что в области низких рН криовоздействие увеличивает отрицательное вращение, при переходе к изоэлектрическому состоянию эти изменения невелики. В щелочной области наблюдается уменьшение отрицательного вращения (см. таблицу).

Влияние криовоздействия (25 циклов)
на удельное вращение $[\alpha]_D$
и постоянную дисперсию вращения λ_c
при различных рН

Исследуемая величина	рН					
	1,1	2,3	3,2	7,5	8,4	11,0
$[\alpha]_{D_{\text{нск}}}$	-194	-187	-200	-36	-82,0	-100
$[\alpha]_{D_{\text{кр}}}$	-326	-250	-275	-50,0	-18,0	-82,0
$\lambda_{c_{\text{нск}}}$	210	222	206	227	211	193
$\lambda_{c_{\text{кр}}}$	160	198	180	219	230	195

ДОВ растворов коллагена концентрации 0,08 г на 100 мл была снята на спектрополярометре ORD/UV-5 фирмы «Джаско». Уменьшение отрицательного вращения коллагена обычно связывается с денатурационными изменениями [8]. Увеличение левовращения после замораживания при низких значениях рН можно представить как результат некоторой перестройки

коллагеновых структур. Возможность такой перестройки, по-видимому, связана с тем обстоятельством, что в кислой среде имидная группа пептидной связи частично протонирована. Связь C-N при этом теряет характер частично двойной связи, что делает вращение вокруг пептидной связи более свободным [4].

Такая перестройка может быть представлена как локальный конформационный переход, обусловленный подвижностью белковой матрицы, аналогичный переходам, фиксируемым с помощью метода водородного обмена [1]. Известно, что изменение рН может приводить к изменению локальной подвижности белковой матрицы вследствие образования рН-зависимых конформеров белка, находящихся «в переходном конформационно-возбужденном состоянии». Такие переходы, как известно, могут существенно влиять на доступность для растворителя (осадителя) внутренних участков белковой матрицы, что подтверждается данными турбидиметрического титрования этанолом, свидетельствующими об изменении повышения устойчивости криолизованных растворов к действию осадителя при низких значениях рН.

Сопоставление изменения ДОВ дисперсий коллагена при различных рН в результате многократного замораживания-оттаивания с ультрафиолетовым поглощением в области 180—200 нм показало, что во всех случаях, когда зависимость поглощения при 190 нм не носила сложного характера от числа циклов (рН 2,5), увеличение левовращения сопровождалось уменьшением пика поглощения при 190 нм. Криовоздействие на дисперсии коллагена в щелочной области соответственно сопровождается увеличением пика поглощения при 190 нм, что свидетельствует об уменьшении спирализации коллагена в результате такой обработки.

Проведенные исследования показали существенную роль процессов агрегации и конформационных переходов при криовоздействии на водные растворы и дисперсии высокомолекулярных соединений.

1. Абатуров Л. В. Водородный обмен в белках. — Итоги науки и техники. Сер. молекуляр. биология, 1976, 8, ч. 2, с. 7—126.
2. Баблюк О. О., Шестакова И. С. Исследование факторов, влияющих на процесс получения желатина. — Изв. вузов. Технология лег. пром-ти, 1968, № 6, с. 25—28.
3. Барамбойм Н. К. Механохимия высокомолекулярных соединений. — М.: Химия, 1972. — 255 с.

4. Вейс А. Макромолекулярная химия желатина. — М.: Пищ. пром-сть, 1971. — 477 с.
5. Гуль В. Е., Булатникова Л. И., Беляцкая О. Н., Ермакова Е. В., Быкова Л. В. Влияние криолиза на структуру жесткоцепных полимеров. — Высокомолекуляр. соединения, 1976, А 18, с. 118—121.
6. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии / Ред. Г. Снатцке. — М.: Мир, 1970. — 439 с.
7. Кухарчик М. М., Барамбойм Н. К. Криолиз водорастворимых полимеров, применяемых в легкой промышленности. — Изв. вузов. Технология лег. пром-сти, 1977, № 4, с. 51—54.
8. Мерзлов В. П., Пчелин В. А. К вопросу о роли ионогенных групп в конформационных превращениях желатина. — Докл. АН СССР, 1964, 156, № 6, с. 666—669.
9. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 340 с.
10. Савицкая М. Н., Холодовая Ю. Д. Полиариламид. — Киев: Техніка, 1969. — 70 с.

Московский технологический
институт легкой промышленности

Поступила в редколлегию
10.06.78

УДК 57.043.616.127—005.8:616.832.9

**С. А. Лазарева, Г. А. Бабийчук, И. Ю. Микляев,
И. Г. Кравченко, И. К. Латогуз, В. Н. Задорожная,
В. В. Королев, В. К. Дьяченко, И. А. Харченко**

СОСТОЯНИЕ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ И РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА И КРАНИО-ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Инфаркт миокарда — ишемический некроз сердечной мышцы, развивающийся в результате недостаточности кровообращения и последующих нарушений метаболизма. В условиях острой ишемии миокарда необходимо создание условий, позволяющих обеспечить щадящий режим и экономный метаболизм. Для достижения данной цели заслуживает внимания применение кранио-церебральной гипотермии. Данный метод воздействия на организм приводит к сложным, но обратимым изменениям в системе крови, деятельности сердца, состоянии сосудов, метаболизма, вызывает уменьшение частоты и силы сокращений, мощности и работы сердца, скорости кровотока в системных, коронарных и церебральных сосудах.

Для правильного понимания механизмов изменения гемодинамики в условиях острой ишемии миокарда под влиянием гипотермии предпринято исследование состояния вазоактивных факторов гомеостаза калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем крови.

Определение калликреина и калликреиногена сыворотки крови проведено специфическим и хроматографическим методами Т. С. Пасхиной и А. В. Кринской, основанными на измерении БАЕЕ-эстеразной активности этого фермента после отделения его от других протеиназ, проявляющих подобную активность. Исследование активности ренина произведено радиоиммунологическим определением ангиотензина I.

Для воспроизведения инфаркта миокарда в условиях эксперимента на животных избран метод оперативной перевязки передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии в ее средней и верхней трети, который позволяет получить хорошо изученный по локализации и распространенности некроз миокарда.

Моделирование экспериментального некроза миокарда выполнено у 47 беспородных собак обоего пола весом 9—27 кг. Сеансы кранио-

церебральной гипотермии проводили с помощью комплектов аппаратуры «Гипотерм-4» и «Гипоксат», разработанных конструкторским бюро НИИ криобиологии и криомедицины АН УССР.

Введение животных в гипотермию проводилось по следующей программе: первоначальная скорость снижения температуры составляла 3°/мин, а через 10 мин она возрастала до 5°/мин. При этом удавалось достигнуть снижения температуры тела до 30—26°С, т. е. осуществить так называемую среднюю гипотермию.

Взятие проб крови для определения компонентов калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем крови производили после торакотомии до перевязки из периферической вены, через 10 мин после перевязки коронарной артерии из левого сердца, а также в динамике гипотермии (через 10 мин и через 1 ч от начала гипотермии).

Вскрытие перикарда и лигирование коронарной артерии сопровождалось у большинства животных острыми расстройствами ритма в виде групповых политопных экстрасистол, пароксизмов желудочковой и суправентрикулярной тахикардии. У 7 собак перевязка коронарной артерии спровоцировала развитие фибрилляции желудочков и быструю смерть. У животных, перенесших операцию, на ЭКГ обнаруживались признаки ишемии миокарда в виде подъема интервала $S-T$ над изоэлектрической линией с переходом в недифференцированный зубец T , а при развитии некроза миокарда — появление зубца Q , депрессия и инверсия T .

Результаты исследования активности калликреина в динамике перевязки коронарной артерии представлены в табл. 1. Активность калликреина повышается уже после торакотомии до перевязки венечной артерии, но это повышение статистически недостоверно в связи с большими колебаниями индивидуальных показателей у интактных животных до операции.

Таблица 1

Активность калликреина сыворотки крови собак и содержание калликреиногена (мЕД/мл) при экспериментальном инфаркте миокарда ($M \pm m$)

Момент взятия крови	<i>n</i>	Активность калликреина	Содержание калликреиногена
До операции из бедренной вены	18	$9,50 \pm 0,78$	$155,3 \pm 1,25$
После торакотомии из сердца	5	$18,08 \pm 3,98$	$121,44 \pm 7,04$
После перевязки венечной артерии из сердца	3	$24,60 \pm 8,7$	$117,56 \pm 10,0$
После окончания операции из бедренной вены	7	$24,4 \pm 1,65$	$159,0 \pm 12,1$
После окончания операции при отсутствии ЭКГ-признаков инфаркт-рениной вены	4	$16,2 \pm 1,77$	$172,7 \pm 25,3$
Агония	5	$34,55 \pm 6,97$	$122,65 \pm 13,5$

После лигирования венечной артерии у животных с явными признаками ишемии и некроза миокарда на ЭКГ в отличие от тех, у которых электрокардиографически не был зарегистрирован инфаркт, наблюдается дальнейшая активация калликреин-кининовой системы. Особенно высокая степень активации кининов наблюдается у животных при агонии в случаях фибрилляции желудочков.

У 5 из 7 животных, у которых гипотермия проводилась с помощью аппарата «Гипоксат» со снижением ректальной температуры от 37,5 до 30°С, наблюдалась активация системы кининов (табл. 2).

У 2 из 4 животных, у которых кранио-церебральную гипотермию производили на фоне вызванного некроза миокарда, отмечена тенден-

ция к снижению активности калликрейна под влиянием гипотермии после первоначального повышения ее под влиянием перевязки коронарной артерии. У 2 животных (15 и 19 эксперименты) с кардиогенным шоком, развившимся на фоне перевязки венечной артерии, повышалась активность калликрейна (соответственно до 14,4 и 21,8 мЕД/мл).

Через сутки после развития шока у собаки Белки (№ 66) активность калликрейна резко снижалась и приобретала нулевое значение. В случае развития кардиогенного шока под влиянием кранио-церебральной гипотермии на фоне некроза миокарда (эксперимент № 67) также обнаруживается тенденция к снижению активности калликрейна после первоначального его повышения под влиянием операции.

Т а б л и ц а 2
Влияние кранио-церебральной гипотермии на показатели калликреин-кининовой системы у животных с некрозом миокарда (мЕД/мл; $M \pm m$)

Номер эксперимента	До перевязки		Через 10 мин гипотермии		Через 1 ч гипотермии	
	Калли-креин	Калли-креиноген	Калли-креин	Калли-креиноген	Калли-креин	Калли-креиноген
48	80,0	30,1	90,9	28,2	Гибель животного	
68	18,2	170,9	29,1	160,0		
70	14,4	181,8	21,8	160,0	14,4	165,4
71	3,64	145,4	21,8	163,6	Гибель животного	

Уровень активности ренина в плазме периферической венозной крови изучен у 16 экспериментальных животных в динамике острой ишемии миокарда. В период наркоза уровень активности ренина у экспериментальных животных составил в среднем $2049 \pm 500,1$ пг/(мл·ч). После оперативной перевязки коронарной артерии активность ренина у экспериментальных животных возросла у 6 собак, а у остальных 10 животных несколько снижался уровень активности ренина после перевязки коронарных артерий. В среднем активность ренина после оперативного вмешательства составляла $1595,1 \pm 562,8$ пг/(мл·ч).

Изучение активности ренина под влиянием гипотермии проведено у 11 животных. До проведения сеанса гипотермии активность ренина в плазме периферической венозной крови колебалась в пределах 200—2068,7 пг/(мл·ч), в среднем составляя $557,9 \pm 136,3$ пг/(мл·ч). После введения в гипотермию незначительное снижение активности ренина отмечено только у 2 собак, у остальных 9 повышалась активность ренина, колебания которого в целом по группе находились в пределах 413,3—2200 пг/(мл·ч). В среднем активность ренина в период проведения гипотермии составила $729 \pm 133,1$ пг/(мл·ч).

Таким образом, оперативное вмешательство (перевязка венечной артерии) и гипотермия существенно изменяют уровень активности ренина у экспериментальных животных.

Изложенные факты свидетельствуют о существенном влиянии кранио-церебральной гипотермии на характер изменений нейрогуморальных регуляторных систем. Охлаждение приводит к резкой активации изучаемых систем, что, по-видимому, в свою очередь лежит в основе минимализации центральной гемодинамики и формирования нарушений микроциркуляции.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
07.07.78

Г. С. Лобынцева, И. А. Вотякова

ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СРЕД И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ И ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

При консервации крови в умеренных и низких температурах начиная с момента получения на клетки действуют факторы, которые вызывают в них ряд физических, химических и физико-химических изменений, и выделить из цепи этих процессов повреждения, связанные с понижением температуры, как нечто особое довольно сложно.

Используемая для трансфузий в клинике кровь может сохраняться в консервированном виде в течение нескольких дней при температуре 0°C и в течение нескольких лет при температурах —80, —150, —196°C. Средой для консервирования служат различные глюкозо-цитратные растворы, имеющие значения рН около 5,0. Компоненты этих растворов подобраны так, что в конечном объеме благодаря буферным свойствам крови достигаются физиологическое значение рН и определенная изотоничность. Однако первая порция попадает в среду с пониженным рН, что может вызвать изменения в мембранах эритроцитов.

Цель данных исследований — изучение влияния физико-химических свойств разных консервирующих сред и низкотемпературного консервирования на электрофоретическую подвижность и дзета-потенциал эритроцитов в зависимости от индивидуальных особенностей доноров. Кровь получали от двух доноров на консерванте АСД, ЦОЛИПК-76 и ЦОЛИПК-12 при стабилизированном трис-буфером рН 7,2 и рН 5,0. После одночасового пребывания в растворах клетки трижды отмывали физиологическим раствором с рН 7,2 и в плоской параллельной камере определяли электрофоретическую подвижность, дзета-потенциал и градиент потенциала по формулам

$$U = \frac{lq\lambda}{I t}; \quad \xi = \frac{4\pi U\eta}{DH}; \quad H = \frac{I}{q\lambda},$$

где $\frac{l}{t}$ — скорость смещения клетки в камере; I — сила тока; λ — электропроводность раствора; H — градиент потенциала; η — вязкость среды; D — диэлектрическая проницаемость.

Физико-химические показатели среды (табл. 1, 2), необходимые для вычисления дзета-потенциала, определяли по методам, описанным в работе [2].

Таблица 1
Влияние различных концентраций ПЭО-1500 на физико-химические показатели среды при температуре 24° С

Показатель	Физиологический раствор	Концентрация ПЭО-1500, %				
		2	4	6	8	10
ЭФП, мк·с ⁻¹ ·В ⁻¹ ·см	1,05	1,01	0,77	0,71	0,65	0,65
Удельная электропроводность, Ом ⁻¹ см ⁻¹ ·10 ⁻³	17,6	14,9	11,6	10,8	9,7	8,0
Вязкость, сП	0,93	1,07	1,24	1,43	1,66	1,90
Напряженность электрического поля, В/см	0,26	0,28	0,35	0,34	0,34	0,39
Сила тока, мА	3,22	2,97	2,82	2,62	2,33	2,17

Достоверные различия в величинах дзета-потенциала получены только для клеток, суспендированных в глюкозо-цитратном растворе с кислой реакцией (АСД) (табл. 3), причем при значении рН 5,0 дзета-потенциал и электрофоретическая подвижность гораздо выше, чем при рН 7,2. Клетки, полученные на растворе ЦОЛИПК-76 и ЦОЛИПК-12, по этим показателям не отличались.

Таблица 2
Концентрационная зависимость вязкости криопротектора
ПЭО-1500 от температуры

Концентрация ПЭО-1500, %	Температура, °С				
	25	24	23	22	21
2	1,045	1,070	1,103	1,111	1,114
4	1,197	1,245	1,282	1,297	1,337
6	1,390	1,432	1,476	1,503	1,530
8	1,630	1,663	1,712	1,729	1,784
10	1,820	1,901	1,957	1,981	2,037

Таким образом, клетки, полученные на растворе АСД, несут на своей поверхности повышенное количество отрицательно заряженных групп, что, по-видимому, связано с конформационными изменениями белковых компонентов мембран. Эти клетки не восстанавливают дзета-потенциал при перенесении их в плазму, в то время как эритроциты, полученные на растворах ЦОЛИПК, помещенные в плазму после трехкратного отмывания, восстанавливают исходное значение дзета-потенциала. Можно считать, что клеточная поверхность изменяет свои свойства уже в первые часы после выделения из кровяного русла в зависимости от среды, на которой она получена.

Таблица 3
Влияние различных консервирующих сред на дзета-потенциал эритроцитов человека

Консервирующая среда	рН 5,0		рН 7,2		Достоверность при рН	
	ЭФП, мк·с ⁻¹ ·В ⁻¹ ·см	ζ-потенциал, мВ	ЭФП, мк·с ⁻¹ ·В ⁻¹ ·см	ζ-потенциал, мВ	5,0	7,2
ЦОЛИПК-76 (1)	1,36±0,027	2525 ±70,5	1,37±0,057	2369,0±45,5	1:2 p=0,96	1:2 p<0,95
ЦОЛИПК-12 (2)	1,30±0,024	2414,0±75,8	1,28±0,034	2328,6±100	2:3 p=0,99	2:3 p<0,95
АСД (3)	1,52±0,037	3020,0±90,1	1,42±0,048	2649,5±113,	1:3 p=0,99	1:3 p<0,95

Имеются ли различия в электрофоретической подвижности эритроцитов, полученных в одно и то же время у различных доноров? Этот вопрос исследован многими авторами [2, 3] и был сделан вывод, что величина дзета-потенциала не зависит от групповой принадлежности донора. Однако, если сделать выборку по литературным данным [1], оказывается, что величина электрофоретической подвижности эритроцитов в физиологическом растворе при рН 7,8 составляет от 1,01 до 1,27 мк·с⁻¹·В⁻¹·см.

Нами измерены электрофоретическая подвижность эритроцитов и дзета-потенциал у 6 доноров в течение двух месяцев и установлено, что после трехкратного отмывания в физиологическом растворе рН 7,2 (табл. 4) величина электрофоретической подвижности изменяется от 1,08±0,022 до 1,30±0,020 мк·с⁻¹·В⁻¹·см. В табл. 4 приведены данные одного дня, однако такие колебания периодически повторялись. Имелись случаи, когда электрофоретическая подвижность падала до

0,88 мк·с⁻¹·В⁻¹·см. Выявить какую-либо закономерность в зависимости от группы крови донора или других факторов не удалось.

При низкотемпературном консервировании возникает вопрос о том, какая концентрация криопротектора необходима для замораживания и каков характер взаимодействия между клеткой и криопротектором? Изучение концентрационной зависимости электрофоретической подвижности эритроцитов для ПЭО-1500 показало, что она достоверно снижается при концентрациях от 4 до 10%. При добавлении ПЭО-1500 уменьшается скорость смещения клеток в электрическом поле почти на 45%. Этот коэффициент сохраняется в среднем во всех случаях, независимо от исходной величины дзета-потенциала. По-видимому, криопротектор изменяет дисперсионную среду, окружающую клетки. Отмывание эритроцитов после пребывания в криопротекторе и низкотемпературного консервирования с 10%-ным ПЭО-1500 физиологическим раствором с рН 7,2 полностью восстанавливает электрофоретическую подвижность и дзета-потенциал клеток (табл. 4).

Таблица 4

Электрофоретическая подвижность эритроцитов различных доноров до и после низкотемпературного консервирования

Донор	Группа крови	Гемоглобин, мг %	Электрофоретическая подвижность, мк·с ⁻¹ ·В ⁻¹ ·см		
			Эритроциты, отмывые в физиологическом растворе	10%-ный ПЭО-1500	Эритроциты, отмывые после размораживания
1	A (II)	73	1,08±0,022	$\frac{0,60\pm0,008}{0,68\pm0,025}$	1,11±0,061
2	A (II)	70	1,30±0,027	$\frac{0,56\pm0,005}{0,69\pm0,005}$	1,06±0,047
3	O (I)	78	1,27±0,022	$\frac{0,62\pm0,022}{0,64\pm0,010}$	1,23±0,017
4	O (I)	84	1,17±0,016	$\frac{0,56\pm0,018}{0,69\pm0,016}$	1,19±0,027
5	A (II)	62	1,20±0,037	$\frac{0,56\pm0,018}{0,50\pm0,020}$	1,15±0,033
6	A (II)	72	1,24±0,020	$\frac{0,56\pm0,020}{0,50\pm0,020}$	1,01±0,40

Примечание. Над чертой — до, под чертой — после размораживания.

Непроникающие криопротекторы, находясь в суспензионной среде, предохраняют клетки при замораживании, изменяя гидрофобное окружение, характер кристаллизации, а также нейтрализуя гиперконцентрированные растворы солей. Их концентрация должна быть такой, чтобы изменения в мембранах были обратимыми. Богатая белками клеточная поверхность эритроцита несет на себе отрицательный заряд и имеет умеренную гидратацию на полярных участках. Уменьшение заряда или полярности мембраны изменяет гидрофобность и увеличивает проницаемость. Рост отрицательного заряда или гидратации оказывает противоположное действие. Это общие закономерности для всех биологических мембран, в которых молекулы воды связаны с заряженными участками; основной особенностью их является состояние динамического обмена.

Тот факт, что после низкотемпературного консервирования, включающего непосредственный контакт клеток с криопротектором ПЭО-1500, мембраны эритроцитов сохраняют исходную величину дзета-потенциала, свидетельствует о функциональной полноценности деконсервированного материала. Мембраны этих клеток, по-видимому, не толь-

ко будут сохранять свою роль избирательного фильтра, регулирующего активный и пассивный транспорт вещества, но и способность к осуществлению важнейших ферментативных и иммунных реакций.

1. Козинец Г. И., Борзова Л. В., Кульман Р. А. Поверхностный заряд клеток крови и некоторые аспекты его биологической роли. — Лаб. дело, 1975, № 5, с. 284—289.
2. Харамоненко С. С., Ратикянская А. А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. — Минск: Беларусь, 1974. — 143 с.
3. Mehrishi J. N. Molecular aspects of the mammalian cell surface. — Progr. Biophys. Mol. Biol., 1972, 25, p. 1—70.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08.06.78

УДК 57.043

Л. Г. Мишневa

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ХОЛОДОВУЮ ИНАКТИВАЦИЮ РАСТВОРИМОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТФ-АЗЫ

АТФ-азный комплекс митохондрий, или так называемая олигомицинчувствительная АТФ-аза, являющаяся ключевым ферментом окислительного фосфорилирования, осуществляет синтез АТФ из АДФ и P_i в системах, содержащих замкнутую фосфолипидную мембрану и источник энергии, создающий на фосфолипидной мембране разность электрохимических потенциалов ионов водорода $\Delta\mu\text{H}^+$ [1, 3, 6, 7].

В составе максимально очищенной олигомицинчувствительной АТФ-азы обнаружено 4—10% фосфолипидов и 5—6 индивидуальных белков с молекулярной массой (ММ) 11 000—380 000. Наиболее высокомолекулярным белковым компонентом в составе АТФ-азного комплекса митохондрий, обладающим четвертичной структурой, является растворимая митохондриальная АТФ-аза (фактор F_1) с ММ 380 000, осуществляющая катализ АТФ-азной и АТФ-синтезной реакции [6].

В отличие от фермента, связанного с мембраной, изолированный сопрягающий фактор F_1 не чувствителен к олигомицину и холодолабилен. Экспонирование изолированного фактора F_1 при температурах 0—+4°C приводило к распаду его на 6 субъединиц и потере АТФ-азной активности [2]. Однако выдерживание инактивированного холодом фактора при температуре +25°C приводит к частичной ренатурации белка [8]. Таким образом, имеется довольно узкий интервал умеренно пониженных (околонулевых) температур, вызывающих обратимую структурно-функциональную деградацию фактора F_1 .

Чувствительность к олигомицину и стабильность на холоду восстанавливаются после реконструкции F_1 на мембрану митохондрий [2, 6]. В связи с этим изучалась возможность предотвращения холодной инактивации изолированного фактора F_1 , выделенного из митохондрий сердца быка в присутствии ДМСО, глицерина, полиэтиленоксидов ММ 100 и 400 в 10%-ной и 20%-ной концентрации.

Сопрягающий фактор F_1 выделяли по методу Селвина с некоторыми модификациями, описанными ранее [9]. АТФ-азную активность регистрировали рН-метрически с помощью рН-метра ЛПУ-Л1, согласованного с самопишущим потенциометром ЭПП-09 М₂ в среде инкубации, содержащей 10 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,8), 50 мМ КСl, 2 мМ АТФ, 1 мМ MgCl_2 [4]. Калибровку скорости осуществляли добавлением определенного количества 0,01н. НСl. Скорость АТФ-азной реакции измеряли в кювете объемом 4 мл и выражали в мкг·ион H^+ , отщепившихся за 1 мин на 1 мг белка.

Из полученных результатов видно (рис. 1), что изолированный фактор F_1 в процессе инкубации его при температуре 0°C почти полностью терял АТФ-азную активность уже через 45—60 мин и практически полностью диссоциировал на 5—6 субъединиц, что было подтверждено исследованиями этого белка с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 2).

Добавление в реакционную среду криопротекторов при комнатной температуре ($+25^\circ\text{C}$) не изменяло АТФ-азную активность фактора F_1 и не влияло на структуру этого фермента. При инкубации

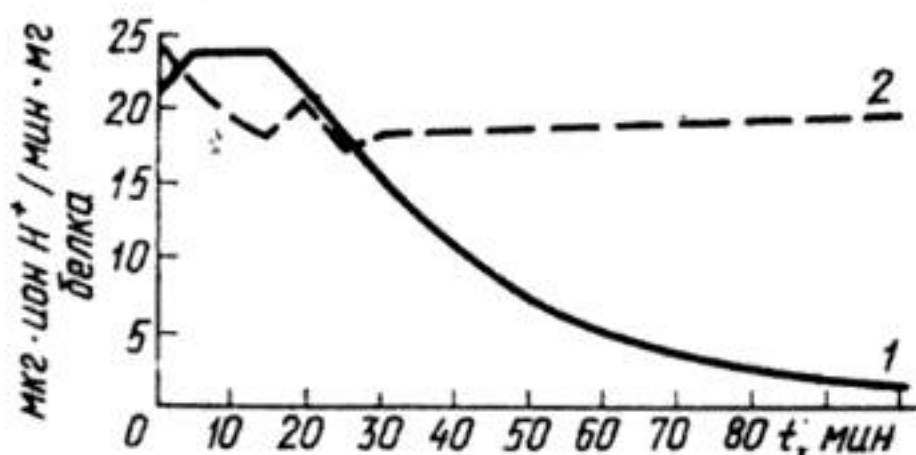


Рис. 1. Изменение АТФ-азной активности фактора F_1 от температуры:
1 — при температуре 0°C ; 2 — при температуре $+30^\circ\text{C}$.

