

Page Denied

Next 2 Page(s) In Document Denied

МЕДИЦИ



1963

Проблемы

ГЕМАТОЛОГИИ

и ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ

Про гематол

К сведению читателей журнала

Для получения полного комплекта журнала «ПРОБЛЕМЫ ГЕМАТОЛОГИИ И ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ» Государственное издательство медицинской литературы просит Вас своевременно оформить подписку на второе полугодие 1963 г.

Подписная плата на полугодие 1 руб. 80 коп.

Подписка принимается в пунктах подписки «Союз-печать», почтамтах, конторах и отделениях связи, общественными распространителями печати на заводах и фабриках, шахтах, промыслах и стройках, в колхозах, в учебных заведениях и учреждениях.

Редакции журналов и издательство подписку на журналы не принимают.

Журналы в розничную продажу не поступают.

МЕДГИЗ

ПРИМЕНЕНИЕ ГЛУБОКОГО ХОЛОДА ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ КРОВИ В ЗАМОРОЖЕННОМ СОСТОЯНИИ

Проф. Ф. Р. Виноград-Финкель, доцент А. Е. Киселев, Ф. Г. Гинзбург,
Л. И. Федорова, Э. И. Каухчишвили

И Центрального ордена Ленина института гематологии и переливания крови
(дир. — доцент А. Е. Киселев) Министерства здравоохранения СССР

Разработка методов сохранения крови в замороженном состоянии занимает в настоящее время центральное место в проблеме консервирования крови. Многие годы получение живых клеток, в частности эритроцитов, после замораживания и оттаивания считалось невозможным.

Большое практическое значение данного вопроса заключается в том, что благодаря полному подавлению обмена веществ при температуре ниже нуля возможно длительно (многие месяцы и даже годы) хранить клетки жизнеспособными, чего нельзя получить при положительных температурах.

Достигнутые в этой области успехи создают уже сейчас большие возможности для значительного удлинения сроков хранения крови. Установлено, что содержащиеся (с глицерином) в замороженном виде в течение многих месяцев и даже нескольких лет эритроциты после оттаивания в основном остаются неповрежденными и сохраняют свои физиологические свойства [31, 47].

В начале разработки проблемы, когда замораживали небольшие объемы крови, авторы предлагали этот метод для длительного хранения стандартных эритроцитов, необходимых для определения редких групп крови [30, 44].

В ряде работ указывалось [31, 47], что этот метод позволит длительно сохранять кровь редких групп для переливания больным или заблаговременно заготавливать гепаринизированную кровь для экстракорпорального кровообращения.

Считают также, что метод длительного хранения крови при отрицательных температурах приобретает исключительно важное значение для создания запасов крови в особых условиях [49, 50, 57].

Мы считаем, что метод консервирования крови в замороженном состоянии заслуживает широкого внедрения в практику учреждений службы крови. В первую очередь это необходимо для того, чтобы использовать для переливания остающиеся после заготовки сухой плазмы эритроциты, срок хранения которых при 4—6° ограничен лишь 3—4 неделями. Не исключается при этом сохранение крови редких групп и резусотрицательной крови.

Впервые о возможности замораживания и оттаивания эритроцитов без их значительного повреждения сообщили И. И. Федоров и Смит [29, 52]. О применении эритроцитов для трансфузий после хранения в течение нескольких месяцев при —10°, —20° указывает ряд авторов [2, 3, 5—7, 21, 27, 28, 43, 44]; имеются также данные о замораживании кровяных клеток без их разрушения в течение нескольких лет [31, 47].

Успехам в области консервирования крови методом замораживания значительно способствовали достижения современной биологии в изучении вопросов устойчивости живых клеток и других биологических объектов (вплоть до целых организмов) к воздействию холода. Этот новый раздел биологии назван криобиологией. Было отмечено большое разнообразие реакций клеток и тканей на воздействие холода и установлено, что отрицательная температура вплоть до -195° не вызывает при определенных условиях гибели клеток и тканей. После столь сильного охлаждения они остаются жизнеспособными, приживают при трансплантации, дают рост в культурах тканей. Кроме того, значительные успехи достигнуты в опытах с глубоким охлаждением и оживлением после отогревания целых организмов животных. Сюда относятся опыты с замораживанием насекомых и других живых организмов при температурах до -190° [18, 22, 23]. Смит и соавторы [46, 53] в 1957 г. показали, что хомяки, замороженные в течение часа до -5° , после обогривания с помощью диатермии и искусственного дыхания оживают и полностью восстанавливают свои функции. При этом было отмечено, что выживали только те животные, у которых превращение воды в кристаллы льда не превышало 50% от общего количества жидкости в организме. Кролики и некоторые приматы (*galago crassicaudatus*) не перенесли подобного замораживания: несмотря на наступавшее непосредственно после отогревания восстановление сердечной деятельности и произвольных движений, животные вскоре погибали. Это показывает, что совместности жизни организма со значительным вымерзанием воды достигнуть труднее, чем сохранить жизнеспособность изолированных клеток и тканей в этих условиях.