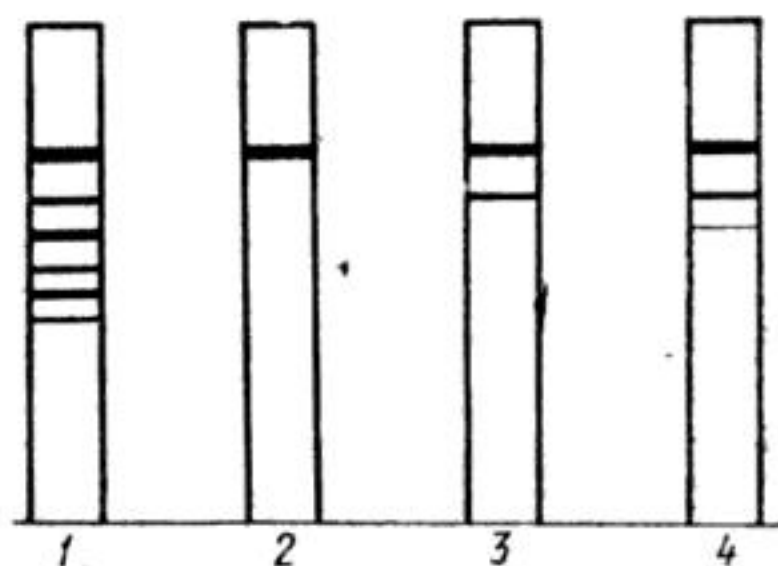


Рис. 2. Электрофореграмма диссоциации фактора F_1 на субъединицы при 0°C , без криопротекторов и в присутствии 20%-ного ДМСО, глицерина и ПЭО-100:

1 — диссоциация (6 полос); 2 — F_1 + ДМСО 20%-ный (1 полоса); 3 — F_1 + глицерин 20%-ный (2 полосы); 4 — F_1 + ПЭО-400 20%-ный (2 полосы + 1 размытая).

белка на холоду в присутствии всех исследуемых защитных веществ последние пролонгировали сроки инактивации сопрягающего фактора F_1 до 5—6 ч. Как видно из рис. 3, наиболее выраженным криозащитным эффектом по отношению к белку на протяжении указанного выше

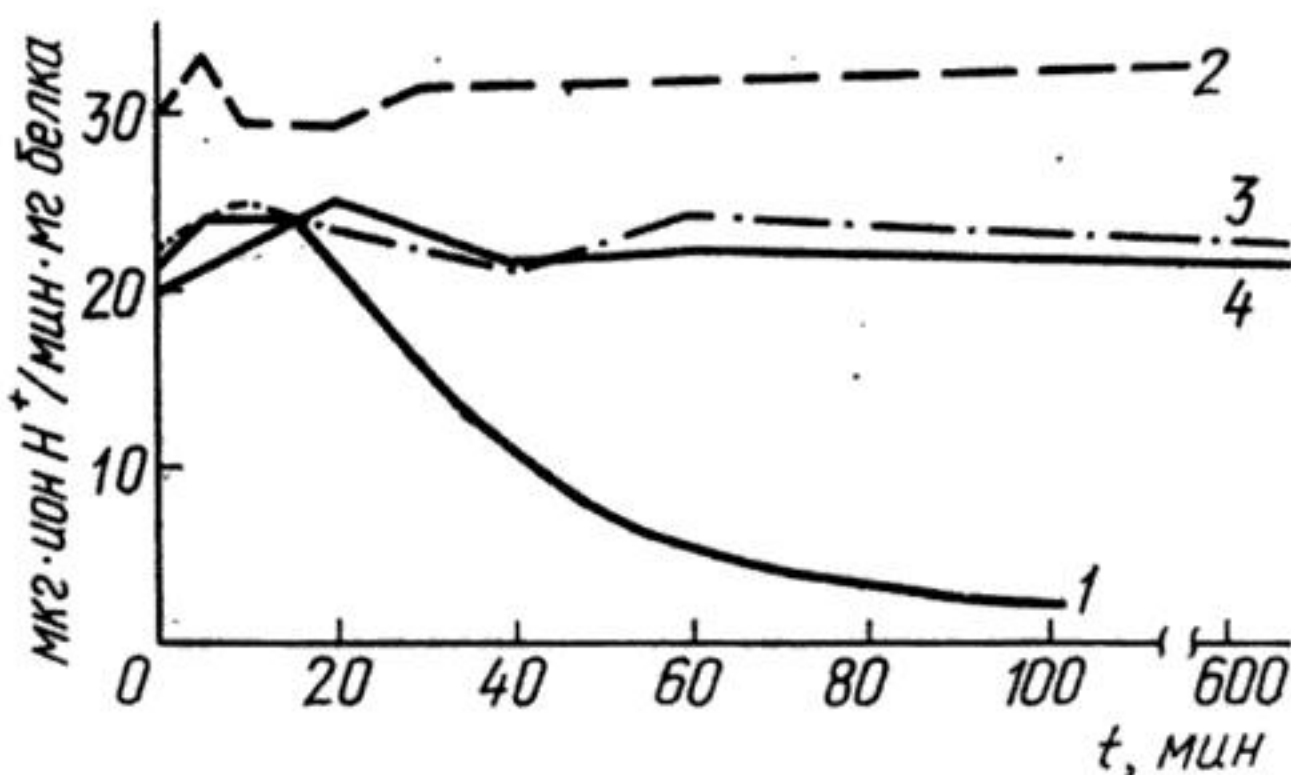


Рис. 3. Влияние криопротектора ДМСО, глицерина и ПЭО в 20%-ной концентрации на холодовую инактивацию фактора F_1 :

1 — инактивация при 0°C ; 2 — F_1 + ДМСО; 3 — F_1 + глицерин; 4 — F_1 + ПЭО-400.

времени обладали 20%-ный ДМСО и глицерин, а ПЭО-100 и ПЭО-400 оказывали менее выраженное защитное действие. В присутствии полиэтиленоксидов ПЭО-100 и ПЭО-400 величина абсолютной активности за тот же промежуток времени была ниже, чем при добавлении ДМСО.

Те же криопротекторы в 10%-ной концентрации также оказывали защитное действие на белок, однако их действие сохранялось только на протяжении 2,5—3 ч. Хранение фактора в присутствии ДМСО, глицерина и полиэтиленоксидов на протяжении 24 ч при $+4^\circ\text{C}$ приводит к его инактивации на 70%.

Вместе с тем быстрое замораживание фактора F_1 со скоростью 300—400°C в 1 мин до —196°C не вызывало изменения его активности на протяжении нескольких месяцев.

Хранение изолированного белка при температуре 25—30°C не сопровождалось потерей активности на протяжении всего эксперимента (рис. 1). Обсуждая полученные выше результаты по гипотермической деградации сопрягающего фактора F_1 , можно предположить, что одной из причин этого процесса может быть ослабление гидрофобных взаимодействий в белке при понижении температуры [5]. Это, очевидно, способствует диссоциации белка на субъединицы и потере специфической активности. Присутствие в среде ДМСО или глицерина стабилизировало структуру изолированного белка и предотвращало гипотермическую инактивацию на протяжении определенного периода времени, после чего через сутки этот эффект практически исчезал.

Очевидно, стабилизирующее влияние криопротекторов, сохраняющееся на протяжении 5—6 ч при околонулевых температурах, на сопрягающий фактор можно объяснить влиянием этих веществ на диэлектрическую проницаемость среды. Однако спустя сутки хранения, очевидно, происходит неспецифическое взаимодействие криопротекторов с активными группировками белка, что приводит к его инактивации. Детальные механизмы этих взаимоотношений остаются неясными и требуют дальнейших исследований.

1. Козлов Н. А. Механизмы функционирования митохондриальной АТФ-азы в системе окислительного фосфорилирования. — Биоорг. химия, 1975, 1, № 11, с. 1545—1568.
2. Рэкер Э. Биоорганические механизмы. — М.: Мир, 1967. — 270 с.
3. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. — М.: Наука, 1972. — 320 с.
4. Chance B. On possible mechanisms for the control of electron transport in the respiratory chain. — In: 3d Congr. Intern. Biochem. Bruxelles, 1955, p. 287.
5. Ling, Fien E. L. Studies of cell freezing and dehydration phenomena. — Cryobiology, 1970, 6, N 6, p. 575—578.
6. Mechanisms in Bioenergetics. — New York; London: Acad. press, 1965. — 365 p.
7. Racker E. Resolution and reconstitution of the inner mitochondrial membrane. — Fed. Proc., 1967, 26, N 11, p. 1335—1340.
8. Racker E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. XIII. Structure and function of submitochondrial particles completely resolved with respect to coupling factor 1. — J. Biol. Chem., 1967, 242, N 3, p. 2552—2554.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
03.05.78

УДК 57.043:542.65

А. Н. Новиков, Л. Г. Кулешова, Л. Ф. Розанов

К ВОПРОСУ О ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

В настоящее время на основании многочисленных теоретических и экспериментальных данных сложились определенные представления о возможных механизмах криоповреждения и криопротекции биологических систем. Основными повреждающими факторами принято считать образование вне- и внутриклеточного льда. П. Мазуром [5] предложена двухфакторная гипотеза криоповреждения, согласно которой при медленных скоростях охлаждения повреждение наступает в результате значительной дегидратации клеток. При больших скоростях клетка, не успевая обезводиться, переохлаждается и замерзает внутриклеточно. Непосредственные микроскопические наблюдения образования внутриклеточного льда показали, что оно коррелирует с низкой выживаемостью клеток [7]. Ряд исследований позволили считать, что мем-

брана клетки является барьером для прохождения кристаллов льда только при температуре выше -10°C . Предполагается, что внутриклеточная кристаллизация не является спонтанной, а возникает в результате прорастания внеклеточного льда через водные каналы клеточной мембраны [6]. Однако однозначного представления о механизме внутриклеточной кристаллизации, ее значимости в повреждении клеток нет. Поэтому выяснение механизма внутриклеточной кристаллизации, возможных путей управления ею является необходимым для глубокого понимания и правильного подхода к низкотемпературному консервированию клеточных суспензий. Поскольку все предполагаемые меха-

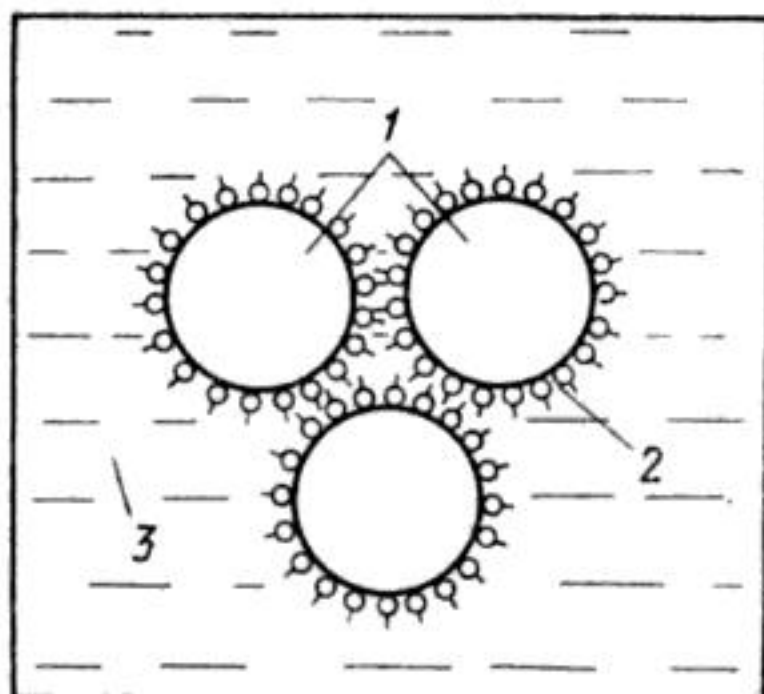


Рис. 1. Схема модели клетки:
1 — частицы эмульсии водного раствора желатина и криопротектора ПЭО-100; 2 — адсорбционные слои $L-\alpha$ -лецитина; 3 — среда гептана.

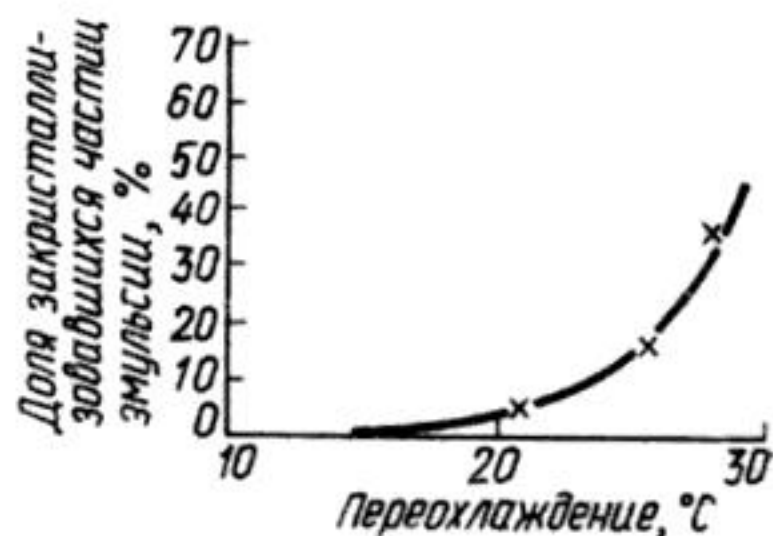


Рис. 2. Зависимость кристаллизации несприкасающихся частиц эмульсии от переохлаждения системы.

низмы повреждения проявляются в процессе замораживания—отогрева одновременно, дополняя и усиливая друг друга, и степень каждого из них трудно определить, целесообразным оказывается проведение исследований, моделирующих те или иные явления.

Настоящая работа проведена с целью изучения влияния на процесс внутриклеточной кристаллизации таких факторов, как свойства клеточной мембраны, состав внутриклеточной среды, наличие внеклеточного льда.

Модель и техника эксперимента. Модель клетки была представлена взвешенными в гептане частицами эмульсии водного раствора желатина и криопротектора полиэтиленоксида с молекулярным весом 100 (ПЭО-100), стабилизированными адсорбционным слоем $L-\alpha$ -лецитина. Двойной слой молекул $L-\alpha$ -лецитина, образующийся в местах контакта частиц концентрированной эмульсии, моделировал мембрану клетки, в которой молекулы $L-\alpha$ -лецитина ориентированы в направлении друг к другу неполярными радикалами [2] (рис. 1). Средний размер частиц эмульсии составлял 75—270 мкм. Для исследований сконструирована специальная кювета, помещаемая в рабочую камеру криоприставки к интерференционно-поляризационному микроскопу. Контроль температуры в процессе охлаждения осуществлялся с помощью медь-константановой термопары, введенной в рабочую камеру. При регистрации наблюдаемых процессов использовали технику киносъемки. Для оценки характера кристаллизации количество вносимой в кювету эмульсии варьировали таким образом, чтобы осевшие на дно кюветы частицы в одном случае располагались в виде непрерывного монослоя, а в другом — не вступали в контакт. Иницирование кристаллизации в системе контактирующих частиц осуществляли с помощью кристалликов иодистого серебра [1]. После кристаллизации соприкасающихся с затравкой частиц эмульсии они сами выступали в роли затравки для соседних частиц. Для оценки кристаллизации

в несоприкасающихся частицах эмульсии затравку иодистого серебра не вносили. В постановке экспериментов по влиянию на процесс кристаллизации ряда факторов и в оценке полученных результатов использовали метод оптимального планирования — полного четырехфакторного эксперимента [3]. В исследовании фигурировали следующие факторы: 1. Состояние адсорбционного слоя молекул L — α -лецитина на границе раздела водный раствор—гептан (x_1), которое контролировалось концентрацией L — α -лецитина от 0,088 до 0,364%. Верхний уровень концентрации был ограничен возможностью получения эмульсии данной гранулометрии, а нижний — неустойчивостью эмульсии

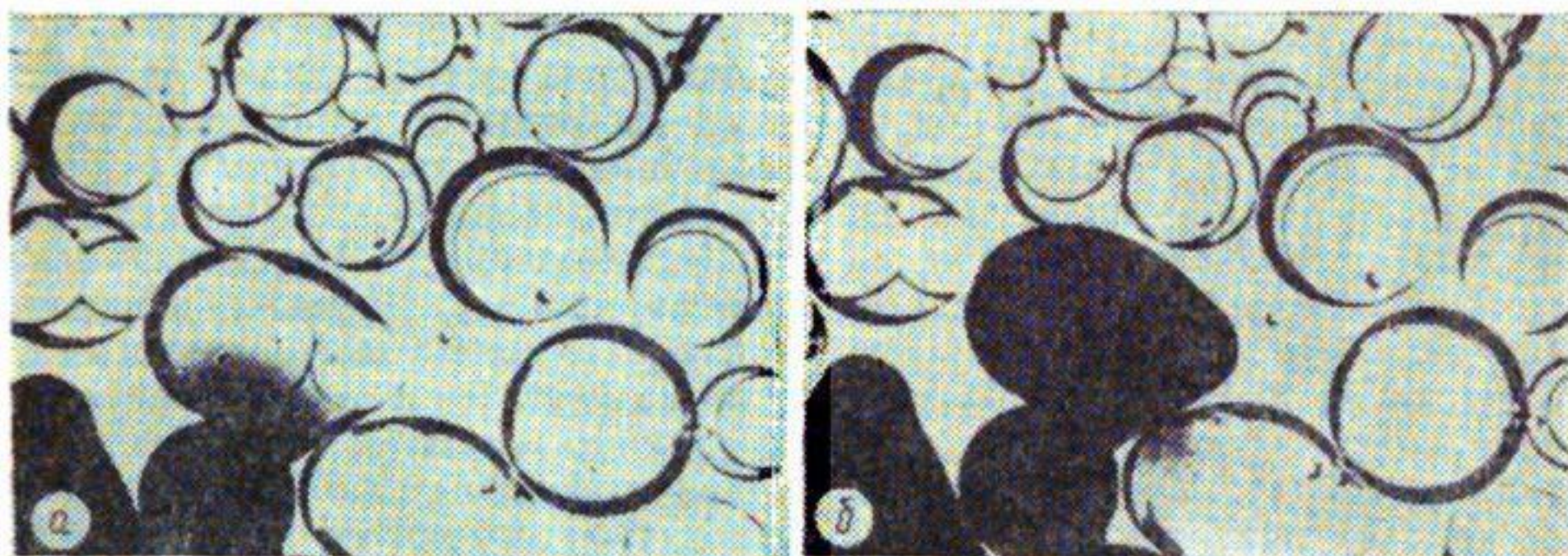


Рис. 3. Локальный процесс инициирования кристаллизации частиц эмульсии:
а — начало процесса; б — через 3 с.

при более низких концентрациях L — α -лецитина. 2. Содержание желатина в частицах эмульсии (x_2) варьировалось в пределах —5—10%. Верхний уровень концентрации был ограничен гелеобразованием в системе, содержащей желатин при температуре приготовления эмульсии (24—27°C). 3. Содержание проникающего в клетки криопротектора ПЭО-100 (x_3) варьировалось в пределах 5—10%. Эти концентрации криопротекторов наиболее широко применяются в практике низкотемпературного консервирования. 4. Скорость охлаждения исследуемой системы (x_4) варьировалась в пределах от +3,24 до 7,76°C в 1 мин, что обусловлено техническими и методическими ограничениями. В качестве функции отклика в факторном эксперименте выступало переохлаждение системы, при котором кристаллизация протекала в поле зрения микроскопа. Переохлаждение определяли как разность температуры начала кристаллизации и температуры плавления исследуемых растворов.

Результаты и их обсуждение. В таблице приведены данные о влиянии на величину переохлаждения частиц эмульсии различных комбинаций исследуемых факторов в условиях контакта частиц и внесения в систему затравки. Из данных рис. 2 следует, что в отсутствие контакта со льдом частицы эмульсии имеют тенденцию к значительному переохлаждению. В данной серии экспериментов концентрация желатина была 5, ПЭО-100 — 10%. В факторном эксперименте этому составу среды соответствовали переохлаждения 0,5; 4,25; 0,75; 9,5°C (см. таблицу). Сопоставление полученных данных позволяет предположить, что кристаллизация соприкасающихся частиц концентрированной эмульсии — процесс инициируемый. Подтверждает это и ряд факторов, наблюдавшихся в экспериментах. Так, кристаллизация соприкасающихся частиц эмульсии происходит последовательно, т. е. кристаллизуются только частицы, соприкасающиеся с частицами, содержащими лед (рис. 3). Процесс инициирования начинается локально, на небольшом участке контакта с частицей, содержащей лед, а затем распространяется по объему частицы (рис. 3). Наблюдаемый процесс

можно представить состоящим из двух стадий: 1) прораствание льда через модель мембраны; 2) кристаллизация внутри модели клетки. Первая стадия протекает относительно медленно — время, необходимое для прораствания льда через модель мембраны, составляет в среднем 32 с. Вторая стадия протекает не более чем через 3 с. Это свидетельствует об определяющей роли свойств мембраны в исследуемом процессе. На основании данных факторного эксперимента получено уравнение регрессии, в котором значимыми по проведенной оценке оказались коэффициенты регрессии, абсолютная величина которых превосходила 0,21:

$$y = 4,39 + 3,20x_1 - 0,52x_3 + 1,76x_4 + 1,33x_1x_4 + 0,36x_2x_3.$$

Анализ уравнения показал, что наиболее значительным является фактор x_1 . Известно, что строение адсорбционных слоев дифильных молекул зависит от величины взаимодействия их неполярных радикалов и содержания молекул в системе. Считается [2], что конденсированные поверхностные слои дифильных молекул образуются, если силы взаимодействия между их неполярными радикалами больше сил взаимодействия неполярного радикала с молекулами воды и если содержание дифильных молекул в системе достаточно для образования сплошного адсорбционного слоя на границе раздела фаз. Показано также, что при повышении содержания дифильных молекул в такой системе их ориентация в адсорбционном слое стремится к нормальной по отношению к поверхности раздела фаз. Исходя из вышеперечисленного столь значительное влияние содержания в системе L — α -лецитина можно объяснить способностью модели мембраны препятствовать проникновению через нее льда при увеличении степени ее заполнения молекулами L — α -лецитина и упорядочением их структуры.

Матрица планирования и функция отклика полного четырехфакторного эксперимента

Номер опыта	Фактор				Функция отклика, °C		Номер опыта	Фактор				Функция отклика, °C
	x_1	x_2	x_3	x_4				x_1	x_2	x_3	x_4	
1	—	—	—	—	1,00		9	—	—	—	+	3,25
2	+	—	—	—	5,25		10	+	—	—	+	12,00
3	—	+	—	—	0,75		11	—	+	—	+	2,00
4	+	+	—	—	4,75		12	+	+	—	+	10,25
5	—	—	+	—	0,50		13	—	—	+	+	0,25
6	+	—	+	—	4,25		14	+	—	+	+	9,50
7	—	+	+	—	0,75		15	—	+	+	+	1,00
8	+	+	+	—	3,75		16	+	+	+	+	11,00

Отрицательное значение коэффициента при x_2 свидетельствует о том, что присутствие в модели клетки криопротектора ПЭО-100 способствует ее кристаллизации. Можно предположить, что: а) ПЭО-100 структурирует воду по типу кристаллической решетки льда; б) вместе с ПЭО-100 во внутреннее пространство клетки были произвольно внесены твердые примеси — инициаторы кристаллизации льда.

Значение коэффициента при x_4 указывает на то, что при увеличении скорости охлаждения кристаллизация в модели клетки происходит при больших переохлаждениях. Выраженное влияние скорости охлаждения можно объяснить следующим образом: при переохлаждении системы зародыши кристаллов возникают не сразу, для их образования требуется время, называемое инкубационным периодом, который зависит от физико-химических свойств системы и величины достигнутого переохлаждения [4]. Следовательно, повышение скорости охлаждения должно привести к достижению больших переохлаждений без

образования кристаллов льда, поскольку в данном случае система в переохлажденном состоянии будет находиться меньшее время.

Величина коэффициента парного взаимодействия факторов x_1 и x_4 показывает, что повышение их значений тормозит процесс кристаллизации в среде модели клетки. Графоаналитическая оценка этого коэффициента свидетельствует о том, что замедление процесса кристаллизации при повышении в системе содержания L — α -лецитина более значительно при увеличении скорости охлаждения. По-видимому, при снижении температуры в структуре адсорбционных слоев L — α -лецитина происходят перестройки, обусловленные возрастанием взаимодействия между неполярными радикалами. Эти структурные перестройки могут привести к сжатию адсорбционных слоев L — α -лецитина и, как следствие, к нарушению их непрерывности. Последнее может, в свою очередь, привести к уменьшению сопротивления этих слоев, проникновению льда. Далее можно предположить, что процесс структурных перестроек в адсорбционных слоях при снижении температуры требует для завершения определенного времени. При малых скоростях охлаждения времени для реализации этого процесса достаточно, а при больших — преобразование структуры адсорбционных слоев запаздывает, что повышает устойчивость модели мембраны.

Значение коэффициента парного взаимодействия факторов x_2 и x_3 свидетельствует о незначительном торможении процесса кристаллизации при их увеличении. Механизм парного влияния этих факторов может быть представлен следующим образом. Присутствие в системе желатина нейтрализует действие ПЭО-100, частично разрушая созданную ПЭО-100 льдоподобную структуру, или за счет повышения вязкости среды снижает вероятность кристаллообразования у поверхности внесенных вместе с ПЭО-100 частиц твердых примесей. В свою очередь, наличие в системе ПЭО-100 приводит к частичному связыванию воды, а это вызывает повышение вязкости раствора желатина.

Таким образом, полученные данные подтверждают необходимость стабилизации мембраны живой клетки в процессе низкотемпературного консервирования с целью возможного предотвращения внутриклеточной кристаллизации. В связи с этим целесообразно проведение оценки способности более строгих моделей мембраны препятствовать проникновению через них льда, а также изучение способов защиты мембраны клетки при криоконсервировании с помощью адсорбционных слоев липидов и некоторых непроникающих криопротекторов.

Выводы. 1. Кристаллизация внутриклеточной среды на модели клетки — процесс, инициируемый внеклеточным льдом. 2. Интенсивность инициирования определяется прежде всего состоянием бислоя молекул липида. Сопротивление модели мембраны проникновению льда увеличивается при повышении степени ее заполнения молекулами липида. 3. Увеличение скорости охлаждения модельной системы приводит к кристаллизации ее при больших переохлаждениях вследствие зависимости процесса зародышеобразования от скорости охлаждения. 4. Увеличение содержания в модели клетки ПЭО-100 способствует ее кристаллизации, а желатин, в свою очередь, нейтрализует действие ПЭО-100.

1. Безруков О. Ф. О льдообразующей активности веществ. — В кн.: Молекулярная физика и биофизика водных систем. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1973, с. 48—59.
2. Воюцкий С. С. Курс коллоидной химии. — М.: Химия, 1964. — 518 с.
3. Саутин С. Н. Планирование эксперимента в химии и химической технологии. — Л.: Химия, 1975. — 48 с.
4. Хамский Е. Ф. Кристаллизация из растворов. — Л.: Наука, 1967. — 150 с.
5. Mazur P. Kinetics of water loss from cell at subzero temperatures and likelihood of intracellular water. — J. Gen. Physiol., 1963, 47, N 2, p. 347—369.
6. Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, p. 658—676.

7. McGrath J. J., Cravalho E. G., Huggins C. E. An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze-thaw survival Hela S-3 cells. — *Cryobiology*, 1975, 12, N 5, p. 540—550.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12.04.78

УДК 57.043

М. М. Петров, О. В. Кушко, Л. Н. Блоцкая, Л. Н. Юхимчук

МОРФО-БИОХИМИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ С ГЛИЦЕРИНОМ И ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОМ, НА ПРОТЯЖЕНИИ 5 ДНЕЙ ХРАНЕНИЯ ПРИ $4\pm 2^\circ\text{C}$

Одно из направлений в разработке вопросов криоконсервирования эритроцитов состоит в изыскании веществ, обладающих оптимальными криопротекторными свойствами. В настоящее время наиболее широко применяется глицерин [11, 13, 18, 19]. Однако некоторые отрицательные стороны его использования (дороговизна, сложность подготовки криоконсервированных эритроцитов для трансфузии и т. д.) вызывают необходимость дальнейших поисков и изучения пригодности для этих целей ряда веществ — диметилсульфоксида (ДМСО), декстрана, полиэтиленоксида (ПЭО), оксиэтилкрахмала и др., а также их сочетаний [1, 2, 8, 9, 13, 15—17, 20].

В Киевском НИИ гематологии и переливания крови в качестве криозащитного вещества экстрацеллюлярного действия изучают поливинилпирролидон (ПВП) мол. в. $12\,600\pm 300$, отечественного производства (Балаковский химзавод) [3—5, 14]. Установлено, что эритроциты, замороженные с ПВП, после деконсервации сохраняют морфологические и биохимические свойства, являются функционально полноценными и обладают достаточной кислородтранспортной функцией.

Вместе с тем имеются работы, в которых сообщается о недостаточных криозащитных свойствах ПВП, в связи с чем считается нецелесообразным его применение для консервирования эритроцитов при ультранизкой температуре [6, 8, 11, 21, 22].

Размороженные эритроциты пригодны для клинического применения в течение 6—24 ч после оттаивания. Хранение их более длительное время при положительной температуре ведет к нарушению морфологической структуры клетки, потере функциональных свойств и снижению посттрансфузионной приживаемости [3—5, 13].

Цель наших исследований — сравнительное изучение эритроцитов, криоконсервированных с глицерином и ПВП, на протяжении 5 дней хранения при положительной температуре, поскольку один из важных вопросов криоконсервирования эритроцитов — изучение сохранности клеток при положительной температуре после их деконсервирования.

Замораживание, хранение и оттаивание эритроцитов осуществлялись по методу, разработанному в ЦОЛИПК [16] с использованием низкоазотного оборудования «Биокомплекс» для криоконсервирования, выпускаемого ВНИИТКРИОГЕНМАШ. Срок хранения в замороженном состоянии от 3 мес. до 2 лет.

Криоконсервированию подвергались эритроциты донорской крови второго дня хранения. Одна часть эритроцитов после снятия плазмы смешивалась с криозащитным раствором N1 — ПВП в соотношении эритроциты: раствор = 2:1 (конечная концентрация ПВП — 7%), другая — с раствором ЦОЛИПК-114 в соотношении 1:1 (конечная концентрация глицерина — 15%).

Таблица 1

Динамика показателей морфо-функционального состояния размороженных эритроцитов, криоконсервированных с глицерином (I) и ПВП(II), на протяжении 5 дней хранения при температуре от 4 до 6°C ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Дни хранения							
	1-й		2-й		3-й		4-й	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Количество эритроцитов, тыс. в 1 мм ³	439,4 ± 18,0	277,1 ± 13,6	412,6 ± 14,0	261,0 ± 9,65	411,1 ± 12,8	264,6 ± 11,0	408,6 ± 15,0	257,4 ± 11,3
Гемокрит, %	39,5 ± 1,54	26,6 ± 1,44	38,2 ± 1,23	26,4 ± 1,79	35,6 ± 1,20	26,1 ± 1,72	35,9 ± 1,90	25,8 ± 0,75
Общий гемоглобин, %	17,0 ± 0,91	11,5 ± 0,53	17,2 ± 0,88	11,4 ± 0,54	17,5 ± 0,69	11,7 ± 0,57	17,4 ± 1,0	11,8 ± 0,57
Свободный гемоглобин, г. %	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,3 ± 0,04	0,56 ± 0,53	0,53 ± 0,53	0,78 ± 0,11	0,7 ± 0,13
Гемолиз, %	0,74 ± 0,07	1,23 ± 0,13	1,19 ± 0,18	2,16 ± 0,39	2,0 ± 0,42	3,4 ± 0,57	2,6 ± 0,48	4,57 ± 0,60
Нативная капля, %								
нормоциты	910 ± 12,3	769 ± 39,1	476 ± 47,0	662 ± 45,1	257 ± 54,7	582 ± 46,0	252 ± 73,3	384 ± 0,60
тутовые ягоды	89 ± 11,8	228 ± 39,5	510 ± 49,1	317 ± 41,6	711 ± 56,0	349 ± 40,1	694 ± 72,5	466 ± 40,2
сфероциты	0,5	4 ± 0,86	15 ± 4,4	21 ± 4,1	32 ± 7,1	69 ± 9,6	59 ± 7,1	150 ± 15,7
Устойчивость, %								
0,6%-ный р-р NaCl	49,0 ± 4,1	86,0 ± 3,67	63,0 ± 4,5	79,0 ± 3,9	68,0 ± 4,8	65,0 ± 5,8	68,0 ± 3,9	53 ± 7,4
0,9%-ный р-р NaCl	96,0 ± 1,20	95,0 ± 3,37	93,0 ± 1,70	92,0 ± 2,96	91,5 ± 0,96	79,0 ± 2,54	89,4 ± 0,6	74,0 ± 3,13
Кислотная эритрограмма, %								
пониженностойкие	22,98	35,60	23,39	27,90	18,93	26,20	16,03	27,60
среднестойкие	58,34	56,95	50,93	62,80	51,08	62,80	50,87	60,1
повышенностойкие	18,55	6,85	25,44	9,22	29,96	10,70	32,74	
Калий, мэкв/л								
внеклеточный	9,7 ± 0,95	1,5 ± 0,14	20,7 ± 1,58	2,5 ± 0,22	27,9 ± 2,6	3,2 ± 0,30	31,7 ± 2,30	4,76 ± 0,20
клеточный	70,8 ± 9,6	37,8 ± 4,2	50,4 ± 9,8	34,7 ± 3,3	44,0 ± 6,8	31,7 ± 0,4	33,2 ± 3,7	31,2 ± 2,6
Натрий, мэкв/л								
внеклеточный	44,8 ± 3,6	67,3 ± 4,3	39,6 ± 3,8	66,5 ± 4,4	37,8 ± 3,3	66,9 ± 3,7	37,4 ± 4,0	72,6 ± 3,5
клеточный	14,1 ± 1,20	33,0 ± 0,56	22,0 ± 1,26	29,1 ± 1,30	22,6 ± 1,43	27,4 ± 0,86	24,3 ± 1,20	26,5 ± 0,86
Ф _н настая, мэкв/л	18,2 ± 1,6	23,4 ± 1,9	19,2 ± 1,9	20,3 ± 1,5	14,9 ± 1,0	21,2 ± 1,5	15,9 ± 1,3	20,5 ± 2,4
Ф _н эритроцитов, мкМ/гНв	19,1 ± 2,3	23,0 ± 3,4	23,4 ± 1,8	22,6 ± 2,2	28,6 ± 3,4	25,1 ± 2,8	31,8 ± 6,7	28,6 ± 2,9
2,3-ДФГ, мкМ/гНв	10 ± 0,9	12,8 ± 1,3	7,4 ± 1,2	7,9 ± 1,1	6,4 ± 1,3	4,4 ± 1,1	3,5 ± 1,3	4,1 ± 1,2
АТФ, мкМ/гНв	4,2 ± 0,5	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,3	3,4 ± 0,6	2,8 ± 0,5	1,7 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,4
Поглощение синьки, %	58 ± 7,2	22 ± 2,4	67 ± 9,2	12 ± 1,9	73 ± 10,0	3,5 ± 1,5	79 ± 12	6,1 ± 2,0
pH	6,87 ± 0,04	6,41 ± 0,028	6,90 ± 0,030	6,45 ± 0,034	6,90 ± 0,40	6,44 ± 0,041	6,84 ± 0,050	6,46 ± 0,025
Вязкость	5,4 ± 0,42	2,32 ± 0,07	6,0 ± 0,56	2,28 ± 0,08	6,5 ± 0,56	2,49 ± 0,13	6,4 ± 0,53	2,43 ± 0,11

Деконсервированные, отмытые и взвешенные в плазмозамещающем растворе ЦОЛИПК-8в эритроциты разливали во флаконы емкостью 50 мл и хранили при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$. Исследования проводили в день деконсервирования на 2, 3, 5-й дни хранения. Исследовано 20 образцов деконсервированных эритроцитов (табл. 1).

Как видно из данных таблицы, количество эритроцитов, гематокрит, содержание общего гемоглобина в день деконсервации и в течение 5 дней хранения были значительно выше ($p < 0,001$) во взвеси деглицеринизированных эритроцитов, чем в замороженных с ПВП. Не выявлено достоверных различий в уровне свободного гемоглобина ($p < 0,01$).

Степень гемолиза в эритроцитах, замороженных с глицерином, во все сроки хранения была значительно ниже, чем в криоконсервированных с ПВП. В процессе хранения отмечалась более выраженная сфероуляция эритроцитов, криоконсервированных с ПВП, к 5-му дню количество сфероцитов было в 3 раза выше, чем во взвеси деглицеринизированных эритроцитов; начиная со 2-го дня хранения преобладали крупнотутовые формы. Осмотическая резистентность к 0,6%-ному раствору NaCl эритроцитов, замороженных с ПВП, при хранении постепенно снижалась и к 5-му дню уменьшилась до $53 \pm 7,4\%$, деглицеринизированных — осталась на 63—68% ($p > 0,05$) до 5-го дня.

По данным кислотных эритрограмм в деглицеринизированных эритроцитах во все сроки исследования количество пониженностойких форм было меньше, повышенностойких — больше, чем в замороженных с ПВП.

Количество внутриклеточного калия в день деконсервации в эритроцитах, консервированных с ПВП, было значительно меньше ($p < 0,01$), чем в деглицеринизированных, и составляло $37,8 \pm 4,2$ и $70,8 \pm 9,6$ мэкв/л. Во время дальнейшего хранения при положительной температуре этот показатель интенсивно снижался в деглицеринизированных эритроцитах, в замороженных с ПВП существенных изменений не было ($p > 0,05$). Уровень внеклеточного калия при хранении изменялся в обратной зависимости по сравнению с внутриклеточным.

Уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах, криоконсервированных с глицерином и ПВП, в день деконсервации не представлял достоверных различий ($p = 0,1$). Не было существенного различия в содержании 2,3-ДФГ в эритроцитах до замораживания и в день деконсервации.

При хранении деконсервированных эритроцитов в растворе «ЦОЛИПК-8в» при $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ не выявлено достоверных различий в содержании 2,3-ДФГ в зависимости от примененного криопротектора ($0,2 < p < 0,5$). Однако динамика потери клетками органического фосфата показывает, что в эритроцитах, криоконсервированных с ПВП, распад 2,3-ДФГ происходит более интенсивно.

Содержание АТФ в эритроцитах после деконсервации также существенно не отличается от уровня ее до замораживания. К 5-му дню хранения в клетках сохраняется около 50% исходного количества. Параллельно уменьшению содержания фосфорорганических соединений в эритроцитах наблюдалось нарастание неорганического фосфора (Фн).

Степень восстановления поглощения размороженными эритроцитами метиленовой синьки была значительно выше в эритроцитах, замороженных с глицерином, чем с ПВП, и в течение 5 дней оставалась на уровне 58—79% ($p > 0,1$). В эритроцитах, замороженных с ПВП, уже в день деконсервации степень восстановления синьки была ниже критической — всего 22%, а к концу срока наблюдения составляла всего 6,1%. рН взвесей деконсервированных эритроцитов практически не изменялся.

Относительная вязкость взвесей деглицеринизированных эритро-

цитов была выше, чем криоконсервированных с ПВП. При хранении в течение 5 сут существенных отличий в обеих взвесах выявлено не было ($p > 0,05$).

Обобщая данные сравнительного изучения морфо-функциональных свойств эритроцитов, криоконсервированных с глицерином и ПВП и их изменений на протяжении 5 сут хранения при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, можно констатировать следующее.

1. В день размораживания в деглицеринизированных эритроцитах выше содержание внутриклеточного калия, АТФ и способность к восстановлению метиленовой синьки.

2. В процессе дальнейшего хранения, уже на 2-3-й день, эти различия за исключением способности к восстановлению метиленовой синьки сглаживаются. Последнее говорит о том, что использование ПВП приводит к снижению в эритроцитах редуцированного трифосфопиридиннуклеотида и нарушению пентозо-фосфатного цикла.

3. Полученные данные свидетельствуют о нецелесообразности клинического применения размороженных эритроцитов позже 24 часов хранения при положительной температуре, независимо от применявшегося криопротектора (глицерин или ПВП).

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Крутиков В. А., Тальская И. Н. и др. Применение поливинилпирролидона при ультрабыстром замораживании цельной крови и эритроцитной массы и рациональные пути их для трансфузии в клинике. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1969, № 1, с. 41—48.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Леонтович В. А. Теоретические проблемы криоконсервирования клеток крови. — Пробл. гематологии, 1977, № 2, с. 3—9.
3. Лаврик С. С., Афанасьева Е. Ю., Полубояринова А. Г. и др. Консервирование эритроцитов с помощью низкомолекулярного поливинилпирролидона замораживанием при -196°C . — В кн.: Тез. докл. XII Междунар. конгр. по переливанию крови. М., 1969, с. 44—45.
4. Лаврик С. С., Полубояринова А. Г., Кушко О. В. и др. Консервирование эритроцитов глубоким замораживанием при применении низкомолекулярного поливинилпирролидона. — Пробл. гематологии, 1973, № 9, с. 15—19.
5. Лаврик С. С., Полубояринова А. Г., Утратин И. А. и др. Клиническое применение гомологичных и аутологичных эритроцитов. — В кн.: Материалы II Респ. конф. по трансплантации органов и тканей. Минск, 1973, с. 305—307.
6. Марголин А. З. Долгосрочное хранение эритроцитов в растворах ЦОЛИП-11 и ПВП-1 при температуре -196°C . — Здравоохранение Белоруссии, 1975, № 6, с. 76—77.
7. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, предназначенных для трансфузий. — М.: Центр. ин-т переливания крови, 1969. — 22 с.
8. Михнович Е. П., Рождественская М. А., Нельский Г. Г. Криоконсервация эритроцитов при -196°C проникающими и непроникающими веществами. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 161—164.
9. Пушкарь Н. С., Калугин Ю. В., Степин Л. Д. и др. К вопросу о механизме действия криофилактиков группы полиэтиленоксида. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 26—29.
10. Рудченко А. В. К вопросу о внутренних напряжениях в криофилактиках на основе глицерина при низких температурах. — В кн.: Болезни крови, кровезаместители, консервирование крови. — М.: Центр. ин-т переливания крови, 1975, с. 90—91.
11. Рыжков С. В., Холодный А. Я., Плешаков В. Т. и др. Криоконсервирование эритроцитов для клинического применения. — Пробл. гематологии, 1977, № 1, с. 19—22.
12. Скачилова Н. Н., Шахсуворов В. Д., Федорова Л. И. Применение размороженных отмытых эритроцитов для заполнения аппарата «Искусственная почка» при операциях гемодиализа. — Пробл. гематологии, 1974, № 7, с. 14—17.
13. Терентьева Х. И., Виноград-Финкель Ф. Р., Талеленова Н. Н., Крутиков В. А. Электронно-микроскопические исследования эритроцитов цельной крови, ультрабыстрозамороженной с поливинилпирролидоном в жидком азоте. — Пробл. гематологии, 1970, № 4, с. 20—26.
14. Терехов Н. Г., Полубояринова А. Г., Кушко О. В. и др. Функциональное состояние эритроцитов, замороженных с поливинилпирролидоном и их клиническое применение. — Пробл. гематологии, 1977, № 2, с. 16—19.
15. Шишкина И. Д., Данилова Л. А., Игнашева Л. П. и др. Применение комбинированного криофилактического раствора для замораживания клеток костного

- мозга. — Пробл. гематологии, 1975, № 9, с. 29—32.
16. *Шраго М. И.* Замораживание эритроцитов в растворах полиэтиленоксида. — Пробл. гематологии, 1971, № 6, с. 17—19.
 17. *Bricka M., Bessis M.* On the preservation of erythrocytes by freezing at low temperatures in the presence of polyvinyl-pyrrolidone and dextran. — C. r. Soc. biol., 1955, 149, N 9/10, p. 875—877.
 18. *Daszynsky Y.* Advances in the introduction of cryogenic methods in polish transfusiology. — Acta med. pol., 1974, 15, N 3, p. 173—188.
 19. *Mannoni P., Beaujean F., Le Forestier C. H.* Conservation des hematie par congelation en asote liquide. Utilisation du regenerateur de sang. — Rev. France Transfusiol., 1975, 18, N 4, p. 425—428.
 20. *Mashale H. Q.* Bedeutung der Tieftemperaturkonservierung von Blut für die Militärmedizin. — Z. Militärmed., 1974, 15, N 4, S. 190—194.
 21. *Richards V.* Initial experience with liquid nitrogen preserved blood, employing PVP as a protective additives. — Amer. J. Surg., 1964, 108, N 2, p. 313—322.
 22. *Seid S., Freund B., Schulz-Untermöhl H.* Untersuchungen zur Tiefkühlkonservierung von Blut. II. Derprotective Effect von Polyvinylpyrrolidon bei Einfriertemperaturen von -196°C . — Blut, 1971, 22, N 1, S. 19—26.

Центральный научно-исследовательский
институт гематологии и переливания
крови МЗ УССР

Поступила в редколлегию
06.04.78

УДК 57.043.615.361.018.51—012

М. В. Подольский, Ю. Р. Рыболовлев

О ЛИОФИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Проблема лиофилизации красных клеток много лет привлекает внимание исследователей в связи с заманчивыми перспективами, которые могут открыться в случае положительного решения этой задачи. Возможность долгосрочного хранения эритроцитов в высушенном состоянии имеет исключительно важное значение для медицины. В то же время присутствие воды — неременное условие для прохождения биохимических реакций, составляющих основу жизни. Таким образом, изучение процесса лиофилизации клеток выходит за рамки частных вопросов и является проблемой общебиологического значения.

Снижение содержания воды в клетке понижает ее активность. При этом считают, что изменения в согласованности процессов жизнедеятельности оказываются более выраженными в тканях, богатых водой. Эритроциты — сравнительно «сухие клетки» содержат 71% воды (по весу), в то время как содержание воды в большинстве клеток тела человека выше 80% [10], и поэтому эритроциты оказываются удобным объектом для изучения процесса лиофилизации. Тем не менее в литературе встречаются лишь единичные сообщения о попытках высушивания этих клеток с последующим обводнением и переводом в нативную плазму [13, 14]. Эти публикации носят характер предварительных сообщений и не дают возможности судить об эффективности полученных результатов.

На пути решения перспективной задачи о лиофилизации эритроцитов множество препятствий. Первый и обязательный этап процесса лиофилизации — замораживание. Замораживание эритроцитов — практически решенная проблема. Однако непосредственное перенесение накопленного в этой области опыта на лиофилизацию клеток крови невозможно в связи со спецификой процесса сублимационной сушки.

Попытки предварительного замораживания клеток по методике, применяемой для плазмы [2], или с помощью распыления в жидкий азот [16] и петроэфир [9] показали непригодность этих методов замораживания для лиофилизации эритроцитов. Одна из возможных причин неудачи в этих экспериментах — большой диаметр получаемых гранул.

Меримен [14] предложил наносить суспензию эритроцитов в виде тонкой пленки на нейлоновую сетку и с минимальными повреждениями высушивал замороженные клетки из цельной крови или физиологического раствора без ограждающих сред.

В экспериментах, проводившихся в нашей лаборатории, удалось подтвердить данные Меримена и удачно провести сублимационную сушку эритроцитов на нейлоновой сетке.

Другие авторы осуществляли процесс сушки из среды криопротекторов и растворов особого состава, из которых следует выделить два: содержащие большие концентрации сахаров [13] либо высокомолекулярные коллоидные вещества [5]. Мы применяли поливинилпирролидон, полиглюкин, альбумин, полиэтиленгликоль [3, 7, 8]. Имеются сообщения о замораживании эритроцитов в растворах декстрана, декстрана и сахарозы, приготовленных на растворе Хенкса. Однако наилучшие результаты достигнуты при замораживании клеток крови в полиэтиленгликоле с натрий-цитратным буфером [13]. Использовался также раствор поливинилпирролидона с добавкой сыворотки эмбриона теленка [11].

К сожалению, авторы названных выше работ не указывают ни рН буферных растворов, ни концентрацию криопротекторов, а в некоторых случаях ограничиваются только названием класса применявшихся соединений, что затрудняет воспроизведение результатов и их сравнительную оценку.

Как показали специальные исследования [4], сильное влияние на качество препарата после сушки оказывают толщина образца, температура сублимации и время взаимодействия паров воды с сухим каркасом. Для сокращения времени сушки клеток нами предложен метод высушивания эритроцитов в тонком слое в виде пленки, толщина которой не превышает 6—8 мк. В этом случае обеспечивалось удаление пара с двух поверхностей сублимации [8]. Получение тонких пленок крови осуществлялось в специальном держателе из тонкой проволоки, выполненном в виде кольца диаметром 10—60 мм.

Пленки можно замораживать в парах азота или при более низкой температуре. В литературе нет единого мнения о температуре сублимации и приводятся данные о применении температуры от -11 до -14°C [1], от -30 до -35°C [14, 15], -70°C [13], -76°C [11]. По нашим данным, наилучшие результаты достигаются при температуре высушивания образца ниже -70°C .

Вопрос об оптимальном значении давления в сублимационной камере до сих пор остается открытым и не нашел отражения в доступной литературе. Наши эксперименты показали, что наиболее благоприятные условия сублимации льда создаются в том случае, когда давление паров воды над препаратом на несколько порядков превосходит давление неконденсирующихся газов в камере.

Остаточная влажность биопрепарата после лиофилизации — принципиально важная характеристика. Считают, что животные клетки не переносят высушивания до 5% остаточной влажности. По нашим данным, наилучшие результаты можно получить в том случае, если остаточная влажность сухих эритроцитов равна 8—10%, что хорошо согласуется с мнением других исследователей [1, 14].

В отношении состава регидратирующего раствора существует несколько подчас диаметрально противоположных рекомендаций. Наиболее удачные результаты получены авторами, применявшими растворы, содержащие коллоиды [6—8, 12—15]. Имеются предложения использовать для регидратации лиофилизированных эритроцитов дистиллированную воду [11]. Очевидно, в таких условиях регидратации положительный результат может быть достигнут только с помощью каких-то особых технических приемов, информация о которых в рабо-

те отсутствует. Результаты исследований, проводившихся в нашей лаборатории, показали, что клетки лучше восстанавливаются в растворах, содержащих повышенные концентрации солей (до 4% натрия хлорида).

Следует подчеркнуть, что восстановление морфологически целостных эритроцитов после лиофилизации и хранения в высушенном состоянии еще не означает их функциональной полноценности. В связи с этим обращает на себя внимание полное отсутствие в литературе данных о метаболических и функциональных изменениях в эритроцитах, подвергавшихся высушиванию из замороженного состояния. Указанные вопросы требуют исследования.

Таким образом, данные литературы, а также исследования, проведенные в нашей лаборатории, не достаточны для решения перспективной проблемы лиофилизации и хранения эритроцитов человека в высушенном виде. Работы по высушиванию эритроцитов с применением криопротекторов и использованием различных сублимационных аппаратов, позволяющих варьировать условия и скорость высушивания, нами продолжаются.

Для более успешного решения поставленной задачи необходимы привлечение и активное участие специалистов разных медико-биологических и технических направлений.