Указанные результаты заставили пересмотреть многие господствовавшие ранее в научной литературе представления о границах жизни и проблеме анабиоза, о причинах повреждающего действия глубокого холода и на основе этого изучать условия, при которых можно сохранить жизнеспособность замороженных живых клеток.

Предохранить эритроциты от разрушения оказалось возможно лишь после раскрытия причин повреждающего действия процесса замораживания. Этому способствовали многочисленные исследования биохимических и биофизических изменений, происходящих в клетках, и характера кристаллизации воды в крови, подвергавшейся различной степени охлаждения [11, 24, 26, 35, 39, 42]. Большинство исследователей считает, что повреждение эритроцитов является результатом двух феноменов травмирования кристаллами льда и воздействия гиперконцентрированными солевыми растворами, образующимися внутри и вне клетки в оставшейся жидкой массе при превращении воды в лед. В этих условиях эритроциты продолжают прогрессивно обезвоживаться наряду с увеличением осмотического градиента между его внутренней и наружной средой.

Ловелок [36] наблюдал денатурацию липопротеиновых комплексов в присутствии гиперконцентрированных солевых растворов. Он установил также, что, кроме грубых повреждений во время роста кристаллов льда, замораживание нарушает и молекулярные связи в живых клетках и прежде всего — в мембранах. В среде с высокой ионной силой, получающейся в результате возрастания концентрации солей, связывающие компоненты фосфолипидов клеточной мембраны ослабевают, что ведет к увеличению ее проницаемости и набуханию. При переходе такой клетки снова в физиологическую среду при оттаивании наступает немедленная ее лизис.

В разрушении клеток могут играть роль и другие еще не распознанные факторы, как, например, повреждение энзиматических и других активных систем в живой клетке [46], но доминирующей причиной является чрезмерное извлечение воды в процессе кристаллообразования. Экспериментально установлено [38, 55], что кристаллообразование и, следовательно, повреждающее действие отмечается больше всего в зоне от -3 до -40° . Эта область температур названа поэтому критической, или опасной, зоной. Время нахождения замораживаемых эритроцитов в этой зоне в окружении гиперконцентрированного солевого раствора влияет на их стабильность. Любе [38] показал, что прохождение критической зоны температур в течение нескольких миллисекунд не оказывает губительного действия: ему удалось получить морфологическую сохранность эритроцитов при очень быстром замораживании крови в тонком слое (на металлической пластинке) при -196° . При удлинении этого времени, например при охлаждении большой массы крови в тех же условиях, без применения защитных веществ большинство эритроцитов разрушается. Значение времени пребывания в критической зоне в такой же степени можно отнести и к процессам оттаивания крови.

Эти биофизические данные легли в основу доказанного в настоящее время положения, что скорость замораживания и оттаивания играет ведущую роль в сохранении целостности эритроцитов, водная фаза которых в основном находится в свободном состоянии и легко переходит при охлаждении в кристаллы льда.

Установлено, что медленное замораживание сопровождается экстрацеллюлярным образованием крупных кристаллов льда, которые не обязательно разрывают клетки благодаря расположению их в каналах между кристаллами сетки формирующегося льда. Однако наступающие при этом дегидратация и концентрация солей сильнее разрушают клетку, чем внеклеточные кристаллы. Воздействуя веществами, сильно связывающими воду, можно препятствовать ее переходу в кристаллы льда или мешать их увеличению в размерах. С другой стороны, быстрое замораживание ведет к образованию очень мелких кристаллов и не сопровождается большим извлечением воды из

раствора и его гиперконцентрацией. Поэтому усилия исследователей избежать факторов, повреждающих эритроциты при замораживании, направлены как на связывание свободной воды добавлением в кровь различных веществ, например глицерина, сахаров, коллоидных веществ, этилового спирта, так и на увеличение скорости охлаждения и оттаивания.

На всех приведенных выше теоретических предпосылках и основаны в настоящее время различные подходы к решению проблемы длительного консервирования крови путем замораживания.

В СССР были предприняты попытки сохранять кровь при отрицательных температурах без кристаллообразования — в жидком состоянии. Предложенные специально для этой цели консервирующие растворы с ограждающими веществами позволяют хранить кровь при температурах до -8° и несколько ниже в жидком состоянии, без гемолиза, пригодной для переливания в среднем до 100 дней [1, 3, 4, 7, 21].

Однако более длительное сохранение крови без гемолиза в жидкой фазе не удавалось. Для консервирования крови в течение многих месяцев или даже лет необходимы полное подавление обмена веществ в клетках и охлаждение до полного затвердевания.

В настоящее время получили распространение два принципа в решении проблемы хранения крови в твердом, замороженном состоянии. Один из них — это консервирование эритроцитов с большими концентрациями (до 50%) глицерина при умеренно низких температурах (до -80° , -120°). Этот так называемый медленный метод замораживания, разрабатываемый уже около 10 лет, детально изучен в эксперименте и широко освещен в литературе [31, 43—45, 47, 51, 57]; накапливается опыт клинического применения такой крови.