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е., Федорова Л. И. Проблема лиофилизации красных клеток крови человека для их длительного консервирования. — Пробл. гематологии, 1965, № 6, с. 3—12.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Лехцова Т. Л. К вопросу о применении сублимационного метода сушки для консервирования лейкоцитарной массы. — Тр. ВНИИ хим. машиностроения, 1959, вып. 30, с. 63—69.
3. Киселев А. Е., Подольский М. В., Скурят Э. Н. Изыскание оптимальных условий высушивания эритроцитов. — Пробл. гематологии, 1968, № 2, с. 3—7.
4. Лаковская И. А. Определение параметров сублимационного консервирования и исследование их влияния на сохранение исходных биологических свойств объектов: Автореф. дис. канд. ... техн. наук. — М., 1971. — 28 с.
5. Лаковская И. А., Семенова Н. В. Сублимационная сушка эритроцитов человека с сохранением их морфологической структуры. — Соврем. пробл. гематологии и переливания крови, 1964, вып. 37, с. 57—59.
6. Подольский М. В. Высушивание препаратов крови и кровезаменителей. — М.: Медицина, 1973. — 192 с.
7. Подольский М. В. Замораживание и высушивание биологических материалов в тонких пленках и гранулах. — В кн.: Современные проблемы криобиологии и криомедицины. М.: Медицина, 1975, с. 155—160.
8. Подольский М. В., Скурят Э. Н., Киселев А. Е. А. с. 255419 (СССР). Способ сушки живых клеток в тонком слое. — Оpubл. в Б. И., 1969, № 33.
9. Подольский М. В., Чеснокова В. Ф. Лиофилизация гранулированных препаратов. — Лаб. дело, 1970, № 3, с. 180—182.
10. Черниговский В. Н. Физиология системы крови. — Л.: Наука, 1968. — 279 с.
11. Damjanovic V., Thomas D. Protection of membranes of human erythrocytes and lymphocytes against freeze-drying damage. — Cryobiology, 1974, 11, N 6, p. 557.
12. Greaves R. I. N. Preservation of living cells by freezing and drying. — In: Progress recents es lyophilisation. Paris. Hermann, 1962, p. 167—179.
13. Mac-Kenzie A. P., Rapatz G. J. Freeze-drying preservation of human erythrocytes. — Cryobiology, 1971, 8, N 4, p. 320.
14. Meryman H. T. Drying of living mammalian cells. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 85, p. 729—734.
15. Meryman H. T. Freeze-drying. — In: Cryobiology. New York: Acad. press, 1966, p. 610—620.
16. Meryman H. T., Kafir E. Survival of spermatozoa following drying. — Nature, London, 1959, 184, p. 470.

Научно-исследовательский
институт гематологии
и переливания крови МЗ СССР

Поступила в редколлегию
06.03.78

ДЕЙСТВИЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ
НА *BACILLUS THURINGIENSIS*

Литературные данные свидетельствуют о том, что некоторые микроорганизмы могут переносить действие низких и сверхнизких температур [4—6]. Однако по своей устойчивости к холоду одни виды менее, а другие более устойчивы [4, 5]. Разной устойчивостью обладают вегетативные и споровые формы, а также бактерии в зависимости от исходного физиологического состояния [6].

В доступной литературе нет данных о возможности консервирования (-196°C) микроорганизмов группы *B. thuringiensis* — сегоеус, широко используемых в народном хозяйстве для борьбы с вредителями сельскохозяйственных и лесных насаждений.

В связи с этим нами изучено влияние низких температур (-196°C) на некоторые физиологические свойства *B. thuringiensis*, в частности на скорость их роста в мясопептонном бульоне (МПБ), формирование эндоспор и параспоральных включений, биосинтез белка и ДНК.

Исследовали 16-часовую культуру *B. thuringiensis* var. *galleriae*, находящуюся в стационарной фазе роста. После центрифугирования культуру трижды отмывали физиологическим раствором и суспендировали в ней бактериальный осадок. Оптическую плотность взвеси доводили до показателя 1,5—1,8 на ФЭК-56 (фильтр № 8, красный).

Замораживание проводили при быстром погружении пробирок, содержащих 1,5 мл бактериальной взвеси, в жидкий азот. Размораживали на водяной бане при $+41^{\circ}\text{C}$. Контрольные пробы хранили при $+4^{\circ}\text{C}$.

Для изучения динамики размножения деконсервированной и исходной культур по 3 мл инокулята вносили в колбы объемом 250 мл со 100 мл МПБ и 0,3% глюкозы и выращивали с аэрацией при $+28^{\circ}\text{C}$. Контроль за скоростью роста осуществляли в течение суток по показателям оптической плотности, величины рН культуральной жидкости. Количество жизнеспособных особей определяли после высева суспензии на мясо-пептонный агар (МПА) с последующим подсчетом количества выросших колоний.

Споро- и кристаллообразование *B. thuringiensis* изучали на МПА в течение 7 дней, приготавливая через день мазки из культуры и подсчитывая под микроскопом количество клеток, спор и параспоральных телец (белковых кристаллов). Мазки окрашивали по методу Смирнова [4], заменив кислотный азокраситель анилиновым черным.

Интенсивность биосинтеза белка и ДНК изучали на стадии подготовки к делению (*lag*-фаза), на стадии логарифмического (*log*-фаза) и стационарного роста с использованием нитроцеллюлозных фильтров («Сынпор», ЧССР) по методике Кеннела [2]. Продолжительность каждой из этих фаз определяли в предварительных экспериментах. Бациллы после деконсервации, а также не подвергавшиеся замораживанию высевали в МПБ и инкубировали, как описывалось выше. Предшественники (^3H -тимидин, ^{14}C -аминокислоты) вносили спустя 1; 5; 16 ч культивирования в МПБ в суспензии бактерий, приготовленных на физиологическом растворе, и инкубировали затем в течение 45 мин при $+28^{\circ}\text{C}$. Радиоактивность проб измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «SL-40-Intertechnique» и выражали в количестве импульсов в 1 мин на $1 \cdot 10^8$ клеток. Статистическую обработку результатов проводили по Фишеру—Стьюденту.

Как показали результаты исследований, после кратковременного пребывания микроорганизмов при температуре -196°C пролонгиро-

вались *lag*- и *log*-фазы роста бактерий, о чем свидетельствовало изменение скорости оптической плотности, величины рН культуральной жидкости и количества жизнеспособных особей на этом этапе развития (рис. 1). Количество образуемых бациллами спор и кристаллов после кратковременного замораживания не изменялось (рис. 2). При этом количество спор равнялось количеству кристаллов, что характерно для исходной культуры *B. thuringiensis* var. *galleriae* [7].

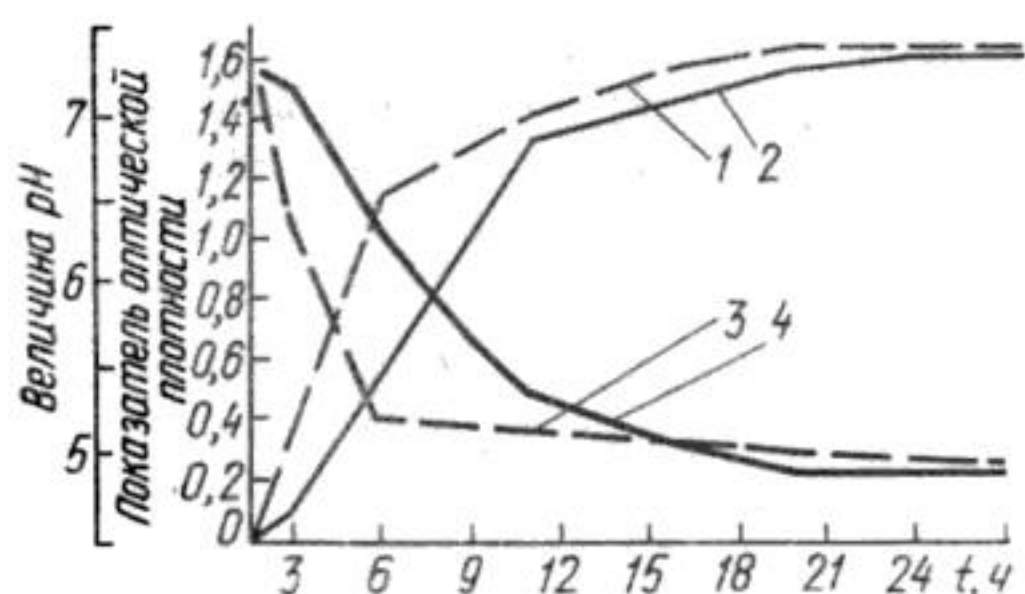


Рис. 1. Динамика роста на МПБ нативной и деконсервированной культур *Bac. thuringiensis*:

1, 2 — оптическая плотность; 3 — lg количества клеток; 4 — рН; (1, 3 — нативная культура; 2, 4 — деконсервированная культура).

Интенсивность биосинтеза ДНК и белка у культуры, подвергнутой замораживанию в стационарной фазе роста, выраженная в процентах к уровню биосинтеза в нативной культуре, составила: а) в *log*-фазе $56,7 \pm 5,9$ для ДНК, $64,1 \pm 7,1$ для белка; б) в *log*-фазе $102,7 \pm 7,2$ для ДНК, $94,8 \pm 7,5$ для белка; в) в стационарной фазе роста $53,3 \pm 14$ для ДНК и $79,2 \pm 6,1$ для белка (рис. 3).

Проведенные экспериментальные исследования указывают на то, что замораживание вегетативных форм *B. thuringiensis*, находящихся в стадии стационарного роста, до -196°C в целом не оказывает отрицательного влияния на морфо-функциональные свойства микроорганиз-

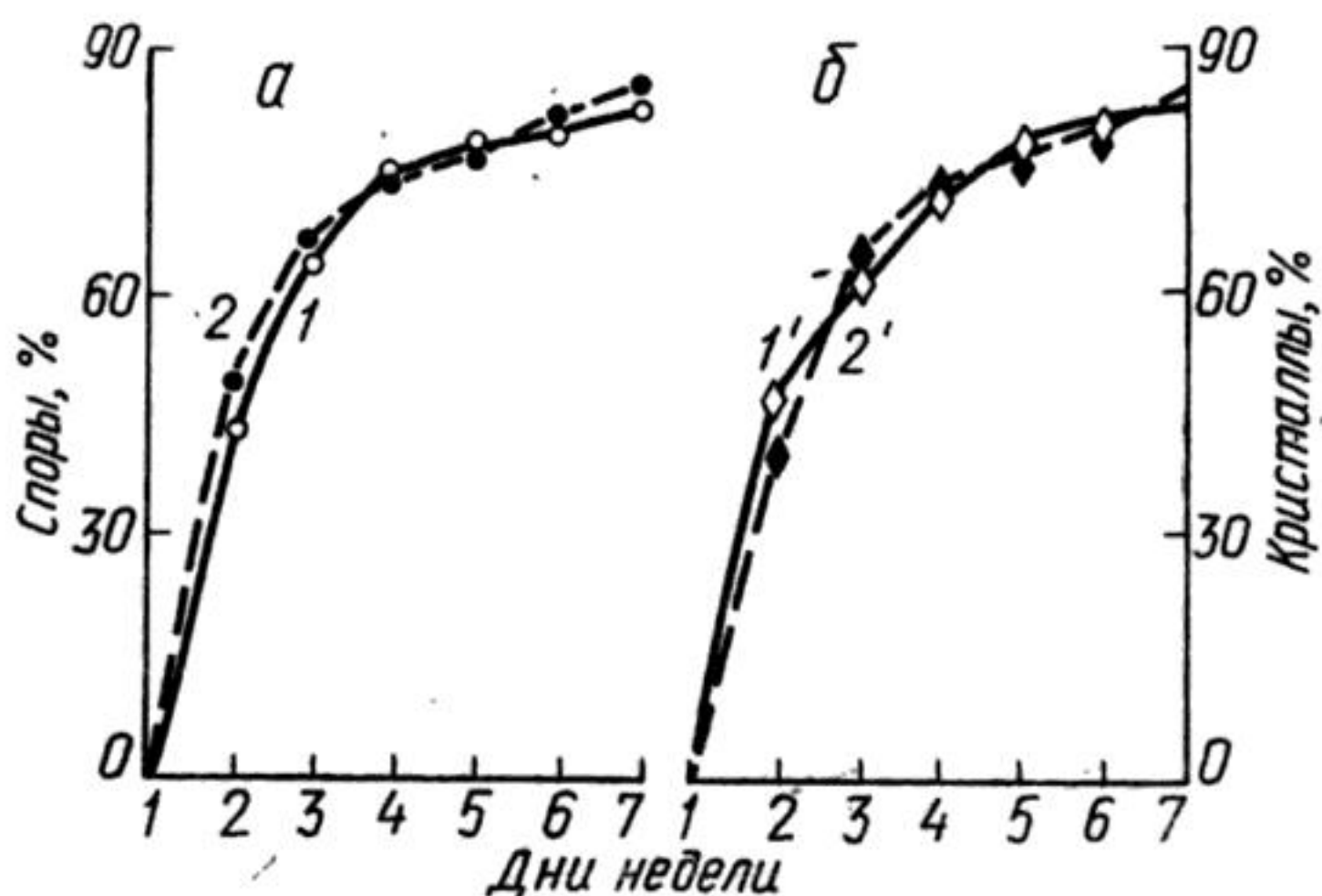


Рис. 2. Спорообразование (а) и кристаллообразование (б) в деконсервированной (1, 1') и нативной (2, 2') культурах.

ма. При инкубации деконсервированной культуры, однако, наблюдаются более продолжительный период задержки роста и период логарифмического роста. Основные причины задержки роста микроорганизмов известны в литературе [3]. К ним относятся: изменения в питании и окружающих физических условиях; присутствие ингибитора; прорастание спор; исходное состояние засеваемой культуры. Действие процессов глубокого охлаждения и отогрева, очевидно, вызывает обратимые и необратимые изменения гомеостаза клеток популяции, приводящих к задержке роста на начальных этапах развития культуры. Наличием в деконсервированной микробной популяции осо-

бей с разной пролиферативной и метаболической активностью, зависящей от «точек приложения» криовоздействия, возможностей репаративной системы, можно, по-видимому, объяснить снижение интенсивности включений меченых предшественников в ДНК и белок по сравнению с аналогичными показателями у нативной культуры. В процессе последующего роста и развития деконсервированная культура, как и нативная, переходит в стадию споры с образованием параспорального белкового кристалла.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что вегетативная форма культуры *B. thuringiensis* при данном режиме охлаждения и отогрева сохраняет морфофункциональные свойства, присущие данной группе микроорганизмов.

1. Иванов Г. М., Гукасян А. Б. Окраска кристаллов, спор и вегетативных клеток энтомопатогенных бактерий. — Микробиология, 1966, 35, вып. 1, с. 179—180.
2. Кеннел Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1970, с. 138—145.
3. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.
4. Шмидт П. Ю. Анабиоз. — М.; Л.: Биомедгиз, 1936. — 295 с.
5. Ata S., Staib F. Kalteeinfluss auf Hefen und Hefeartige Pilze. — Zbl. Bacteriol., Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg., Abt. II, 1957, 110, H. 21/25, S. 659—672.
6. Lapage S. P., Redway K. F. Preservation of microorganisms. — Hand. Microbiol., 1973, 1, p. 713—724.
7. Trümpf B. Analytische Untersuchungen endotoxin von *Bacillus thuringiensis*. — Zbl. Bacteriol., Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg., Abt. II, 1976, 131, H. 21/25, S. 659—672.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
03.04.78

УДК 57.043:591.463.1

Б. А. Скорняков, В. И. Вишневский

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА КРИОПРОТЕКЦИИ ГЛИЦЕРИНОМ

В настоящее время одним из широко распространенных криопротекторов является глицерин, применяемый при низкотемпературном консервировании клеток крови, спермы сельскохозяйственных животных и других биообъектов. В то же время о механизме криозащитного действия глицерина существуют противоречивые суждения [11, 10, 5]. Большинство высказанных гипотез основывается на способности глицерина активно взаимодействовать с водой, изменяя ее физико-химические свойства. Глицерин взаимодействует с водой не только в окружающей клетки среде, но и внутри клеток. Обязательно ли для полноценной сохранности биообъектов проявление криозащитных

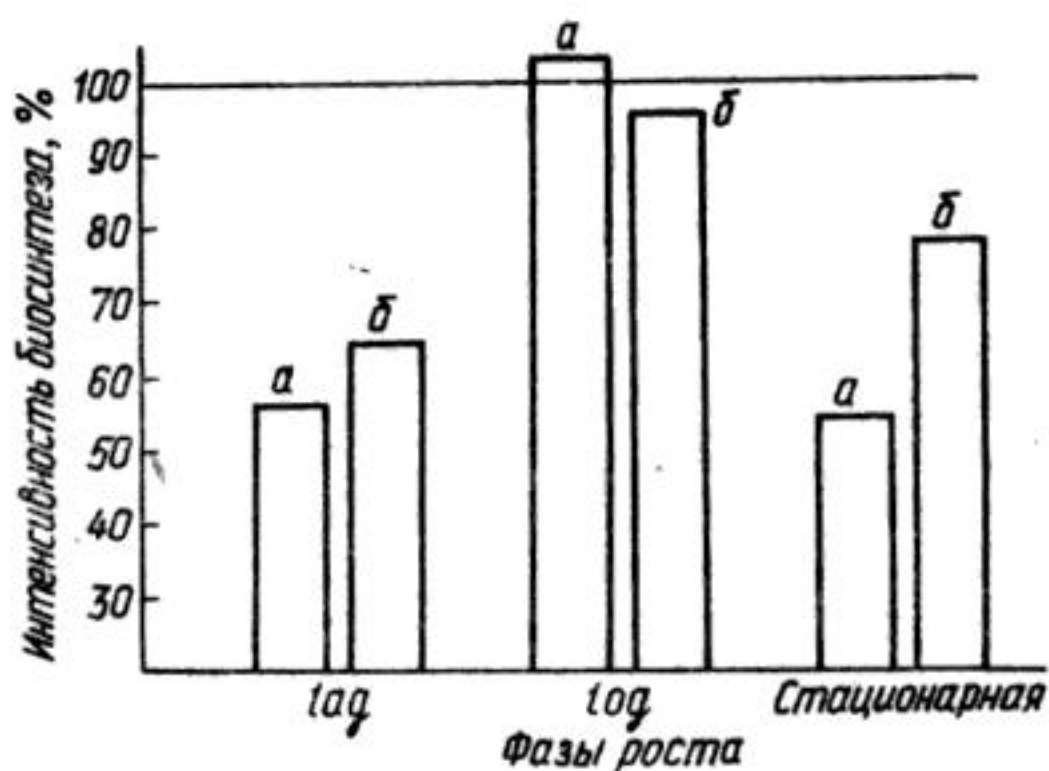


Рис. 3. Интенсивности биосинтеза ДНК и белка у деконсервированной культуры *Bacillus thuringiensis* на различных стадиях роста (в процентах к показателям биосинтеза нативной культуры):

а — уровень синтеза ДНК; б — уровень синтеза белка.

свойств глицерина внутри клеток? Экспериментальные противоречия обусловили актуальность этого вопроса.

Первоначально господствовало мнение об обязательности проникновения криопротектора в клетки [16, 17]. В противовес этим воззрениям отечественными и зарубежными авторами разработаны методы низкотемпературного консервирования биообъектов на основе не проникающих в клетки криопротекторов [4, 9]. Широко распространенным, однако, оставалось мнение о том, что криопротекторы, главным образом глицерин и ДМСО, должны для обеспечения эффективной защиты проникать в клетки [17, 18]. Все же и для этих криопротекторов разработаны методы замораживания клеточных суспензий, когда внутриклеточная защита практически не проявлялась. Так, эритроциты крови быка можно успешно замораживать при внутриклеточном содержании глицерина, существенно меньшем необходимого [12]. Бернтдсон и Фут [6, 7] сообщили о лучшей сохранности спермиев быка, когда суспензия клеток замораживалась через 10 с после добавления глицерина, а не через 4—5 ч, как требуется для оптимального насыщения клеток криопротектором [3].

Таким образом, наряду с установившимся разделением криопротекторов по способу действия на экзо- и эндоцеллюлярные формируется мнение о необязательном присутствии последних в клетках в больших концентрациях.

В работе [13] представлены результаты исследований и критический анализ литературных данных по этому вопросу. Авторы целенаправленно и вполне обоснованно приводят к пониманию механизма криопротекции глицерином, основанного на изменении свойств внеклеточной среды. Однако только обеспечение необходимых изменений свойств среды и обезвоживания клеток, вероятно, не исчерпывает всех направлений, по которым реализуются защитные свойства экзоцеллюлярных криопротекторов. Не исключено, что они могут предохранять цитоплазматическую мембрану от криповреждений, поскольку находятся с ней в физико-химическом контакте.

Нами предпринята попытка выявить и качественно оценить роль криопротекции мембран в общем эффекте защиты глицерином клеток при замораживании. Эксперименты проведены со спермой быков. В основу методики исследований принято известное по литературным данным положение об относительно медленной скорости проникновения глицерина в спермии быка. Так, эмпирически найденное время эквilibрации спермы с глицерином — порядка 4 ч. Есть также данные, свидетельствующие о том, что 15 ч эквilibрации дает лучшие результаты [8]. Изотопным методом определена динамика проникновения глицерина (меченного ^{14}C) в спермии [2]. Максимальное количество глицерина (до 33% объема клетки) проникает в спермии через 8 ч. За первые 2 ч эквilibрации в клетки проникает меньше половины этого количества, а за первые минуты эквilibрации, исходя из экстраполяции данных, в клетках найдены только следы глицерина. Поскольку глицерин относительно медленно проникает в спермии, представляется возможность оценить порознь его криозащитное действие внутри и вне клетки.

Методика экспериментов состояла в следующем. Для исследований отбирали 2,0 мл цельной спермы с активностью не ниже 8,0 баллов (примерно 80% прямолинейно подвижных спермиев) и с концентрацией не менее 800 млн. активных спермиев в 1 мл. Сперму делили на три части: 0,5; 1,0 и 0,5 мл и разбавляли лактозно-желточно-глицериновой средой 1:1. Первую часть с конечным содержанием глицерина 0,7%, вторую — 3,5%, последнюю часть разбавляли аналогично, но средой, не содержащей глицерин. Все пробы помещали в холодильник при $+4^\circ\text{C}$ для эквilibрации в течение 4 ч. Для создания исследуемых

условий в суспензиях клеток, когда криопротектор присутствует в оптимальном количестве только в среде и только в клетках, после эквilibрации образцы спермы разбавляли повторно холодной лактозно-желточно-глицериновой средой разного состава в соотношении 1:5. В первом образце концентрация глицерина оставлена 0,7%, второй образец делили на две части и первую разбавляли так, что глицерина оставалось 3,5%, а во второй — 0,7%, в третий образец добавляли среду такого состава, что конечная концентрация глицерина была 3,5%. Окончательно в эксперименте было четыре образца спермы. Каждый образец сразу после разбавления замораживали в виде гранул, наносимых на охлажденную до -80°C фторопластовую пластинку. В среднем время, затрачиваемое на операции от второго разбавления до нанесения гранул на пластину, составляло 20 с. Оттаивание проводили в емкости, термостатированной при 40°C и содержащей 2,8%-ный раствор цитрата натрия в объеме, равном объему оттаиваемых гранул. В экспериментах определяли активность спермы, а после оттаивания дополнительно определяли переживаемость спермиев при 38°C , выражая ее в абсолютном показателе живучести S , равном половине активности спермы за первый час переживания плюс сумма последующих активностей, определяемых каждый час.

В результате экспериментов установлено, что после оттаивания в первом образце активность в среднем была $2,5 \pm 0,3$ и $S = 3,2 \pm 0,51$, во втором — $4,1 \pm 0,31$ и $S = 14,3 \pm 0,62$, в третьем — $3,5 \pm 0,52$ и $S = 11,42 \pm 0,43$, в четвертом — $4,2 \pm 0,41$ и $S = 17,13 \pm 0,71$.

Обсуждение результатов целесообразно начать с определения изучаемого состояния образцов. Прежде всего необходимо отметить, что в лактозно-желточно-глицериновой среде все три компонента обладают криопротекторными свойствами. Поэтому даже полное отсутствие глицерина не вызывает гибели всех клеток при замораживании. Это обстоятельство — весьма важное условие в достижении поставленной в работе цели, поскольку позволяет варьировать содержание глицерина в суспензии от 0 до оптимального при возможности получения жизнеспособности деконсервированных клеток в виде монотонной, без областей размыва, функции от концентрации исследуемого криопротектора.

Опытными образцами являются третий и четвертый. В третьем образце, эквilibрированном 4 ч с 3,5% глицерина, за 20 с до замораживания концентрация глицерина уменьшалась до 0,7%. Учитывая относительно медленную проницаемость глицерина через клеточную мембрану, можно считать, что достигнуто состояние, когда клетки оптимально насыщены глицерином, а окружающая среда существенно обеднена им. Контролем влияния столь малой концентрации криопротектора в суспензии на эффект криозащиты клеток является результат замораживания первого образца. В последнем образце созданы условия, когда в окружающей клетки среде было оптимальное количество глицерина, а в самих клетках он практически отсутствует.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что когда глицерин в оптимальном количестве присутствует только в среде и в существенно меньшем оптимального количестве в клетках, то сохранность спермиев ухудшается. Однако ее уровень достоверно выше, чем в контрольном образце с 0,7% глицерина.

Как известно из метода анализа последовательными исключениями, если изучаемый фактор последовательно действует в смежных областях, разделенных материальной границей, и при этом достигается примерно одинаковый эффект, то местом приложения — мишенью — фактора является сама граница раздела. В нашем случае положительный эффект в сохранности замораживаемых клеток достигается в случае оптимального содержания криопротектора только в среде или только в клетках. Из этого можно заключить, что одним из

мест приложения или реализации криозащитных свойств глицерина является граница раздела, т. е. цитоплазматическая мембрана.

Поскольку равенство изученных эффектов криозащиты далеко не полное даже в случае смягчающего действия на процессы криоповреждений еще двух криопротективных веществ, роль криозащиты мембран в общем механизме, обеспечивающем сохранность клеток, не может считаться исключительной. Тем не менее нам она представляется существенной и заслуживающей должного внимания при разработке теории криопротекции.

Таким образом, для успешной криопротекции спермы быков наличие глицерина в клетках не обязательно. В суммарный эффект криозащиты спермиев существенный вклад вносит защитное действие глицерина на границе среда—цитоплазматическая мембрана.

1. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных. — М.: Сельхозгиз, 1962. — 696 с.
2. Мусульбас М. С., Вишневский В. И. К вопросу о проницаемости глицерина — C^{14} в спермии быка. — Науч.-техн. бюл., Харьков, 1974, № 11, с. 9—14.
3. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. — Киев: Урожай, 1968. — 324 с.
4. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 343 с.
5. Рэ Л. Консервация жизни холодом. — М.: Медгиз, 1962. — 175 с.
6. Berndtson W. S., Foot R. H. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. — Cryobiology, 1969, 5, N 6, p. 398—402.
7. Berndtson W. S., Foot R. H. The freezability of spermatozoa after minimal pre-freezing exposure to glycerol or lactose. — Cryobiology, 1972, 9, N 1, p. 57—60.
8. Clegg E. D., Komarek R. J., Pickett B. W. Preliminary investigations on glycerol entry into spermatozoa. — J. Dairy Sci., 1965, 48, N 12, p. 1709—1711.
9. Lionetti F. J., Hunt S. M. Cryopreservation of human red cells in liquid nitrogen with hydroxyethyl starch. — Cryobiology, 1975, 12, N 2, p. 110—118.
10. Lovelock J. E. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis of freezing and thawing. — Biochim. et biophys. acta, 1953, N 11, p. 28—36.
11. Luyet B. J., Geheio P. M. On the mode of action of glycerol in preventing injury by freezing in embryonic tissues of chick. — Science, 1952, N 16, p. 526—536.
12. Mazur P., Miller R. H., Leibo S. P. Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. — J. Membr. Biol., 1974, N 15, p. 137—158.
13. Mazur P., Miller R. H. Survival of frozen—thawed human red cells as a function of permeation of glycerol and sucrose. — Cryobiology, 1976, N 13, p. 523—536.
14. Mazur P., Miller R. H. Permeability of human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 or 20°C. — Cryobiology, 1976, N 13, p. 507—522.
15. Meryman H. T. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. — Nature, 1968, 218, N 5139, p. 333—336.
16. Meryman H. T. Review of biological freezing. — In: Cryobiology Ed. H. T. Meryman. New York: Acad. press, 1966, p. 1—114.
17. Meryman H. T. Cryoprotective agent. — Cryobiology, 1971, N 8, p. 137—183.
18. Meryman H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. — Cryobiology, 1971, N 8, p. 489—500.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08.03.78

УДК 57.043

Ю. П. Тимошенко, П. Л. Пахомов

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПРОЦЕССА РАЗМОРАЖИВАНИЯ БИООБЪЕКТОВ МЕХАНИЗМОМ ТЕПЛОПРОВОДНОСТИ

Разработка и внедрение методов криоконсервирования биообъектов в практику выдвигают ряд задач, связанных с теплотехническим расчетом процессов замораживания-размораживания. В литературе имеются сведения о моделировании процесса замораживания [2] и расчете возникающих температурных полей в биообъекте [1, 4]. Наряду с решением нелинейных задач теплопроводности, имеющих, как

правило, сложный вид, в ряде случаев полезно иметь простые расчетные соотношения [9], позволяющие с достаточной для практики точностью оценить основные параметры процесса.

Упрощенно процесс размораживания расчленен нами на две стадии. На первой, ввиду большого коэффициента теплопроводности твердой фазы и градиента температур, тепло расходуется на повышение температуры образца от $T_{\text{хран}}$ до $T_{\text{плавл}}$. Вторая стадия охватывает промежуток времени, в течение которого фронт плавления продвигается в глубь образца до полного его перехода в жидкую фазу.

Для получения необходимых расчетных соотношений были приняты следующие допущения: а) теплофизические характеристики биообъектов, обладающие температурной зависимостью, рассматриваются как усредненные величины; б) фазовый переход считается происходящим в узком температурном интервале, вблизи усредненного значения температуры; в) процесс плавления считается медленным и равновесным; г) размораживаемая среда однородна и изотропна, внутренние источники теплоты отсутствуют; д) термическое сопротивление стенки контейнера (металлического) мало, а все многообразие их типов сведено к телам простейшей формы, характерной особенностью которых является то, что при симметричных условиях нагрева они имеют одномерные температурные поля.

Построение математической модели процесса размораживания основывается на решении соответствующих краевых задач [5], для уравнения Фурье $\partial t / \partial \tau = a \nabla^2 t$ в твердой фазе (обозначено индексом 1) и уравнения Лапласа $\nabla^2 t = 0$ в жидкой фазе (индекс 2) при заданных и граничных условиях.

В практике широко используются граничные условия 1-го рода (нагрев контейнера в теплоносителе, воде, с постоянной температурой $T_1 = +40^\circ\text{C}$). Технические трудности в управлении скоростью нагрева

образца при заданных условиях вызывают необходимость поиска других методов. Перспективным для осуществления программного нагрева [6] может оказаться использование токов высокой частоты для нагрева металлических стенок контейнера (граничные условия 2-го рода). Данный вид нагрева обладает высокой степенью стерильности, безынерционностью в управлении, возможностью создания больших тепловых потоков.

Размораживание при граничных условиях 1-го рода. При выбранных условиях температура объекта может изменяться только вдоль оси, направленной нормально к изотермической поверхности (см. рис. 1, а, б). Для первой стадии процесса рассматривается одномерная задача теплопроводности соответственно для плоского и цилиндрического (*) контейнера:

$$\begin{aligned} \frac{\partial t_1}{\partial \tau} &= \left(\frac{\lambda_1}{C_1 \rho_1} \right)^2 \frac{\partial^2 t_1}{\partial x^2} = a_1^2 \frac{\partial^2 t_1}{\partial x^2}; \\ \frac{\partial t_1^*}{\partial \tau} &= a_1^2 \frac{\partial^2 t_1^*}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial t_1^*}{\partial r} \end{aligned} \quad (1)$$

при начальных $t_1(\tau=0) = T_1 = \text{const} = -196^\circ\text{C}$ и граничных условиях

$$\begin{aligned} t_1(0, \tau) &= t_1(d, \tau) = T_{\text{пл}}; \\ t_1^*(0, \tau) &= t_1^*(R, \tau) = T_{\text{пл}}. \end{aligned}$$

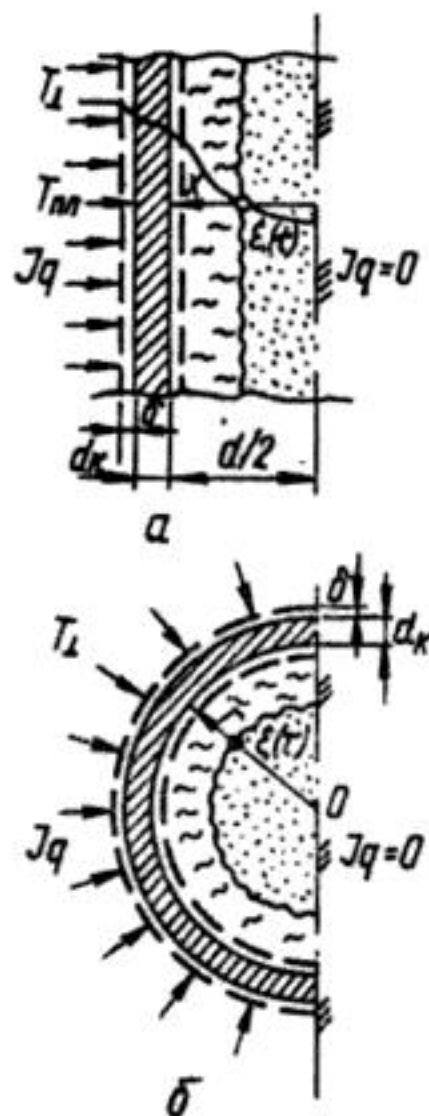


Рис. 1. Нагрев плоского (а) и цилиндрического (б) контейнера.

где C — теплоемкость; ρ — плотность; λ — коэффициент теплопроводности; a — коэффициент температуропроводности.

Решение задачи может быть представлено суммой бесконечного ряда, члены которого расположены по быстро убывающим экспоненциальным функциям

$$t_1 = \frac{4}{\pi} (T_1 - T_{пл}) \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\sin(2m+1) \frac{\pi x}{d}}{2m+1} \cdot e^{-\frac{(2m+1)^2 \pi^2 a_1 \tau}{d^2}} + T_{пл}; \quad (2a)$$

$$t_1^* = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{2(T_1 - T_{пл})}{\mu_n J_1(\mu_n)} \cdot e^{-\frac{\mu_n^2 a_1 \tau}{R^2}} \cdot J_0\left(\mu_n \frac{r}{R}\right) + T_{пл}, \quad (2б)$$

где μ_n — корень уравнения $J_1(\mu_n) = 0$.

Начиная с момента времени $\tau^* \geq -(d^2/8\pi a_1^2) \times \ln 3\varepsilon$ наступает регулярный режим, при котором отношение суммы членов ряда, начиная со 2-го, к 1-му члену с ($n=0$) равно сколь угодно малому числу ε . В этом случае приближенное выражение температурной кривой имеет вид

$$t_1(\tau > \tau^*) = T_{пл} + \frac{4}{\pi} (T_1 - T_{пл}) \cdot \sin \frac{\pi x}{d} e^{-\frac{\pi^2 a_1 \tau}{d^2}}, \quad (3a)$$

$$t_1^*(\tau > \tau^*) = T_{пл} + \frac{2(T_1 - T_{пл})}{\mu_n J_1(\mu_n)} \cdot e^{-\frac{\mu_n^2 a_1 \tau}{R^2}} \cdot J_0\left(\mu_n \frac{r}{R}\right). \quad (3б)$$

Можно показать, что начиная с $\tau^* = 3d^2/\pi^2 a_1^2$ или $\tau^* = 3R^2/\mu_1^2 a_1^2$ первое слагаемое в уравнении (3) делается весьма близким к $T_{пл}$, и процесс нагрева твердой фазы образца можно считать окончанным. Как видно из формул, длительность первой стадии процесса сильно зависит от линейного размера объекта. Так, для плоского контейнера с $d=1$ мм регулярный режим ($\varepsilon=0,2$) наступает через 0,5 с, а $T_{пл}$ — через 25 с. Нетрудно видеть, что длительность нагрева контейнера цилиндрической формы с (R) и плоского с $d = \frac{\pi}{\mu_1} R \approx 1,3R$ — одного порядка. С учетом данных [7], оценка времени нагрева цилиндрического контейнера $R \approx 15$ мм составляет $\tau \approx 100$ с.

К моменту начала второй стадии процесса размораживания нагрев твердой фазы образца окончен и температурный градиент с ее стороны значительно меньше, чем со стороны жидкой фазы. Общий вид условия на самом фронте плавления имеет вид

$$-\lambda_2 |grad t_2|_{\xi(\tau)} = Q_{пл} \rho_1 \xi'(\tau), \quad (4)$$

где $Q_{пл}$ — удельная теплота плавления; ρ_1 — плотность; $|grad t_2| = \partial t_2 / \partial x$ для плоского и $\partial t_2 / \partial r$ — для цилиндрического контейнеров.

Распределение температуры в жидкой фазе описывается уравнением с начальными и граничными условиями:

$$\frac{\partial_2 t_2}{\partial x} = 0; \quad t_2 \left(x = \frac{d}{2} \right) = T_2; \quad t_2 | x = \xi(\tau) | = T_{пл}, \quad (5a)$$

$$\frac{\partial_2 t_2^*}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial t_2^*}{\partial r} = 0; \quad t_2^*(r=R) = T_2; \quad t_2^* | r = \xi(\tau) | = T_{пл}. \quad (5б)$$

Из решения уравнения (5) находим выражение для $|\text{grad } t_2| \xi(\tau)$. После подстановки его в (4) и решения полученного дифференциального уравнения для $\xi(\tau)$ при начальных условиях $\xi(0) = d/2$; $\xi^*(0) = R$ получим выражения, описывающие динамику продвижения фронта плавления в глубь образца:

$$\xi(\tau) = \frac{d}{2} - \sqrt{2\lambda_2 \frac{T_2 - T_{\text{пл}}}{Q_{\text{пл}} \rho_1}}, \quad (6a)$$

$$\frac{\xi^{*2}(\tau)}{R^2} \left[1 + 2 \ln \frac{R}{\xi^*(\tau)} \right] - 1 = -4\lambda_2 \frac{T_2 - T_{\text{пл}}}{R^2 Q_{\text{пл}} \rho_1}. \quad (6b)$$

Длительность процесса плавления составляет:

$$\tau_{\text{пл}} = \frac{d^2 Q_{\text{пл}} \rho_2}{8\lambda_2 (T_2 - T_{\text{пл}})}, \quad (7a)$$

$$\tau_{\text{пл}}^* = \frac{R^2 Q_{\text{пл}} \rho_2}{4\lambda_2 (T_2 - T_{\text{пл}})}. \quad (7b)$$

Из формул видно, что процесс плавления в цилиндрическом контейнере идет в $\sqrt{2}$ раза быстрее. Оценка времени плавления для плоского контейнера с $d=10$ мм и цилиндрического с $R=15$ мм дает величина соответственно 150 с и 700 с.

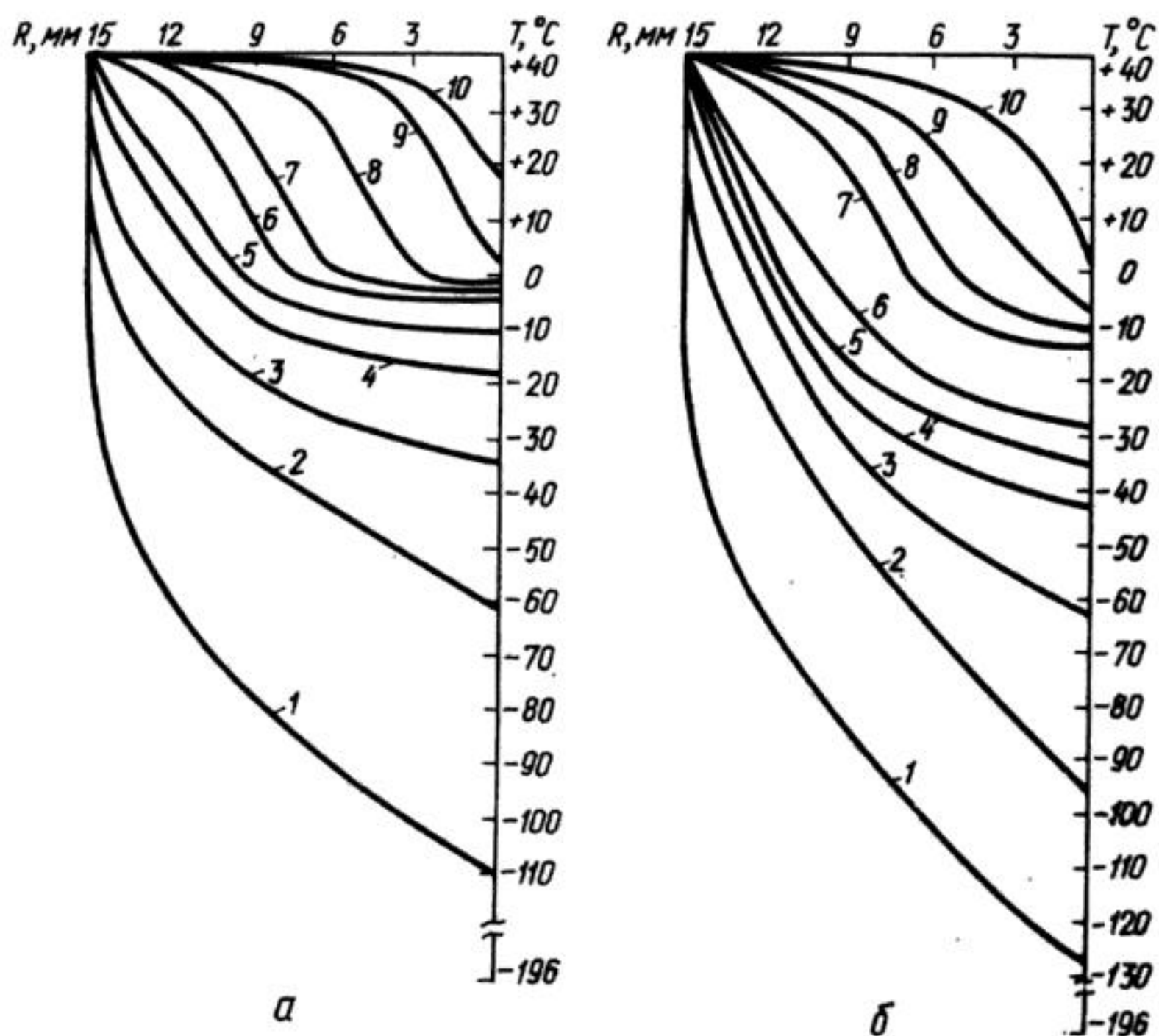


Рис. 2. Распределение температуры в сечении цилиндрического контейнера для различных моментов времени:

а — эритроциты: 1 — 20; 2 — 40; 3 — 60; 4 — 80; 5 — 100 с; 6 — 360; 7 — 400; 8 — 460; 9 — 500; 10 — 600 с; б — эритроциты с ПЭО-1500 (20%-ной конечной концентрацией); 1 — 20; 2 — 40; 3 — 60; 4 — 80; 5 — 100; 6 — 260; 7 — 360; 8 — 400; 9 — 440; 10 — 480.

Проверка предлагаемой методики расчета состояла в сопоставлении теоретического и экспериментального распределения температурного поля и продвижения фронта плавления. На рис. 2, а, б представ-

лено распределение температуры в осевом сечении цилиндра, построенное по показаниям 5 термопар, равномерно расположенных по радиусу. Сопоставительный анализ показывает, что теплофизические свойства объекта оказывают существенное влияние на характер распределения тепла. Разогрев образца в центре контейнера описывается формулой (3б), которая удовлетворительно согласуется с экспериментальными данными (значение T при $R=0$). Динамика продвижения фронта плавления $\xi(\tau)$ — расчетная формула (6б), а также длительность процесса плавления — (7б) — находятся в хорошем согласии

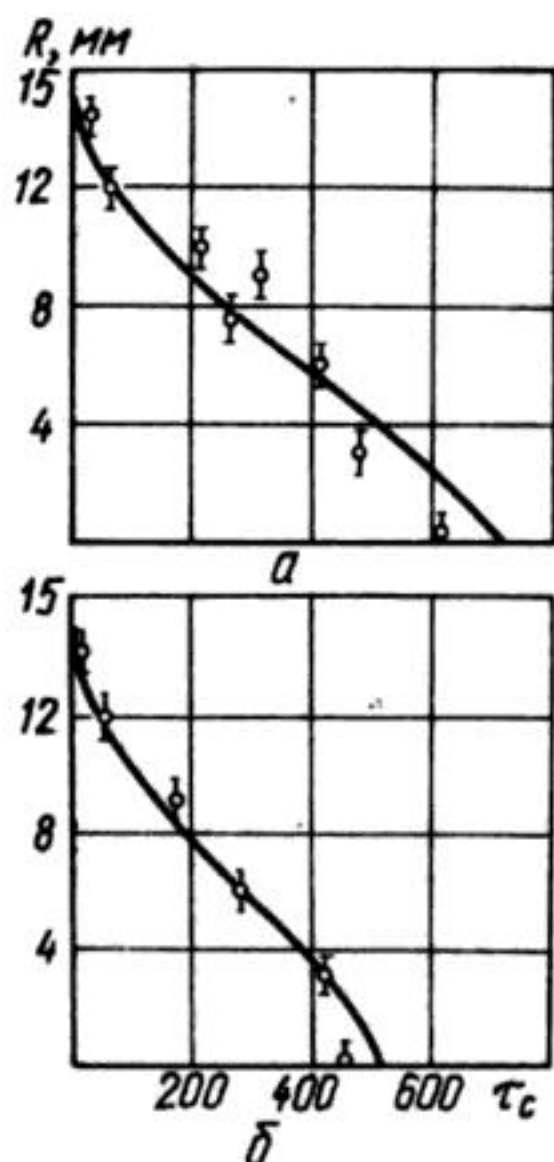


Рис. 3. Временная зависимость продвижения фронта плавления в цилиндрическом контейнере с $R=15$ мм. Кривая получена по расчетным соотношениям формулы (6а):

а — эритроциты; б — эритроциты ПЭО-1500 (20%-ной конечной концентрации).

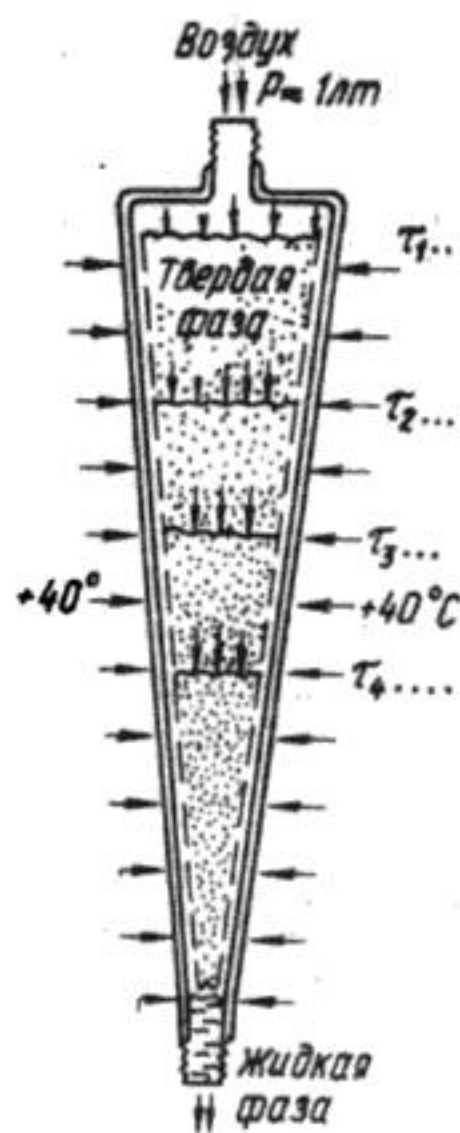


Рис. 4. Устройство контейнера, предусматривающее удаление жидкой фазы в процессе размораживания.

с экспериментальными зависимостями (см. рис. 3, а, б) и могут быть использованы для приближенных расчетов. Рассмотрение физических особенностей процесса размораживания показывает, что данный метод может быть усовершенствован в нескольких направлениях. Поскольку на первой стадии процесса нагрева термическое сопротивление тела мало по сравнению с тепловым сопротивлением теплообмену на поверхности (критерий $Bi < 1$), то интенсификацию теплопередачи можно осуществить увеличением коэффициента теплоотдачи (α) наружной и внутренней поверхности контейнера.

На второй стадии процесса, при средней интенсивности ($Bi \approx 1$), когда внутреннее термическое сопротивление и сопротивление на поверхности одного порядка, увеличение коэффициента теплопередачи возможно за счет увеличения любого из коэффициентов (α , λ). Увеличения α можно достичь изменением формы и размеров контейнера, температуры и физических параметров жидкости, оребрением стенок контейнера, изменением режима движения жидкости — вибрацией, покачиванием контейнера. Поскольку величина λ определяется физическими свойствами биологического объекта, изменение ее может быть

достигнуто лишь искусственным путем, например введением ячеистого наполнителя внутрь контейнера, выполненного из материала с большим λ и имеющего хороший тепловой контакт с боковой поверхностью контейнера. Все перечисленные выше приемы, как показывают эксперименты, более эффективны на второй стадии процесса размораживания.

Приведенные на рис. 2 кривые наглядно иллюстрируют основной недостаток данного метода, а именно возникновение жидкой фазы вблизи стенок контейнера при больших температурных градиентах по его объему. Поэтому формула (7) практически определяет длительность процесса размораживания в целом. Использование двухэтапного способа размораживания (нагрев на первом этапе осуществляют в теплоносителе с $T = -70^\circ\text{C}$, на втором — $+40^\circ\text{C}$) устраняет указанные выше недостатки, однако существенных изменений в увеличение скорости нагрева не вносит [8].

Нетрудно видеть, что температурный градиент на самом фронте плавления в ходе процесса размораживания уменьшается. Если каким-либо способом [3], или, например, как предлагают авторы (см. рис. 4), удалять жидкую фазу, то скорость нагрева резко возрастает. Так, в случае плоского контейнера выражение для $|\text{grad } t_2|_{\xi(\tau)}$ будет следующим:

$$\left. \frac{\partial t_2}{\partial x} \right|_{\xi(\tau)} = \frac{T_2 - T_{\text{пл}}}{\delta}, \quad (8)$$

где δ — толщина оставшегося пограничного слоя жидкости. Подставляя (8) в (4), получим дифференциальное уравнение для $\xi(\tau)$, из решения которого находим оценку времени полного плавления образца:

$$\tau_{\text{пл}} = \frac{dQ_{\text{пл}}\rho_2\delta}{2\lambda_2(T_2 - T_{\text{пл}})}. \quad (9)$$

Сравнивая с (7а), видим, что выигрыш во времени от удаления жидкой фазы в контейнере с $d = 10$ мм при $\delta = 1$ мм составляет 2,5 раза ($\tau_{\text{пл}} = 60$ с). Интересно установить предельную скорость продвижения фронта плавления, которая имеет место в случае полного удаления жидкой фазы ($\delta = 0$). В этом случае перепад температур от T_1 до $T_{\text{пл}}$ будет происходить непосредственно в стенке контейнера толщиной d_k , и время полного оттаивания сократится до величины, определяемой формулой

$$\tau_{\text{пл}} = \frac{dQ_{\text{пл}}\rho_2 d_k}{2\lambda_k(T_2 - T_{\text{пл}})}. \quad (10)$$

В случае плоского алюминиевого контейнера с $\lambda_k \approx 200$ Вт/м·К и $d_k = 1$ мм имеем $\tau_{\text{пл}} \approx 0,3$ с. Предельная скорость продвижения фронта плавления не зависит от формы контейнера и для данного вида теплоподвода имеет величину

$$\frac{d\xi(\tau)}{d\tau} = \frac{\lambda_k(T_2 - T_{\text{пл}})}{Q_{\text{пл}}\rho_1 d_k} \approx 27 \frac{\text{мм}}{\text{с}}. \quad (11)$$

Размораживание при граничных условиях 2-го рода. При заданных условиях нагрева прогрев твердой фазы образца происходит при незначительных температурных градиентах, определяемых скоростью нагрева. Краевая задача ставится следующим образом:

$$\frac{\partial t_1}{\partial \tau} = a_1^2 \frac{\partial^2 t_1}{\partial x^2}; \quad t_1(x, 0) = T_1; \quad -\lambda_1 \left. \frac{\partial t_1}{\partial x} \right|_{x=d} = q = \text{const}. \quad (12)$$

Решение ее имеет вид

$$t_1 = T_1 + \frac{2a_1^2 \tau}{d} \cdot \frac{q}{\lambda_1} + \frac{q}{\lambda_1 d} \left(x - \frac{d}{2} \right)^2 + \sum_{n=1}^{\infty} \alpha_n \cdot e^{-\frac{\pi^2 n^2 a_1^2}{d^2} \tau} \times \\ \times \cos \frac{n\pi x}{d}, \quad (13)$$

где $\alpha_n = (-2q/\lambda_1 d^2) \int_0^d \left(x - \frac{d}{2} \right)^2 \cos \frac{n\pi x}{d} dx$.

Из формулы (13) видно, что, как и для формулы (2), время выравнивания температуры в образце определится показателем экспоненты в последнем слагаемом и может быть оценено по формуле $\tau^* = 3d^2/\pi^2 a_1^2 \approx 25$ с. При $\tau \geq \tau^*$ температура в среднем сечении контейнера изменяется по закону

$$t_1 = T_1 + \frac{2a_1^2 q}{\lambda_1 d} \tau. \quad (14)$$

Отсюда время достижения $T_{пл}$ оценивается по формуле

$$\tau_{пл} \approx \frac{\lambda_1 d (T_{пл} - T_1)}{2a_1^2 q}. \quad (15)$$

Как видно из (15), скорость нагрева образца обратно пропорциональна вводимой тепловой мощности $P = qS_h$. При величинах $q \sim 3 \cdot 10^4 \text{ Вт/м}^2$ скорость нагрева образца в контейнере прямоугольной формы с $d = 10$ мм составляет $V_n \approx 100^\circ\text{С/мин}$. Режим нагрева в цилиндрическом контейнере не отличается от плоского, и выбор геометрии определяется технологическими соображениями. Распределение температуры в жидкой фазе находим из решения уравнения

$$\frac{\partial^2 t_2}{\partial x^2} = 0; \quad \lambda_2 \frac{\partial t_2}{\partial x} \Big|_{x=\frac{d}{2}} = q = \text{const}; \quad t_2[x = \xi(\tau)] = T_{пл}. \quad (16)$$

Температура жидкой фазы у стенок контейнера $t_2(x = \frac{d}{2})$ возрастает со временем по закону

$$t_2 = T_{пл} + q^2 \tau / \lambda_2 Q_{пл} \rho_1. \quad (17)$$

Во избежание перегрева объекта ($T_2 = +40^\circ\text{С}$) необходимо ввести условие ограничения величины теплового потока, которое имеет вид

$$q_{\min} \leq \frac{2\lambda_1 (T_2 - T_{пл})}{d}. \quad (18)$$

Как видно из формулы (18), чем меньше толщина объекта и больше коэффициент теплопроводности, тем бóльшая величина тепловой мощности может быть подведена к объекту. Отсюда следует, что если осуществлять регулировку теплового потока, поддерживая максимально допустимый градиент температуры на самом фронте плавления, то можно добиться постоянной скорости продвижения фронта плавления.

Время полного размораживания в случае изменения (q) по линейному закону $q = q_0 - \frac{q_0 - q_{\min}}{\tau_p} \tau$ составляет

$$\tau_{пл} = \frac{Q_{пл} \rho_1 d^2}{2\lambda_2 (T_2 - T_{пл}) (1 + q_0/q_{\min})}. \quad (19)$$

Из формулы видно, что если выбрать соотношение между исходным

тепловым потоком (q_0) и конечным ($q_{\min}$) порядка 3, то длительность процесса нагрева при граничных условиях 1-го и 2-го рода сравнима.

Проведем оценку величин для плоского алюминиевого контейнера с $S_k = 10^{-2} \text{ м}^2$ и $d = 10$ мм. Если выбрать начальный тепловой поток $q_0 = 3q_{\min} = 2,5 \cdot 10^4 \text{ Вт/м}^2$, то требуемая тепловая мощность составит вполне приемлемую величину $P = 250 \text{ Вт}$. При этом $\tau_{\text{пл}} = 100 \text{ с}$. Таким образом, размораживание с использованием ВЧ-нагрева позволяет, не уменьшая скорости, управлять процессом нагрева размораживаемого биообъекта при значительно меньших температурных градиентах по его объему.

Выводы. Модельные расчеты, проведенные с использованием усредненных теплофизических характеристик [8], дают удовлетворительное согласование с экспериментальными данными, что подтверждает их пригодность для инженерно-технических расчетов. Кроме того, как мы видим, хорошо известный и широко используемый метод нагрева может быть усовершенствован в направлении улучшения его основных параметров. Большие объемы биообъектов (> 250 мл) предпочтительно консервировать в цилиндрических контейнерах, размораживание которых осуществляется быстрее, чем плоских. Для размораживания объемов более 500 мл целесообразна разработка аппаратуры, позволяющей осуществлять процесс размораживания с удалением жидкой фазы. Применение ТВЧ для нагрева стенок контейнеров дает возможность реализовать программный нагрев биообъектов при высокой стерильности процесса и скоростях нагрева.

1. Бражников А. М., Карпичев В. А. Аналитическое описание процесса переноса тепла в биологических системах. — Криобиология и криомедицина, 1977, № 3, с. 21—26.
2. Веркин Б. Н., Житомирский И. С., Подольский А. Г., Нечипоренко И. Н. Математическая модель процесса замораживания раствора и обезвоживания эритроцитов при консервации крови. — В кн.: Криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 23—26.
3. Воротилин А. М. Метод быстрого отогрева больших объемов замороженной взвеси клеток. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 136—138.
4. Житомирский И. С., Подольский А. Г., Кагна А. А. Метод расчета температурного поля при замораживании биопродукта в тонком плоском контейнере. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 26—30.
5. Лыков А. В. Теория теплопроводности. — М.: Высш. школа, 1967. — 600 с.
6. Тимошенко Ю. П. О возможности осуществления программного размораживания. Криобиология и криомедицина, 1977, № 3, с. 70—73.
7. Тимошенко Ю. П., Гаврилова И. И. Термодинамические свойства крови при ее размораживании. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 47—49.
8. Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Тимченко В. Г. Исследование процесса размораживания клеточных суспензий. — Криобиология и криомедицина, 1978, № 4, с. 64—66.
9. Чижов Г. Б. Приближенное вычисление продолжительности замораживания тел правильной формы. — Холодил. техника, 1977, № 1, с. 42—46.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
5.04.78

УДК 57.043.616.21—006—08:615.832.9

А. И. Цыганов, И. И. Венделовский

О ПРИМЕНЕНИИ КРИОХИРУРГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЛОР-ОРГАНОВ

Криогенный метод лечения широко применяется в медицине. Разрушающее влияние глубокого замораживания на ткани послужило основанием для использования криохирургии в ЛОР-онкологии [1—5, 7, 10, 13—15]. Однако взгляды различных авторов на показания к при-

менению криохирургии у онкологических больных противоречивы. Одни полагают, что криогенные методы вмешательства показаны лишь как паллиативное средство для лечения иноперабельных больных со злокачественными опухолями головы и шеи [11, 13, 16], другие считают криодеструкцию опухолей самостоятельным методом, который в некоторых случаях может с успехом конкурировать с оперативным вмешательством и лучевой терапией [8, 9, 17, 18].

Преимущество криогенного метода лечения перед другими заключается в малой кровопотере и обезболивающем эффекте в результате гибели окончаний чувствительных нервов. Сейчас уже никто не сомневается в том, что криохирургия — перспективный, но недостаточно изученный метод лечения онкологических заболеваний.

В Киевском научно-исследовательском институте отоларингологии МЗ УССР изучалось действие сверхнизких температур на разные ткани человека. В эксперименте на животных изучено влияние глубокого охлаждения на ткани гортани, небной миндалины, стенки крупных сосудов, экспериментальную опухоль Герена и т. д.

Морфологические исследования тканей гортани, подвергшихся криовоздействию, показали, что дистрофические изменения наступают лишь в замороженных участках. Окружающие ткани, хотя и сильно охлажденные, но не попавшие в зону «ледяного шарика», повреждаются очень мало. Незначительные изменения в них связаны с нарушением кровообращения и не сопровождаются гибелью клеток. В результате криовоздействия значительно страдают мышечная и хрящевая ткани и лишь затем — эпителиальная и соединительная.

Сведения в литературе о кровотечении как осложнении криовмешательства немногочисленны. Так, отмечая гемостатический эффект криотерапии при носовых кровотечениях, указывают на возможный некроз стенок крупных сосудов с последующим кровотечением [12]. Сообщают о сильном кровотечении из язычной артерии через неделю после криовоздействия на раковую опухоль корня языка [10]. Большинство авторов считает, что нарушение стенок крупных сосудов вследствие криовоздействия маловероятно [5, 6, 15, 16].

Проведенные нами экспериментальные исследования на кроликах показали, что разные магистральные кровеносные сосуды реагируют на замораживание по-разному. Так, после криовоздействия на бедренную артерию (сосуд мышечного типа) ни в одном случае не наступило разрушения ее стенки, тогда как замораживание сонной артерии (относящейся по строению к сосудам смешанного типа) сопровождалось дистрофическими изменениями в ее стенке вплоть до некроза. Так как в ЛОР-практике значительная часть криовмешательств по поводу новообразований различных локализаций производится в непосредственной близости от общей сонной артерии и ее ветвей, хирург должен действовать очень осторожно, чтобы в зону «ледяного шарика» не попали крупные сосуды.

Проведенные экспериментальные исследования позволили нам установить оптимальные условия деструкции тканей методом криовоздействия и рекомендовать его применение для разрушения различных злокачественных и доброкачественных новообразований ЛОР-органов. Начиная с 1972 г. в Киевском научно-исследовательском институте отоларингологии МЗ УССР криолечению подвергнут 161 больной со злокачественными опухолями ЛОР-органов. Проведенные наблюдения позволяют дать некоторые рекомендации для практической медицины.

Криовоздействия на опухоли производились либо с помощью стационарного устройства для криогенной хирургии, сконструированного А. И. Цыгановым совместно с инженерной группой, либо портативных криозондов «Крио-2», «Крио-3» и «Иней» несколько меньшей мощности, но удобных и простых в пользовании. Началось также исполь-

зование аппаратуры, разработанной и изготовленной в Институте физики АН УССР.

В зависимости от величины и конфигурации опухоли применялись сменные наконечники криозонда. Их размеры варьировали от 0,5 мм в диаметре до величины пятикопеечной монеты. Криовоздействия на новообразования в области ушной раковины, крыла носа, трахеостомы, фарингостомы и т. д. не представляют трудностей, поскольку легко доступны для подведения хладагента к очагу поражения. Замораживая же опухоли в области миндалин, боковой стенки глотки, твердого и мягкого неба, корня языка и носоглотки мы применили плотную резиновую трубку соответствующего диаметра для теплоизоляции наконечника криозонда от окружающих тканей. Пользуясь защитной трубкой, можно прицельно произвести криовмешательство прямым зондом даже в носоглотке, приподняв предварительно элеватором мягкое небо и введя под него криозонд. Криовоздействие на новообразования в области гортаноглотки и гортани производились под наркозом при прямой ларингоскопии.

В тех случаях, где криовоздействие производилось без анестезии, больные, как правило, на протяжении 5—8 с испытывали легкую болезненность. Сразу же в точке соприкосновения наконечника криозонда с тканями можно было заметить образование плотного белого слоя, который довольно быстро принимал округлую форму, и образовывался так называемый ледяной шарик. Быстрота образования и величина «ледяного шарика» зависела от мощности криозонда.

Результаты криохирургического лечения
злокачественных новообразований ЛОР-органов

Локализация опухоли	Общее количество наблюдений	Непосредственные результаты		Отдаленные результаты (рецидива опухоли нет)		
		Опухоль не определяется	Уменьшилась в размерах	Через 1 год	Через 2 года	Более 2 лет
Рак миндалин	23	17	6	11	10	8
Рак наружного уха	7	6	1	5	4	3
Рак среднего уха	2	—	2	—	—	—
Рак наружного носа	5	4	1	4	3	3
Рак придаточных полостей носа	14	8	6	5	2	—
Рак губы	6	5	1	4	4	3
Рецидив раковой опухоли в области гортани и глотки	103	77	26	53	46	39
Метастазы раковой опухоли в лимфоузлы шеи	1	—	1	—	—	—
Всего:	161 (100 %)	117 (70 %)	44 (27,5 %)	82 (50,9 %)	69 (42,9 %)	56 (35 %)

Наконечник криозонда плотно прижимался или (если это было возможно) вдавливался в толщу опухоли. После 3—5 мин экспозиции криовоздействие прекращалось и опухоль подвергалась естественному медленному оттаиванию. В тех случаях, где технические возможности криозонда не позволяли одномоментно заморозить всю опухоль, криовоздействие производилось в двух, трех и более точках. При обширных опухолях одного сеанса криовоздействия было недостаточно, и мы его повторяли неоднократно после отторжения некротизированных тканей (через 2—3 недели).

В таблице приведены данные о ближайших и отдаленных результатах криохирургического лечения больных с различными локализациями злокачественных новообразований ЛОР-органов.

Характеризуя наблюдаемую группу больных, необходимо указать, что многим из них криогенное вмешательство было произведено там, где все другие способы лечения (хирургическое вмешательство, лучевая и химиотерапия) были невозможны. Это был очень тяжелый контингент больных с обширными рецидивами раковой опухоли небных миндалин и боковой стенки глотки, нередко распространяющимися на корень языка, мягкое и твердое небо, обширные рецидивы раковой опухоли среднего уха, рецидивы в области фарингостомы, верхней челюсти и т. д.

Как видно из приведенных в таблице данных, опухоль после криохирургического вмешательства не определялась у 70% больных и у 27,5% констатировано ее уменьшение. Это имело существенное значение в тех случаях, где новообразование располагалось в области боковой стенки глотки, мягкого неба, трахеостомы и трахеи, поскольку давало возможность ряду больных улучшить акт глотания и дыхания. Кроме того, у некоторых больных этой группы замораживание хотя и не вызвало более или менее выраженного воздействия на опухоль, тем не менее отмечено значительное улучшение общего состояния. У двух больных прекратились очень сильные головные боли, возникшие, очевидно, в результате сдавливания опухолью сосудисто-нервного пучка шеи.

В некоторых случаях разрушение опухоли с помощью глубокого замораживания является методом выбора. Ниже мы приводим три наблюдения, где положение больных было фактически безнадежным и лишь с помощью криохирургического метода удалось добиться клинического выздоровления.

Больная И., 29 лет, 12. XII. 74 г. клинически и гистологически установлен рак гортани срединной локализации (T_2N_0). 15. VIII. 75 г. в связи с рецидивом опухоли после облучения произведена половинная вертикальная резекция гортани по Глюку, но уже в октябре того же года опухоль снова рецидивировала. Поэтому 29. X. 75 г. выполнена тотальная ларингэктомия с формированием фарингостомы. Вскоре в области фарингостомы вновь возник рецидив, который 3. XII. 75 г. удален хирургическим способом. Однако спустя 2 недели по краю фарингостомы справа определялась рецидивная опухоль, прилегающая к стенке общей сонной артерии. Опухоль как бы окружала ствол артерии. О хирургическом удалении новообразования не могло быть и речи.

Решено было произвести замораживание опухоли. Проведено семь 10-минутных криоаппликаций с интервалами в 3—4 дня. В середине января 1976 г. опухоль перестала определяться, и больная по ее просьбе была выписана с фарингостомой на короткое время домой. 2. III. 76 г. она снова поступила в стационар, где 2. IV. 76 г. фарингостома была ушита с помощью филатовского стебля. В настоящее время клинически здорова, наблюдается в КНИИО.

Больной П., 37 лет, 3. III. 75 г. клинически и гистологически установлен диагноз рак гортани вестибулярной локализации с метастазом в лимфоузлы шеи справа (T_3N_1).

25. III. 75 г. произведена операция Крайля справа, а первичный очаг в гортани облучен на аппарате ГУТ-Со-400 (7000 рад). В мае 1976 г. возник ограниченный рецидив опухоли на гортанной поверхности надгортанника, который был разрушен электроакустикой. Однако в августе того же года в связи с повторным ростом опухоли произведена резекция надгортанника вместе с опухолью. В апреле 1977 г. возник рецидив рака на боковой стенке гортаноглотки справа, который тесно прилегал к сосудистому пучку. Это обстоятельство и обширность опухоли не давали возможности удалить ее хирургическим путем. Решено было произвести криодеструкцию новообразования через рот.

Восемь 10-минутных криоаппликаций значительно уменьшили опухоль, и больной по его просьбе был выписан домой.

19.XII.77 г. при очередном приезде на осмотр в консультативную поликлинику КНИИО опухоль в гортаноглотке не обнаружена, состояние больного удовлетворительное.

Больной Д., 43 года. Поступил в стационар КНИИО 28.III.77 г. по поводу рецидива рака гортани после резекции надгортанника и метастатического лимфоузла на шее справа. 6.IV.77 г. произведена ларингэктомия с одновременной операцией Крайля. Сформирована фарингостома. Спустя 2 мес. после операции появился рецидив опухоли у правого края фарингостомы, который удален электроножом. Однако спустя месяц снова отмечен рост опухоли у края фарингостомы, причем новообразование тесно прилегало к сосудисто-нервному пучку шеи. Решено было разрушить опухоль криогенным методом. После девяти 5-минутных криоаппликаций жидким азотом с интервалами в 3—5 дней опухоль частично некротизировалась и вскоре перестала определяться. Раневая поверхность покрылась эпителием. 28.XII.77 г. фарингостома ушита филатовским стеблем.

Приведенные наблюдения интересны не только тем, что получено излечение криохирургическим методом у фактически безнадежных больных, но особенно тем, что опухоль как будто бы полностью не вымораживалась, однако наступили рассасывание ее остатков и ликвидация процесса. Это позволяет высказать гипотезу, что криодеструкция опухоли, возможно, вызывает какую-то иммунологическую перестройку в организме, способствующую ликвидации опухоли. Для подтверждения указанной гипотезы необходимы специальные иммунологические исследования у таких больных.

У 7 инкурабельных больных с метастазами раковой опухоли в лимфоузлы шеи, страдающих очень сильными болями, был применен паллиативный курс криотерапии. При этом у одного больного боли исчезли, а у 3 — значительно уменьшились.

Что касается отдаленных результатов, то, как видно из таблицы, рецидива опухоли через 1 год не наблюдалось почти у половины (49,1%) больных, через 2 года — 41,3% и более 2 лет — у 33,1% больных.

Проведенные наблюдения свидетельствуют о том, что криохирургический метод лечения весьма эффективен и уже сегодня должен широко применяться для лечения больных со злокачественными опухолями. При ограниченных злокачественных опухолях (рак ушной раковины, наружного носа, области губы, кожи лица и т. д.) он может быть применен как метод выбора. Что же касается иноперабельных и инкурабельных больных с рецидивом опухоли после хирургического вмешательства, лучевой и химиотерапии, то криохирургические вмешательства также оправданы, так как позволяют у части больных уменьшить размеры опухоли, облегчить акт глотания и дыхание, ослабить головные боли, возникшие в результате сдавливания опухолью сосудисто-нервных пучков шеи.

1. Луценко М. А., Венделовский И. И. Изменения в стенках крупных сосудов после криовоздействия (экспериментальное исследование). — Журн. ушных, носовых и горловых болезней, 1975, № 3, с. 34—39.
2. Потапов И. И., Тарлычева Л. С., Рудня П. Г., Антонов В. Ф. Применение локального замораживания при лечении доброкачественных и злокачественных новообразований ЛОР-органов. — Вестн. отоларингологии, 1975, № 5, с. 8—14.
3. Цыганов А. И., Луценко М. А. Клинико-морфологические данные к вопросу о применении криогенного метода в ЛОР-онкологии. — В кн.: Тр. V конф. отоларингологов ЭССР. Тарту, 1973, с. 163—164.
4. Черешкин Д. Г. Криохирургия в отоларингологии. — В кн.: Криохирургия. М.: Медицина, 1974, с. 223—248.
5. Baerthold W., Steinert R. Histologische Untersuchungen über die Wirkungeng

- umschriebener Kryochirurgie auf den Wachseinend. — Z. Laryng. Rhinol., 1972, 51, N 7, S. 480—488.
6. Barton R. Cryosurgery in nose and throat tumors. — JAMA, 1968, 7, N. 204, p. 570—573.
 7. Candler J. Cryosurgery for recurrent carcinomas of the oral cavity. — Arch. Otolaryngol., 1972, 97, N 4, p. 319—321.
 8. Gage A. Cryotherapy for oral cancer. JAMA, 1968, 7, N 20, p. 565—569.
 9. Guerrier Y., Dejean Y. La papillomatose laryngee de l'enfant et son traitement cryotherapique par l'azote liquide. — Ann. Otolaryngol., 1966, N 83, p. 202—211.
 10. Ganz H. Grundlagen und Anwendung der Kriochirurgischen Technik, mit besonderer Berücksichtigung des HNO—Faches. — Hals—Nas. und Ohrenartz (Berlin), 1972, N 20, p. 191—197.
 11. Hanckel R., O'Connor R. Cryosurgery in otolaryngology. — Shh. Med. J., 1967, N 60/10, p. 1068—1070.
 12. Hill C. Cryosurgical problems in otolaryngology. — J. Cryosurg., 1969, N 2, p. 121—122.
 13. Leden H. Crioхирургия в дер Оторхиноларынгологие. — Arch. Klin. Exp. Ohr. Nas., 1966, 2, N 187, p. 695—699.
 14. Leden H., Rand R. Cryosurgery of the mouth, nose and throat. — Trans. Amer. Acad. Ophtalmoc. and Otolaryngol., 1966, N 70/6, p. 890—898.
 15. Lewis J., Cahan W. Cryosurgical management of glomus jugulare tumors. — Ryn-goscope, 1967, 7, N 77, p. 912—915.
 16. Miller D. Three years experience with cryosurgery in head and neck tumors. — Ann. Otol.-Rhinol. and Laryngol., 1969, 78, N 4, p. 786—791.
 17. Nawara J. Krioterapia w leczeniu brodawczakow krtani. — Otolaryngol. pol., 1965, N 19, s. 723—734.
 18. Palva T., Meurmann O. Cold cautery treatment of laryngeal papillomatosis. — Acta otolaryngol., 1962, N 54, p. 376—382.

Киевский научно-исследовательский
институт отоларингологии МЗ УССР

Поступила в редколлегию
05.03.78

УДК 57.043:615

В. М. Чередниченко

О ФАКТОРАХ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ПРОЧНОСТЬ ФИКСАЦИИ ХРУСТАЛИКА КРИОЭКСТРАКТОРОМ

Известно, что разрывы капсулы хрусталика при интракапсулярном извлечении катаракты отрицательно сказываются на дальнейшем течении и исходе операции [1, 2, 5, 6]. В связи с этим важно изучить причины, приводящие к разрыву капсулы при криоэкстракции [8].

Нами в экспериментах на изолированных катарактально измененных хрусталиках человека изучалась зависимость прочности фиксации хрусталика криоэкстрактором от вида и стадии зрелости катаракты. Экстрагированный во время операции хрусталик осторожно отмораживался от криоэкстрактора и помещался на часовое стекло передним полюсом кверху. Затем хрусталик накрывался диском из плексиглаза, диаметр которого равнялся 50 мм. В центре диска имелось отверстие диаметром 5 мм, а по краям его — еще четыре отверстия диаметром 1 мм, через которые были пропущены шелковые нити, связанные с пружинным динамометром. Шкала измерений динамометра имела пределы от 0 до 600 г при цене деления 10 г. Через среднее отверстие в диске к хрусталику прикладывался криоэкстрактор и после того, как хрусталик прочно фиксировался к инструменту (через 5 с), диск фиксировался рукой, а пружина динамометра, связанная с диском нитями, натягивалась, пока хрусталик не отрывался от криоэкстрактора. Обычно это происходило в результате разрыва капсулы хрусталика и только иногда — вследствие разрушения ледяной спайки между криоэкстрактором и капсулой при сохранении целости последней. В каждом опыте фиксировались показания динамометра, при которых хрусталик отрывался от криоэкстрактора. Для примораживания хрусталиков применялись криоэкстракторы двух видов: охлажденный уг-

лекислотой (первоначальная температура равна -76°C) и полупроводниковый криоэкстрактор ТКК-1 (температура наконечника равна -22°C). С каждым из криоэкстракторов проведено по 100 опытов на экстрагированных катарактальных хрусталиках. В серии опытов с углекислотным криоэкстрактором 37 хрусталиков представляли зрелые, 36 — почти зрелые, 18 — незрелые и 7 — перезрелые катаракты. Два хрусталика были с осложненными катарактами, удаленными у молодых больных (31 и 37 лет). В опытах с полупроводниковым криоэкстрактором 31 хрусталик был со зрелой, 39 — с почти зрелой, 18 — незрелой, 7 — перезрелой старческой катарактой и 5 — с осложненной катарактой у лиц моложе 50 лет.

Проведенные опыты показали, что прочность фиксации хрусталика с разными видами катаракт была переменной. Как углекислотным, так и полупроводниковым криоэкстрактором прочнее всего фиксировались зрелые старческие катаракты. Сила фиксации зрелых катаракт углекислотным криоэкстрактором — от 60 до 600 г, в среднем — 202,9 г. Средняя величина прочности фиксации зрелых катаракт полупроводниковым криоэкстрактором равнялась 98,8 г, то есть в 2,5 раза меньше. Среднее значение прочности фиксации почти зрелых катаракт углекислотным криоэкстрактором равнялось 130,9 г (наименьшее — 30 г, наибольшее — 300 г) и полупроводниковым — 75,3 г. Менее прочно примораживались к криоэкстрактору незрелые катаракты. Они отрывались от углекислотного криоэкстрактора при усилии от 20 до 130 г (средняя величина нагрузки 69,4 г), а от полупроводникового криоэкстрактора — при усилии от 10 до 120 г (в среднем — 36,6 г). Как правило, отделение хрусталика с незрелой катарактой происходило вследствие разрыва капсулы хрусталика. Совсем небольшое усилие требовалось для отрыва от криоэкстрактора хрусталиков с перезрелыми старческими катарактами. Достаточно было натяжения динамометра от 10 до 50 г, чтобы тонкая капсула порвалась и вытекли жидкие хрусталиковые массы. Среднее усилие, при котором нарушалась связь хрусталика с углекислотным криоэкстрактором, равнялось 31,4 г, с полупроводниковым — 20 г. Так же легко нарушалась фиксация к криоэкстрактору осложненных катаракт. Средняя величина усилия для углекислотного экстрактора равнялась 20 г и для полупроводникового — 22 г.

Проведенные опыты показали зависимость прочности фиксации хрусталика криоэкстрактором от температуры охлаждения инструмента и от характера катаракты. Согласно физическим законам кристаллообразования [3, 4] фронт кристаллизации распространяется радикально от наконечника криоэкстрактора с равной скоростью во всех направлениях. Скорость распространения оледенения зависит от температуры охлаждения криоэкстрактора. При известных величинах степени охлаждения и длительности контакта криоэкстрактора с хрусталиком оледенение захватывает не только капсулу, но и лежащие под ней кортикальные слои, а при наличии плотного и большого ядра, например при зрелой старческой катаракте, образуется прочный ледяной мост, связывающий наконечник криоэкстрактора с хрусталиковым ядром. В этих случаях достигается максимальная прочность фиксации и разрыв капсулы хрусталика практически становится невозможным. Чем старше возраст больного с катарактой, тем больше величина ядра хрусталика и прочнее его фиксация к криоэкстрактору. Отсюда понятно, что при катарактах у молодых лиц, у которых ядро хрусталика еще небольшое, а между ядром и капсулой имеется довольно большой слой рыхлых хрусталиковых масс, прочной связи между ядром и зоной оледенения капсулы не образуется. Точкой приложения сил в этом случае оказывается капсула хрусталика, которая может легко порваться при экстракции. Установлено, что при фиксации

криоэкстрактором только капсулы последняя рвется при усилии всего в 7 г [7].

Следовательно, при извлечении катаракт способом криоэкстракции необходимо добиваться большой зоны оледенения капсулы хрусталика и субкапсулярных масс путем более сильного охлаждения криоэкстрактора или увеличения времени контакта инструмента с хрусталиком. Этим можно повысить прочность фиксации катаракты и предупредить разрыв капсулы хрусталика.

1. *Абрамов В. Г., Артамонов В. П.* Применение холода в офтальмологии. Ярославль: Верх.-Волж. кн. изд-во, 1973. — 151 с.
2. *Бирич Т. В., Короткий Н. Е.* Интракапсулярная экстракция катаракт криоэкстрактором. — В кн.: Материалы III съезда офтальмологов СССР. Волгоград, 1966, с. 188—189.
3. *Глики Н. В.* Кристаллизация и фазовые переходы. — Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1962. — 240 с.
4. *Казанец Л. И.* Актуальные вопросы криоэкстракции катаракты. — Офтальмол. журн., 1967, № 2, с. 115—118.
5. *Малаханова Н. А., Бартош Г. П.* Сравнительные результаты операции криоэкстракции катаракты с химотрипсином и без него. — В кн.: Материалы III съезда офтальмологов СССР. Волгоград, 1966, с. 190—191.
6. *Чередниченко В. М.* Интракапсулярная экстракция катаракты с помощью низких температур: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Днепропетровск, 1969. — 26 с.
7. *Jobbagyi P.* Lokate Cryotechnik und Verhütung von Kalt eschadigungen. — Klin. Monatsbl. Augenheilkd., 1966, 149, H. 4, S. 246—248.
8. *Moreau P. G., Haut G.* Cryoophthalmologie. — Paris: Masson, 1971. — 260 p.

Украинский институт
усовершенствования врачей МЗ УССР

Поступила в редколлегия
05.02.78

УДК 57.043

Г. Г. Шурда, Ю. А. Иткин

ОСВОБОЖДЕНИЕ УФ-ПОГЛОЩАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ И СОХРАННОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ И ОТТАИВАНИИ

В последнее время для консервации микроорганизмов широко используются низкие температуры. Одновременно возник ряд проблем, от решения которых зависит успех применения этого метода. К одной из таких проблем относится проблема поиска наиболее достоверных и объективных способов определения выживаемости и биологической полноценности деконсервированных бактерий.

Как правило, о количестве жизнеспособных бактерий судят по количеству колоний, выросших на питательном агаре, но для некоторых молочнокислых стрептококков этот метод не совсем пригоден, поскольку вследствие возможной фрагментации цепей стрептококка после воздействия различных факторов может возрасти количество колоний [5]. В предварительных исследованиях по определению количества жизнеспособных особей стрептококков после деконсервации также обнаружена тенденция к увеличению числа колоний, которые образовывали микроорганизмы. В мазках, приготовленных из суспензии бактерий после низкотемпературной консервации *S. cremoris*, наблюдалось возрастание отношения числа коротких цепочек к длинным по сравнению с их соотношением в суспензии бактерий до консервации. Вероятно, это и явилось причиной увеличения количества колоний.

В то же время известен факт, что при разрушении бактерий освобождаются УФ-поглощающие вещества, которые можно определить в окружающей бактерии среде. В этой связи в данной работе проводилось сравнительное изучение информативности различных методов,

используемых для определения жизнеспособности микроорганизмов параллельно с определением количества УФ-поглощающих веществ.

Методика исследования. Объектом исследования служили штаммы молочнокислых стрептококков *S. lactis* 806₁, *S. diacetylactis* 728₃, *S. cremoris* T18₁₅. Культуры бактерий выращивали на среде Банниковой [1] в течение 15 ч с нейтрализацией 10%-ным аммиаком. Культуры центрифугировали, биомассу отмывали от среды 0,15 М физиологическим раствором. Полученный концентрат смешивали с физиологическим раствором в соотношении 1 : 1 и распределяли по 1 мл в ампулы. Замораживание проводили в жидком азоте со скоростью 300—400°C в мин. Оттаивали в водяной бане при температуре 20°C.

О жизнеспособности судили по активности включения бактериями радиоактивных предшественников ³H-тимидина, ³H-уридина и ¹⁴C-аминокислот (белковый гидролизат хлореллы), используя метод Кеннела [2]. Освобождение УФ-поглощающих веществ определяли спектрофотометрически по приросту величины поглощения при 260 мкм (максимум поглощения нуклеиновых кислот и нуклеотидов). О функциональной активности бактерий судили по интенсивности кислотообразования и протеолиза белков молока. Активность кислотообразования определяли по времени достижения рН 5,5 при культивировании бактерий в 10%-ном восстановленном обезжиренном молоке. Для определения протеолитической активности использовали метод Халл [4], модифицированный Ситти с соавт. [3]. Выживаемость определяли путем посева бактерий на агар с гидролизированным молоком и подсчета числа выросших колоний.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты указывают на отсутствие статистически достоверных различий в протеолитической активности и количестве образующихся колоний после посева деконсервированной и не подвергавшейся консервации суспензии молочнокислых стрептококков. С помощью других тестов у некоторых штаммов стрептококков выявлены определенные изменения (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

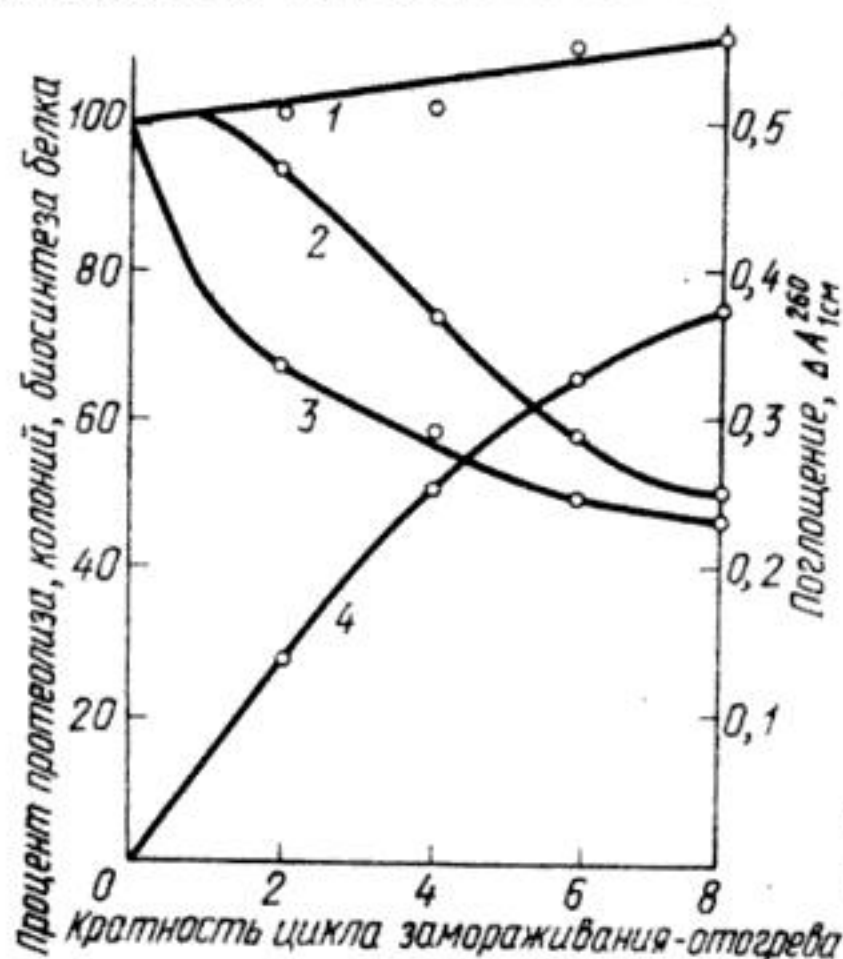
Влияние замораживания-оттаивания на освобождение УФ-поглощающих веществ и некоторые свойства молочнокислых стрептококков

Культура	УФ-погло- щение, A ₁ ^{260*} см	Активность кислотооб- разования, %	Протеолити- ческая актив- ность, %	Число колоний %
<i>S. lactis</i> 806 ₁	0,016	97,9±6,5	95,2±3,6	104,8±7,9
<i>S. diacetylactis</i> 728 ₃	0,061	97,2±2,2	103,4±0,8	93,8±5,7
<i>S. cremoris</i> T18 ₁₅	0,083	89,0±2,5	96,3±1,3	107,9±3,6

* Среднее арифметическое из 6 опытов.

Замораживание-оттаивание *S. lactis* сопровождалось лишь незначительным освобождением УФ-поглощающих веществ. В соответствии с этим не наблюдалось существенного изменения в интенсивности включения меченых предшественников синтеза ДНК, РНК и белка бактериями и в способности к образованию кислот (табл. 1, 2). Штамм *S. diacetylactis* занимал промежуточное положение по чувствительности к криовоздействию среди изученных микроорганизмов. Наиболее криочувствительным среди изученных штаммов молочнокислых стрептококков оказался *S. cremoris*. Концентрат *S. cremoris* после деконсервации освобождал наибольшее количество УФ-поглощающих веществ, отличался более значительным снижением включения метки бактериями и статистически достоверным снижением активности кислотообразования (табл. 1, 2).

Многократное замораживание *S. cremoris* вызвало более выраженные повреждения (рис. 1). С увеличением числа замораживаний-оттаиваний возрастало количество освобождающихся клеток УФ-поглощающих веществ, увеличивался процент гибели бактерий и снижалась интенсивность включения ^{14}C -аминокислот бактериями. Од-



Влияние многократного замораживания-оттаивания на сохранность:

1 — протеолитическая активность; 2 — выживаемость (количество колоний); 3 — биосинтез белка; 4 — освобождение УФ-поглощающих веществ (ΔA_{260} см).

новременно наблюдалась тенденция к возрастанию протеолитической активности, что может быть связано с освобождением протеаз в результате деструкции бактерий.

Электронно-микроскопическое исследование препаратов молочно-кислых бактерий, подвергавшихся замораживанию, показало наличие разрывов клеточных стенок, причем более выраженные деструктивные изменения обнаружены в клетках *S. cremoris*, *S. diacetylactis*.

Таким образом, для суждения о повреждении молочнокислых стрептококков наиболее информативными являлись методы определения интенсивности включения бактериями радиоактивных предшественников биосинтеза нуклеиновых кислот и белка, освобождения УФ-поглощающих веществ и электронно-микроскопическое исследование.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы.

Тест на освобождение УФ-поглощающих веществ отражает степень повреждения молочнокислых стрептококков при криовоздействии. *S. cremoris* является наиболее чувствительным из исследованных штаммов стрептококков к замораживанию-оттаиванию.

Т а б л и ц а 2

Влияние замораживания-оттаивания на интенсивность включения меченых предшественников в ДНК, РНК и в белок молочнокислых стрептококков

Культура	^3H -тимидин	^3H -уридин	^{14}C -аминокислоты
<i>S. lactis</i> 806 ₁	97,6±9,8	95,3±3,2	99,8±3,9
<i>S. diacetylactis</i> 728 ₃	77,8±3,6	87,6±3,8	84,0±3,4
<i>S. cremoris</i> T18 ₁₅	70,6±2,2	83,9±2,3	75,9±3,1

1. Банникова Л., Пятницкая И., Казанцева Л. Сухие закваски на основе бактериального концентрата. — Молоч. пром-сть, 1964, № 11, с. 39—41.
2. Кеннед Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных ДНК, РНК и белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1970, с. 138—144.
3. Citti I., Sandine W., Elliker P. Some observations on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. — J. Dairy Sci., 1963, 46, p. 337—338.
4. Hull M. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. — J. Dairy Sci., 1947, 430, p. 881—884.
5. Pettersson H. Preservation of mixed species lactic starter concentrates by freezing and lyophilization methods. — Milchwissenschaft, 1975, 30, N 9, p. 539—548.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
30.03.78

СОДЕРЖАНИЕ

Бездетко П. А. К вопросу о выборе оптимальных температурных параметров для криотерапии в офтальмологии	3
Бугров А. Д., Осташко Ф. И. Роль некоторых криопротекторов при размораживании спермиев	5
Воскобойникова Т. Н., Микулинский Ю. Е. Влияние низкотемпературной консервации на тканевые лимфоциты мышей	9
Губина Н. Ф. Влияние охлаждения на захват норадреналина и адреналина некоторыми органами	12
Дроздова О. А., Гольцев А. Н., Останкова Л. В. Характер восстановления кровотока у летально облученных реципиентов после трансплантации трупного костного мозга	13
Зинченко А. В., Моисеев В. А. Изучение связывания воды некоторыми биоматериалами	16
Капрельянец А. С., Анисимов Ю. И., Курасова Л. Ю. Алгоритмы автоматического морфометрического анализа ультраструктуры клетки	20
Киндзельский Л. П., Курлянд В. А. Экспериментальное обоснование комбинированного применения криогенного и лучевого методов лечения опухолей	22
Киндзельский Л. П., Юречко В. Л., Злочевская Л. Л. Реактивность организма при комбинированном криолучевом лечении экспериментальных опухолей	25
Козлова В. Ф. Морфологические аспекты реакции клеток, тканей и органов на введение оксигенированного глицерина (ОЭГ) в организм животных	29
Кухарчик М. М., Барамбойм Н. К. Влияние криовоздействия на водные растворы и дисперсии некоторых высокомолекулярных соединений	34
Лазарева С. А., Бабийчук Г. А., Микляев И. Ю., Кравченко И. Г., Латугуз И. К., Задорожная В. Н., Королев В. В., Дьяченко В. К., Харченко И. А. Состояние калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем крови при экспериментальном инфаркте миокарда и кранио-церебральной гипотермии	37
Лобынцева Г. С., Вотякова И. А. Влияние стабилизирующих сред и низкотемпературного консервирования на электрофоретическую подвижность и дзета-потенциал эритроцитов человека	40
Мишнев Л. Г. Влияние некоторых криопротекторов на холодовую инактивацию растворимой митохондриальной АТФ-азы	43
Новиков А. Н., Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф. К вопросу о внутриклеточной кристаллизации	45
Петров М. М., Кушко О. В., Блоцкая Л. Н., Юхимчук Л. Н. Морфо-биохимическое и функциональное состояние эритроцитов, криоконсервированных с глицерином и поливинилпирролидоном, на протяжении 5 дней хранения при $+4 \pm 2^\circ\text{C}$	50
Подольский М. В., Рыболовлев Ю. Р. О лиофилизации эритроцитов человека	54
Похиленко В. Д., Иткин Ю. А. Действие глубокого замораживания на <i>Bacillus thuringiensis</i>	57
Скорняков Б. А., Вишневский В. И. Особенности механизма криопротекции глицерином	59
Тимошенко Ю. П., Пахомов П. Л. Исследование динамики процесса размораживания биообъектов механизмом теплопроводности	62
Цыганов А. И., Венделовский И. И. О применении криохирургических методов лечения злокачественных опухолей ЛОР-органов	69
Чередниченко В. М. О факторах, определяющих прочность фиксации хрусталика криоэкстрактором	74
Шурда Г. Г., Иткин Ю. А. Освобождение УФ-поглощающих веществ и сохранность молочнокислых стрептококков при замораживании и оттаивании	76

CONTENTS

<i>Bezdetko P. A.</i> On the Problem of Choosing Different Temperature Parameters for Cryotherapy in Ophthalmology	3
<i>Bugrov A. D., Ostashko F. I.</i> A Role of Some Cryoprotectants During Sperm Thawing	5
<i>Voskoboinikova T. N., Mikulinsky Yu. E.</i> The Effect of Low-Temperature Preservation on Mouse Tissue Lymphocytes	9
<i>Gubina N. F.</i> Effect of Cooling on Noradrenaline and Adrenaline Uptake by Some Organs	12
<i>Drozdova O. A., Gol'tsev A. N., Ostankova L. V.</i> Recovery Pattern of Hemopoiesis in Lethally Irradiated Recipients After Cadaver Bone Marrow Transplantation	13
<i>Zinchenko A. V., Moiseev V. A.</i> Study of Water Binding by Some Biomaterials	16
<i>Kapreliants A. S., Anisimov Yu. M., Yurchenko T. N., Kurasova L. Yu.</i> Algorithms of Automatic Morphometric Analysis of Cellular Ultrastructure	20
<i>Kindzel'sky L. P., Kuriyand V. A.</i> Experimental Substantiation of Combined Application of Cryogenic and Radiation Method for Treating Tumors	22
<i>Kindzel'sky L. P., Yurechko V. L., Zlochevskaya L. L.</i> The Body Reactivity at Combined Cryogenic and Radiation Treatment of Experimental Tumours	25
<i>Kozlova V. F.</i> Morphological Aspects of Cell, Tissue and Organ Reaction to Oxyethyl glycerol (OEG) Administered to Animals	29
<i>Kukharchik M. M., Baramboim N. K.</i> Effect of Low Temperatures on Aqueous Solutions and Dispersions of High Molecular Compounds	34
<i>Lazareva S. A., Babiychuk G. A., Miklyaev I. Yu., Kravchenko I. G., Latoguz I. K., Zadorozhnaya V. N., Korolev V. V., Dyachenko V. K., Kharchenko I. A.</i> A State of Callikrein-Kinin and Renin-Angiotensin Blood Systems at Experimental Myocardial Infarction and Cranio-Cerebral Hypothermy	37
<i>Lobyntseva G. S., Votyakova I. A.</i> Effect of Stabilizing Media and Low-Temperature Preservation on Human Electrophoretic Mobility and Zeta-Potential	40
<i>Mishneva L. G.</i> Effect of Some Cryoprotectants on Cold Inactivation on Soluble Mitochondrial ATPase	43
<i>Novikov A. N., Kuleshova L. G., Rosanov L. F.</i> On the Problem of Intracellular Crystallization	45
<i>Petrov M. M., Kushko O. B., Blotskaya L. N., Yukhimuk L. N.</i> Morphobiochemical and Functional state of Erythrocytes Cryopreserved with Glycerol and Polyvinylpyrrolidone During 5 Day Storage at $+4 \pm 2^\circ\text{C}$	50
<i>Podol'sky M. V., Rybolovlev Yu. R.</i> On the Lyophilization of Human Erythrocytes	54
<i>Pokhilenko V. D., Itkin Yu. A.</i> Effect of Deep Freezing on <i>Bacillus thuringiensis</i>	57
<i>Skorniyakov B. A., Vishevsky V. I.</i> Characteristics of Cryoprotective Mechanism of Glycerol	59
<i>Timoshenko Yu. P., Pakhomov P. L.</i> Investigation of the Dynamics of Biological System Rewarming Using a Mechanism of Thermal Conduction	62
<i>Tsyganov A. I., Vendelovsky I. I.</i> On the Application of Cryosurgical Methods for Treating Malignant Tumours of Pharyngonasal Organs	69
<i>Cherednichenko V. M.</i> On the Factors Determining the Strength of Lens Fixation by a Cryoextractor	74
<i>Shurda G. G., Itkin Yu. A.</i> Release of UV-absorbing Substances and Preservation of Frozen and Thawed Lactic Streptococci	76

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА. Выпуск 6

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

Редактор *Е. Т. Тальнова*. Художественный редактор *Р. И. Калыш*. Технический редактор
А. М. Капустина. Корректоры *Т. А. Обора*, *Р. С. Коган*.

Информ. бланк № 3700.

Сдано в набор 16. 10. 79. Подп. в печ. 10. 04. 80. БФ 09576. Формат 70×108/16. Бумага типогр.
№ 1. Лит. гарн. Вмс. печ. Усл. печ. л. 8,05. Уч.-изд. л. 8,18. Тираж 1000 экз. Заказ 4867.
Цена 1 руб. 20 коп.

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

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

УДК 57.043.615

К вопросу о выборе оптимальных температурных параметров для криотерапии в офтальмологии / Бездетко П. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 3—5.

Рассмотрен вопрос о выборе оптимальных режимов для криотерапии при некоторых глазных заболеваниях (глаукоме, отслойке сетчатки оболочки и др.). На основании литературных данных и особенных клинических наблюдений показано, что в отличие от криохирургических методов для криотерапии в офтальмологии оптимальные температуры криоинструментов должны лежать в пределах от -100°C и ниже, поскольку при этих температурах прилипание ткани к криоинструменту практически отсутствует и не происходит механического травмирования тканей.

Библиогр. : 17 назв.

УДК 57.043

Роль некоторых криопротекторов при размораживании спермиев / Бугров А. Д., Осташко Ф. И. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 5—9.

Изучали различные по механизму действия криопротекторы при размораживании спермы быков. Показано, что защитные свойства проникающих и непроникающих в клетки криопротекторов проявляются неоднозначно. Эндоцеллюлярные вещества проявляют защитные свойства внутри и вне клетки, а экзоцеллюлярные действуют непосредственно на внеклеточную сферу и опосредованно через цитоплазматическую мембрану на внутриклеточное содержание, ограждая клетку от повреждений.

Табл. 1. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043:612.42:536.48

Влияние низкотемпературной консервации на тканевые лимфоциты мышей / Воскобойникова Т. Н., Микулинский Ю. Е. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 9—12.

Изучалось влияние различных режимов замораживания до -196°C под защитой криопротектора ПЭО-400 на клеточный состав, содержание жизнеспособных клеток и активность течения биосинтеза белка и нуклеиновых кислот в популяции клеток, полученных из лимфоидных органов (тимус, селезенка, лимфоузлы) мышей линии *Balb/c*.

Подобрана трехэтапная программа замораживания, включающая этап 20 мин «холодной адаптации» при температуре -28°C . Консервация по этой программе обеспечивает выход 68—72% жизнеспособных клеток. Биосинтез белка РНК и ДНК в деконсервированных и отмытых от криопротектора клетках снижался на 40—55%.

Табл. 1. Библиогр.: 2 назв.

УДК 57.043:577.174.5

Влияние охлаждения на захват норадреналина и адреналина некоторыми органами / Губина Н. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 12—13.

Приведены экспериментальные данные о влиянии 60-минутного выдерживания при температурах 20, 4, 0, -20 , -196°C семявыносящего протока, гипоталамуса, предсердий крыс и предсердий быка на способность их к захвату адреналина — 7H^3 и норадреналина. Отмечено существование зависимости захвата гормонов-медиаторов от температуры предварительной экспозиции — торможение процесса при 20°C , активирование при $4-0^{\circ}\text{C}$ и значительное угнетение при более низких температурах.

Табл. 2. Библиогр.: 3 назв.

УДК 57.043.616.419—089.843:612.119

Характер восстановления кроветворения у летально облученных реципиентов после трансплантации трупного костного мозга / Дроздова О. А., Гольцев А. Н., Останкова Л. В. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 13—15.

Проведено изучение функциональной активности трупных миелокариоцитов в организме летально облученных реципиентов.

Результаты проведенных исследований показали, что при пересадке трупного костного мозга, полученного через 2; 6; 12 ч после смерти, облученным реципиентам, так же как и введение донорского трансплантата, отмечается восстановление клеточного состава крови и костного мозга, повышается нуклеиновый и белковый обмен в клетках костного мозга, в селезенках определяются колонии всех ростков кроветворения. Эти показатели были достоверно ниже у облученных мышей при пересадке ТКМ₁₂, что, по всей видимости, связано с ингибирующим действием постмортальных факторов на скорость дифференцировки стволовых клеток, что и обуславливает более поздний выход из гемопоэтических колоний зрелых клеточных элементов в кровотоки.

Табл. 1. Библиогр. : 7 назв.

УДК 57.043.536.6+539.143.43+543.226:543.3

Изучение связывания воды некоторыми биоматериалами / Зинченко А. В., Моисеев В. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 16—20.

На основании исследований теплот испарения воды из лизина, противобруцеллезной вакцины в различных защитных средах и вирусной вакцины против болезни Нью-Касла (штамм Ла-Сота) показано, что при влажности менее 18% теплота испарения на 80—120 кал/г превышает теплоту испарения чистой воды.

Существование воды с различной степенью связывания подтверждается исследованиями биоматериалов с помощью дериватеграфа. Молекулы связанной воды обладают высокой подвижностью ниже температуры замерзания основной массы растворителя, что следует из данных ЯМР высокого разрешения.

Сделан вывод, что переход воды в кристаллическую решетку льда, связанный с биоматериалом, энергетически невыгоден.

Ил. 2. Табл. 1. Библиогр. : 5 назв.

УДК 57.043.576.3.347:578.69

Алгоритмы автоматического морфометрического анализа ультраструктуры клетки / Капрельянц А. С., Анисимов Ю. И., Юрченко Т. Н., Курасова Л. Ю. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 20—22.

Статья посвящена вопросу алгоритмизации анализа электронно-микроскопического изображения клетки. Выбраны основные морфометрические показатели, и приведена общая блок-схема определения ряда основных количественных признаков. Описаны алгоритмы определения площади, периметра и максимальной ширины клетки. Все алгоритмы могут быть реализованы в виде программ для ЦВМ.

Ил. 3. Библиогр. : 3 назв.

УДК 57.043

Экспериментальное обоснование комбинированного применения криогенного и лучевого методов лечения опухолей / Киндзельский Л. П., Курлянд В. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 22—25.

Проведено экспериментальное исследование, в результате которого получены данные о преимуществе лечения опухолей по определенным схемам комбинированной криорадиотерапии в сравнении с криохирургией и лучевой терапией их.

Ил. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043

Реактивность организма при комбинированном криолучевом лечении экспериментальных опухолей / Киндзельский Л. П., Юрченко В. Л., Злочевская Л. Л. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 25—28.

Представлены данные изменения показателей кроветворной и иммунологической систем в процессе криолучевого и комбинированного криолучевого воздействия на 250 крысах-опухоленосителях. Установлено, что комбинированный метод криолучевого лечения оказывает менее выраженное нарушение реактивности организма (по показателям костномозгового кроветворения, аутофлоре кожи и процессу образования гемолизинов), что сказывается на эффективности лечения животных. У животных, леченных комбинированным методом, удельный вес излеченных крыс был существенно выше, а число рецидивов меньше, чем у животных, леченных лучевым или криогенными методами.

Ил. 2. Библиогр. : 7 назв.

УДК 57.043.616—091.8:615.9:541.49

Морфологические аспекты реакции клеток, тканей и органов на введение оксигетилированного глицерина (ОЭГ) в организм животных / Козлова В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 29—34.

Методами патоморфологического исследования выявлен характер действия оксигетилированного глицерина (ОЭГ) степени полимеризации 30 на структурные элементы организма в зависимости от дозы, концентрации и продолжительности введения. Установлено, что парентеральное введение в организм животных летальных и сублетальных доз вызывает сложный компенсаторно-защитный процесс, проявляющийся в развитии общей неспецифической реакции (стадия тревоги и резистентности) и активации определенных специфических механизмов защиты в каждом органе. Определены дозы вещества, не вызывающие морфологических изменений, а также дозы, близкие к пороговым.

Ил. 3. Библиогр. : 7 назв.

УДК 57.043

Влияние криовоздействия на водные растворы и дисперсии высокомолекулярных соединений / Кухарчик М. М., Барамбойм Н. К. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 34—37.

Исследовано влияние числа циклов и скорости криовоздействия на физико-химические свойства водных растворов и дисперсий высокомолекулярных соединений в широком диапазоне концентраций. Установлено, что результатом многократного криовоздействия на разбавленные растворы полимеров является усиление агрегации макромолекул, приводящее с повышением концентрации к возникновению и усилению фазового разделения. Сочетание этого процесса с криодиспергированием обуславливает сложный характер зависимостей реологических и оптических свойств дисперсий от числа циклов замораживания-оттаивания. С помощью методов спектрополяриметрии и ультрафиолетовой спектроскопии сделана общая оценка изменения коллагеновых структур в результате криовоздействия на них в водной среде.

Показана существенная роль процессов агрегации и конформационных изменений при криовоздействии на водные растворы и дисперсии высокомолекулярных соединений.

Ил. 2. Табл. 1. Библиогр. : 10 назв.

УДК 57.043:616.127—005.8:616.832.9

Состояние калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем крови при экспериментальном инфаркте миокарда и кранио-церебральной гипотермии / Лазарева С. А., Бабийчук Г. А., Микляев И. Ю., Кравченко И. Г., Латогуз И. К., Задорожная В. Н., Королев В. В., Дьяченко В. К., Харченко И. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 37—39.

Приведены результаты исследований активности калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем в сыворотке крови у интактных животных с явными признаками ишемии и некроза миокарда. Одной из групп животных после моделирования инфаркта миокарда была применена кранио-церебральная гипотермия. Показано, что оперативное вмешательство с целью моделирования инфаркта миокарда и гипотермия приводят к определенным изменениям активности калликреина, калликреиногена и ренина у экспериментальных животных.

Табл. 2.

УДК 57.536.48.047.537.363

Влияние стабилизирующих сред и низкотемпературного консервирования на электрофоретическую подвижность и дзета-потенциал эритроцитов человека / Лобынцева Г. С., Вотякова И. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 40—43.

Изучено влияние консервирующих сред АСД, ЦОЛИПК-76, ЦОЛИПК-12, при рН 7,2; 5,0 на дзета-потенциал эритроцитов. Установлено, что эритроциты, полученные на среду АСД, имеют дзета-потенциал 3023 мВ при рН 5,0 и 2649 мВ — при рН 7,2; на ЦОЛИПК-76 — 2525 мВ при рН 5,0 и 2369 мВ при рН 7,2; ЦОЛИПК-12 — соответственно 1414 и 2328 мВ. Отмечены различия в величине дзета-потенциала и электрофоретической подвижности у эритроцитов различных доноров через 1 ч после получения на раствор ЦОЛИПК-76. Приводятся данные по влиянию различных концентраций ПЭО-1500 и низкотемпературного консервирования на эритроциты.

Табл. 4. Библиогр. : 3 назв.

УДК 57.043

Влияние некоторых криопротекторов на холодовую инактивацию растворимой митохондриальной АТФ-азы / Мишнева Л. Г. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 43—45.

Изучали холодовую инактивацию изолированного сопрягающего фактора F_1 под влиянием различных криопротекторов (ДМСО, глицерин, полиэтиленоксидов с молекулярным весом 100 и 400) в 10- и 20%-ной концентрации. Установлено, что изолированный F_1 в процессе инкубации его при 0°C почти полностью терял свою АТФ-азную активность уже через 45—60 мин, диссоциируя при этом на 5—6 субъединиц. Добавленные в среду инкубации исследуемые криопротекторы пролонгировали сроки инактивации сопрягающего фактора F_1 до 5—6 ч. По сравнению с ПЭО-100 и ПЭО-400 наиболее выраженным криозащитным эффектом обладал 20%-ный ДМСО и глицерин.

Ил. 3. Библиогр. : 8 назв.

УДК 57.043:542.65

К вопросу о внутриклеточной кристаллизации / Новиков А. Н., Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 45—50.

Проиллюстрирована возможность применения модельных систем для изучения механизма внутриклеточной кристаллизации. Исследовано влияние на процесс внутриклеточной кристаллизации некоторых факторов: свойств клеточной мембраны, состава внутриклеточной среды, наличие внеклеточного льда. Установлено, что кристаллизация внутриклеточной среды — процесс, инициируемый внеклеточным льдом. Интенсивность инициирования зависит прежде всего от состояния бислоя липида, определенной степени заполнения адсорбционных слоев и упорядоченностью их структуры.

Ил. 3. Табл. 1. Библиогр. : 7 назв.

УДК 57.043

Морфо-биохимическое и функциональное состояние эритроцитов, криоконсервированных с глицерином и поливинилпирролидоном, на протяжении 5 дней хранения при $+4\pm 2^\circ\text{C}$ / Петров М. М., Кушко О. В., Блоцкая Л. Н., Юхимчук Л. Н. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 50—54.

Сравнительное изучение эритроцитов, консервированных с ПВП и глицерином при -196°C , показало нецелесообразность клинического применения размороженных эритроцитов позже 24 ч хранения при положительной температуре, независимо от применявшегося криопротектора.

Табл. 1. Библиогр. : 22 назв.

УДК 57.043.615.361.018.51—012

О лиофилизации эритроцитов человека / Подольский М. В., Рыболовлев Ю. Р. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 54—56.

Приводятся литературные данные и результаты собственных исследований, касающиеся проблемы лиофилизации и хранения эритроцитов человека в высушенном виде. Подчеркивается необходимость изучения метаболических и функциональных изменений в эритроцитах, подвергшихся высушиванию из замороженного состояния.

Библиогр. : 16 назв.

УДК 57.043

Действие глубокого замораживания на *Bacillus thuringiensis* / Похиленко В. Д., Иткин Ю. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 57—59.

Показано, что после замораживания до -196°C у вегетативных форм культуры *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* на первых этапах роста снижалась интенсивность включения меченых предшественников в белок и ДНК, пролонгировалось наступление стационарной фазы бактерии. Процесс споро- и кристаллообразования после криоконсервирования происходил без изменений.

Ил. 3. Библиогр. : 7 назв.

УДК 57.043:591.463.1

Особенности механизма криопротекции глицерином / Скорняков Б. А., Вишневский В. И. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 59—62.

Проведены исследования по разработанной схеме, позволяющей изучить эффективность защитного действия глицерина на спермии сельскохозяйственных животных при низкотемпературном консервировании в зависимости от места его сосредоточения — вне или внутри клеток. Установлено, что внутриклеточная концентрация может быть минимальной при оптимальном содержании глицерина в окружающей среде и наоборот. Механизм защиты глицерином клеток при замораживании спермы определяется главным образом его криопротективным действием на границе среда—цитоплазматическая мембрана.

Библиогр. : 18 назв.

УДК 57.043

Исследование динамики процесса размораживания биообъектов методом теплопроводности / Тимошенко Ю. П., Пахомов П. Л. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 62—69.

Изложены результаты приближенного расчета продолжительности процесса размораживания тел правильной формы и даны основные расчетные соотношения. Предлагаются некоторые способы усовершенствования процесса размораживания, позволяющие увеличить скорость нагрева и равномерность распределения температурного поля по объему биообъекта.

Ил. 4. Библиогр. : 9 назв.

УДК 57.043.616.21—006—08:615.832.9

О применении криохирургических методов лечения злокачественных опухолей ЛОР-органов / Цыганов А. И., Венделовский И. И. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 69—74.

Авторы подвергли криохирургическому лечению 161 больного с различными злокачественными новообразованиями ЛОР-органов. Непосредственно после лечения у 70% больных опухоль перестала определяться, у остальных — уменьшилась в размерах. Через 2 года отсутствие опухоли отмечено у 42,9% больных. Высказана гипотеза, что криодеструкция злокачественной опухоли вызывает иммунологическую перестройку в организме, направленную на ликвидацию новообразования. Сделан вывод о необходимости более широкого использования криохирургического метода при лечении злокачественных опухолей ЛОР-органов.

Табл. 1. Библиогр. : 18 назв.

УДК 57.043:615

О факторах, определяющих прочность фиксации хрусталика криоэкстрактором / Чередниченко В. М. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 74—76.

Представлены результаты экспериментальных исследований зависимости прочности фиксации хрусталика криоэкстрактором от вида и стадии зрелости катаракты. Показано значение величины ядра хрусталика при его фиксации к криоэкстрактору. Рекомендованы пути повышения прочности фиксации катаракты криоинструментом.

Библиогр. : 8 назв.

УДК 57.043

Освобождение УФ-поглощающих веществ и сохранность молочнокислых стрептококков при замораживании и оттаивании / Шурда Г. Г., Иткин Ю. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 76—78.

Установлено, что тест на освобождение УФ-поглощающих веществ отражает степень повреждения молочнокислых стрептококков при криовоздействии. Для суждения о повреждении молочнокислых стрептококков наиболее информативными являлись методы определения интенсивности включения бактериями радиоактивных предшественников синтеза нуклеиновых кислот и белка и освобождения УФ-поглощающих веществ.

Ил. 1. Табл. 2. Библиогр. : 5 назв.

UDC 57.043.615

On the Problem of Choosing Optimal Temperature Parameters for Cryotherapy in Ophthalmology / Bezdetko P. A. — Kriobiologiya i Kriomeditsina, 1980, iss. 6, p. 3—5.

On the basis of the data available in literature and clinical observations it is shown that, unlike cryosurgical methods, optimal temperatures of cryoinstruments for cryotherapy should be -100°C and lower since no tissue attachment to the cryoinstrument or tissue mechanical damage is practically observed at these temperatures.

Refs: 17 titles.

UDC 57.043

The Role of Some Cryoprotectants During Sperm Thawing / Bugrov A. D., Ostashko F. I. — Kriobiologiya i Kriomeditsina, 1980, iss. 6, p. 5—9.

Cryoprotectants, different by the mechanism of action, were studied while thawing bull semen. Protective properties of cryoprotectants permeating and non-permeating into the cells are pronounced in different ways. Endocellular substances manifest their protective properties inside and outside the cell, and extracellular ones act directly on the extracellular sphere and indirectly through the cytoplasmic membrane on the intracellular content protecting the cell against damages.

1 table. Refs: 14 titles.

UDC 57.043:612.48:536.48

The Effect of Low-Temperature Preservation on Mouse Tissue Lymphocytes / Voskoboinikova T. N., Mikulinsky Yu. E. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 9—12.

The effect of different cooling conditions to -196°C under protection of the cryoprotectant PEO-400 on the cellular composition, the survival and activity of protein and nucleic acids biosynthesis was studied in a cell population isolated from lymphoid organs (thymus, spleen, lymph nodes) of the mouse strain Balb/c.

A three-step freezing programme including a 20 min period of «cold adaptation» at -28°C is chosen. The preservation according to this programme provides a 68—72% yield of viable cells. The protein and nucleic acids biosynthesis in frozen-thawed and washed out from the cryoprotectant cells was observed to decrease by 40—55%.

1 table. Refs: 2 titles.

UDC 57.043.577.174.5

Effect of Cooling on Noradrenaline and Adrenaline Uptake by Some Organs / Gubina N. F. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 12—13.

Experimental data are presented on the effect of a 60 min. exposure of the rat seminiferous tubule, hypothalamus and auricles and bull auricles to 20, 4, 0, -20 and -196°C on their ability for adrenaline 7H^3 and noradrenaline uptake. The mediator hormone uptake is shown to depend on the temperature of the preliminary exposure: inhibition of the process at 20°C , its activation at 4 to 0°C and a considerable depression at lower temperatures.

2 tables. Refs: 3 titles.

UDC 57.043.616.419—089.843:612.119

Recovery Pattern of Hemopoiesis in Lethally Irradiated Recipients After Cadaver Bone Marrow Transplantation / Drozdova O. A., Gol'tsev A. N., Ostankova L. V. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 13—15.

Functional activity of cadaver myelocaryocytes was studied in lethally irradiated recipients. The results obtained show the recovery of the blood cell and bone marrow composition with an increase in nucleic and protein metabolism in bone marrow cells and the occurrence of colonies of all hemopoietic types in spleens following cadaver bone marrow transplantation (obtained 2, 6 and 12 h after death) to irradiated recipients as well as after donor grafts. These values were significantly lower in irradiated mice after transplantation of cadaver bone marrow obtained 12 h after death. This fact is likely to be connected with an inhibition action of postmortem factors on the differentiation rate of stem cells, this being due to later emergence of mature cellular elements from hemopoietic colonies into the blood flow.

1 table. Refs: 7 titles.

UDC 57.043.536.6+539.143.43+543.226:543.3

Study of Water Binding by Some Biomaterials / Zinchenko A. V., Moiseev V. A. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 16—20.

The investigations of heats of water vaporization from lysine, an antibrucellar vaccine in different protective media and a virus vaccine against the Newcastle disease (La Sota strain) show that at humidity lower than 18% the heat of vaporization is 80—120 cal/g higher than the heat of pure water vaporization. The existence of water of different binding degree is confirmed by biomaterial measurements with a derivatograph. Molecules of bound water are high-mobile at temperatures below the freezing point of the solvent bulk, as judged from measurements of high resolution NMR.

The transition of water bound with a biomaterial to the ice crystal lattice is concluded to be energetically disadvantageous.

2 figs. 1 tables. Refs: 5 titles.

UDC 57.043.576.3.347:578.69

Algorithms of Automatic Morphometric Analysis of Cellular Ultrastructure / Kaprelyants A. S., Anisimov Yu. N., Yurchenko T. N., Kurasova L. Yu. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 20—22.

The paper is concerned with the problem of algorithmization analysis of the cell electron-microscopic representation. Basic morphometric indices are chosen, and a general block-diagram for determining basic qualitative characteristics is presented. Algorithms of the cell area, perimeter and maximum width determinations are described. All the algorithms can be realized as programmes for electronic computers.

3 figs. Refs: 3 titles.

UDC 57.043

Experimental Substantiation of Combined Application of the Cryogenic and Radiation Methods for Treating Tumours / Kindzel'sky L. P., Kurlyand V. A. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 22—25.

The results of experimental studies demonstrated the advantage of tumour treatment according to the schedules of combined cryogenic and radiation therapy when compared to cryosurgery together with radiation treatment.

2 figs. Refs: 6 titles.

UDC 57.043

The body Reactivity at Combined Cryogenic and Radiation Treatment of Experimental Tumours / Kindzel'sky L. P., Yurechko V. L., Zlochevskaya L. L. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 25—28.

The paper is concerned with changes in hemopoietic and immunologic system indices for 250 rats — tumour carriers — under a combined cryogenic and radiation action. The combined method of cryoradiation treatment is found to induce less damage to the body reactivity (as judged from bone marrow hemopoiesis, skin autoflora and hemolysins formation), this influencing the efficiency of animal treatment. Animals treated by the combined method gave a significantly higher yield of recovery and a much smaller number of relapses as compared with those treated by radiation or cryogenic methods.

2 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043

Morphological Aspects of Cell, Tissue and Organ Reaction to Oxyethyl Glycerol (OEG) Administered to Animals Bodies / Kozlova V. F. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, c. 29—34.

Using pathomorphologic methods the character of action of oxyethyl glycerol (OEG) of polymerization 30 is determined as a function of dose, concentration and administration time. Parenteral administration of lethal and sublethal doses to animals induces a complex compensatory-protective process pronounced in the development of a total nonspecific reaction (stage of anxiety and resistance) as well as in the activation of specific mechanisms of cryoprotection in each organ. Doses which do not induce morphologic changes and those close to threshold ones are determined.

3 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043

Effect of Low Temperatures on Aqueous Solutions and Dispersions of High Molecular Compounds / Kukharchik M. M., Baramboim N. K. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 34—37.

The effect of the cycle number and freezing rates on the physicochemical properties of aqueous solutions and dispersions of high molecular compounds is studied in a wide concentration range. It is found that repeated exposures of diluted polymer solutions to low temperatures resulted in enhanced aggregation of macromolecules, this leading to the emergence and strengthening of phase separation with an increase in concentration. A combination of this process with cryodispersion determines a complex character of dependences of rheologic and optic properties of the dispersions upon the number of freezing-thawing cycles. A general estimation of changes in collagen structures resulted from exposure of their aqueous solutions to low temperatures is made using spectropolarimetric and ultraviolet spectroscopy methods.

A significant role of aggregation processes and conformational changes in aqueous solutions and dispersions of high molecular compounds under the effect of low temperatures is demonstrated.

2 figs. 1 table. Refs: 10 titles.

UDC 57.043:616.127—005.8.616.832.9

A State of Callikrein-Kinin and Renin-Angiotensin Blood Systems at Experimental Myocardial Infarction and Cranio-Cerebral Hypothermy / Lazareva S. A., Babychuk G. A., Miklyaev I. Yu., Kravchenko I. G., Latoguz I. K., Zadorozhnaya V. N., Korolev V. V., Dyachenko V. K., Kharchenko I. A. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 37—39.

The paper bears on the results of studies in the activity of callikrein-kinin and renin-angiotensin systems in the blood serum of intact animals with distinct signs of myocardial ischemia and necrosis. One animal group was treated by cerebral hypothermy after modelling myocardial infarction. Surgical intervention for modelling myocardial infarction as well as hypothermy are shown to induce certain changes in callikrein, callikreinogen and renin activity in experimental animals.

2 tables.

UDC 57.043.537.363

Effect of Stabilizing Media and Low-Temperature Preservation on Human Electrophoretic Mobility and Erythrocyte Zeta-Potential / Lobyntseva G. S., Votyakova L. A. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 40—43.

The effect of preservation media ACD, TSOLIPK-7b and TSOLIPK-12 with pH 7.2 or 5.0 on erythrocyte zeta-potential is studied. Erythrocytes removed in ACD medium are found to have zeta-potential 3023 mV at pH 5.0 and 2649 mV at pH 7.2; erythrocytes removed in TSOLIPK-7b — 2525 mV at pH 5.0 and 2369 at pH 7.2; erythrocytes removed in TSOLIPK-12 medium — 1414 mV and 2328 mV, respectively. Differences in the zeta-potential value and electrophoretic mobility of various donor erythrocytes are noted after one hour of removing in TSOLIPK-7b medium. The data are presented on the effects of different concentrations of PEO-1500 and low-temperature preservation on erythrocytes.

4 tables. Refs: 3 titles.

UDC 57.043:576.347

Effect of Some Cryoprotectants on Cold Inactivation of Soluble Mitochondrial ATPase / Mishneva L. G. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 43—45.

Cold inactivation of the isolated coupling factor F_1 was studied under the influence of different cryoprotectants (DMSO, glycerol, polyethylene oxides of molecular weight 100 and 400) in a 10% and 20% concentration. It is found that the isolated F_1 almost completely loses its ATPase activity after 45 to 60 min of incubation at 0°C and dissociated to 5—6 subunits. Cryoprotectants added to the incubation medium prolonged incubation periods of the coupling factor F_1 up to 5—6 h. A 20% DMSO and glycerol appeared to have a pronounced cryoprotective effect as compared to PEO-400 and PEO-100.

3 figs. Refs: 8 titles.

UDC 57.043:542.65

On the Problem of Intracellular Crystallization / Novikov A. N., Kuleshova L. G., Rosanov L. F. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 45—50.

The possibility of the model system application for investigation of the mechanism of intracellular crystallization is demonstrated. The effect of such factors as properties of the cell membrane, intracellular content and occurrence of intracellular ice on the process of intracellular crystallization is studied. The intracellular crystallization appeared to be a process initiated by extracellular ice. The initiation intensity depends, first of all, upon the state of lipid dilayer determined by the extent of fillness of adsorption bilayers and by their structural order.

3 figs. 1 table. Refs: 7 titles.

UDC 57.043

Morphobiochemical and Functional State of Erythrocytes Cryopreserved with Glycerol and Polyvinylpyrrolidone During 5 Day Storage at $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ / Petrov M. M., Kushko O. V., Blotskaya L. N., Yukhimuk L. N. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 50—54.

A comparative study of erythrocytes preserved with PVP and glycerol at -196°C demonstrated the inexpediency of clinical application of thawed erythrocytes later than twenty-four hours of storage at positive temperatures independent of the cryoprotectant used.

1 table. Refs: 22 titles.

UDC 57.043.615.361.018.51—012

On Lyophilization of Human Erythrocytes / Podol'sky M. V., Rybolovlev Yu. R. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 54—56.

The paper presents the literature data and the results of the author's own studies concerning the problem of lyophilization and storage of human erythrocytes in a dried state.

Emphasis is laid on the necessity of studying metabolic and functional changes in frozen erythrocytes subjected to drying.

Reft: 16 titles.

UDC 57.043

Effect of Deep Freezing on *Bacillus thuringiensis* / Pokhilenko V. D., Itkin Yu. A. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 57—59.

A decrease in the intensity of the labelled precursor incorporation into proteins and DNA is demonstrated at the initial stages of growth of the *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* vegetative forms following freezing to -196°C . The beginning of the bacterial stationary phase was prolonged. The process of spore and crystal formation after cryopreservation appeared to be unaffected.

3 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043:591.463.1

Characteristics of Glycerol Cryoprotective Mechanism / Skorniyakov B. A., Vishnevsky V. I. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 59—62.

Experiments were carried out according to a developed scheme allowing the efficiency of the glycerol cryoprotective action on farm animal spermatozoa to be studied at the low-temperature preservation depending upon the place of its concentration: outside or inside the cell. As a result, it has been found that intracellular concentration may be minimum at its optimum content in the environment and vice versa. The mechanism of the cell cryoprotection by glycerol is shown to be determined mainly by its cryoprotective action on the medium-cytoplasmic membrane interface.

Refs: 18 titles.

UDC 57.043

Investigation of the Dynamics of Biological System Rewarming Using a Mechanism of Thermal Conduction / Timoshenko Yu. P., Pakhomov P. L. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 62—69.

The results of an approximate calculation of rewarming bodies of a regular shape are presented with basic estimated relations. Improved methods of rewarming are suggested which allow the heating rate and the uniformity of temperature field distribution to be increased over the volume of biological systems.

4 figs. Refs: 9 titles.

UDC 57.043.612.21—006—08:615.832.9

On the Application of Cryosurgical Methods for Treating Malignant Tumours of Pharyngeal Organs / Tsyganov A. I., Vendelovsky I. I. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 69—74.

The authors treated cryosurgically 161 patients with different malignant tumours of pharyngeal organs. The tumours were unobserved immediately after treating in 70% of the patients, in the others tumours diminished in size. Two years later 42.9% of the patients had no tumours. It is suggested that cryodestruction of malignant tumours induces the immunologic body reorganization directed at the neoplasm liquidation. A wider application of the cryosurgical method is considered to be necessary for treating pharyngeal malignant tumours.

1 table. Refs: 18 titles.

UDC 57.043:615

On the Factors Determining the Strength of Lens Fixation by a Cryoextractor / Cherednichenko V. M. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 74—76.

The paper deals with the results of experimental studies in the strength of lens fixation by a cryoextractor as a function of the type and stage of cataract maturity. The significance of the lens nucleus size for the cryoextractor fixation is shown. Improved methods for increasing the strength of cataract fixation by the cryoinstrument are recommended.

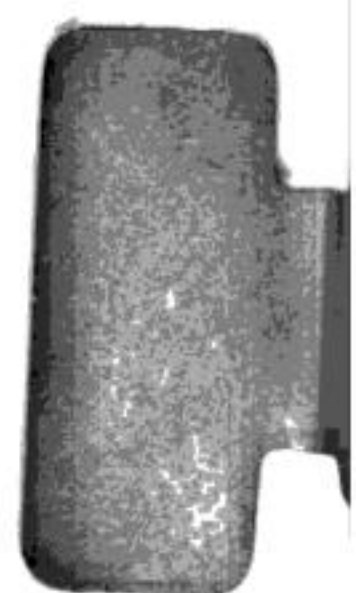
Refs: 8 titles.

UDC 57.043

Release of UV-Absorbing Substances and Preservation of Frozen and Thawed Lactic Streptococci / Shurda G. G., Itkin Yu. A. — *Kriobiologiya i Kriomeditsina*, 1980, iss. 6, p. 76—78.

The UV-absorbing substance release test is stated to reflect the extent of injury in lactic streptococci subjected to low temperatures. Methods for determining the intensity of bacterial incorporation of nucleic acids and protein synthesis radioactive precursors and UV-absorbing substances release are shown to be the most informative for estimation of the damage to lactic streptococci.

1 figs. 2 tables. Refs: 5 titles.



1 руб. 20 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»
КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА. 1980.
вып. 6, 1—92.