В последние годы [32, 37] стали изучать применение диметилсульфоксида, который по механизму защитного действия не отличается от глицерина. Защитное действие глицерина на клетку заключается в предотвращении образования крупных кристаллов льда вне и внутри клеток благодаря его способности особенно сильно связывать свободную воду и проникать в эритроцит. Таким путем глицерин снижает тепе́нь гиперконцентрации солей и дает возможность удлинить время пребывания эритроцитов в опасной температурной зоне без их повреждения. Поэтому клетки в присутствии глицерина можно замораживать медленно. Так, флакон или пластмассовый мешок с 500 мл смеси эритроцитной массы с глицерином, помещенный в рефрижератор, приобретает его температуру (-80°) лишь через 7 часов [31]. Этот метод позволяет многие месяцы сохранять замороженные эритроциты с незначительным (от 2 до 10%) их повреждением после оттаивания. Однако метод пока еще мало доступен для клинического применения в связи с трудоемкостью процесса извлечения больших концентраций глицерина, вызывающих резко выраженную гипертонию в клетках, и необходимостью иметь специальную аппаратуру [45].

Для обработки в стерильных условиях глицеринизированной крови несколькими растворами с последовательно снижающейся концентрацией глицерина и солей в США созданы дорогостоящие и очень дефицитные фракционаторы — центрифуги Кона [31, 33]. Но и с их помощью процесс отмывания глицерина отнимает много времени. Переливать замороженные эритроциты без отмывания глицерина нельзя, так как при переводе их в изотоническую среду кровеносного русла они быстро разрушаются. При процедуре отмывания происходит дополнительная потеря некоторой части эритроцитов вследствие их лизиса. По последним данным [57], потеря эритроцитов после их хранения с глицерином и отмывания составляет в среднем около 20%.

Другой принцип — замораживание крови путем ее сверхбыстрого (не более нескольких минут) охлаждения при ультранизких температурах без применения глицерина.

При такой скорости охлаждения сильно сокращается время пребывания крови в неблагоприятной критической температурной зоне, т. е. создаются такие условия, при которых время прохождения эритроцитов через опасную температурную зону будет меньше того, при котором происходит повреждение клетки в этой зоне. Этот путь является более перспективным и не требует длительной обработки крови после размораживания, поскольку в ограждающих растворах, которые при этом методе также необходимы, можно обойтись без глицерина.

Этот принцип, направленный на получение бескристаллического замораживания за счет высоких скоростей охлаждения, положен в основу разрабатываемого в настоящее время в Центральном институте гематологии и переливания крови метода консервирования крови при отрицательных температурах.

Способу быстрого замораживания крови отдает предпочтение ряд американских авторов [40, 41, 48, 49, 55, 58]. Эти авторы, так же как и мы, применяют в ограждающих растворах большие концентрации углеводов и коллоидов. Идея по линии замены в растворах неудобного для практического использования глицерина другими связывающими воду добавками, мы с самого начала разработки проблемы замораживания крови пользовались указанными веществами [6—8, 10, 12, 14].

Ниже приводится наш опыт применения глубокого холода для сверхбыстрого замораживания крови, ее долгосрочного хранения и последующего использования в клинике. Мы поставили перед собой задачу разработать способы ускоренного замораживания таких количеств крови, которые практически применимы для переливания (250—500 мл). Возможность сохранения эритроцитов интактными после быстрого замораживания в жидком азоте мельчайших объемов крови (около 0,2 мл) была отмечена Люие еще в 1949 г. [38] и позже подтверждена в работах других авторов [25], а также в исследованиях при разбрызгивании крови в жидкий азот [12, 19, 40, 41]. Однако для получения неповрежденных эритроцитов при быстром замораживании больших объемов крови, практически требующихся для переливания, необходимо было изыскать другие условия для достижения быстрого охлаждения. Одновременно потребовалось создать и более эффективные растворы для ограждения замораживаемых клеток от разрушения.

Несомненно рациональным является достижение столь быстрого охлаждения крови, при котором полностью исключается кристаллообразование и наступает стекловидное затвердевание, т. е. витрификация [16, 17, 34]. Теоретически допускается, что витрификация может быть достигнута при распылении очень мелких капель крови непосредственно в жидкий азот (при -196°), так как при этом наступает мгновенное (до 100° в секунду) охлаждение. Допускается также, что при хранении витрифицированной крови при той же температуре можно неопределенно долгое время сохранять ее без рекристаллизации, т. е. без повреждения клеток (обязательным условием является столь же быстрое оттаивание). Проведенные нами в этом направлении эксперименты [12, 20] показали, что метод распыления крови непосредственно в жидкий азот может служить одним из способов витрификации больших объемов крови. Однако такой открытый способ замораживания и оттаивания (путем погружения крупинки крови в теплый физиологический раствор) не обеспечивает стерильности крови, предназначенной для переливания больным. Поэтому была поставлена задача — разработать способ сверхбыстрого замораживания крови, помещенной в закрытый сосуд. Последний должен обеспечить сохранение стерильности крови при соприкосновении контейнера с охлаждающими и восстанавливающими средами.

Переход на закрытый способ замораживания в контейнере выдвинул новые задачи, главной из которых являлось создание условий для

быстрого отвода тепла от контейнера с кровью. Трудности заключались в том, что охлаждение больших объемов крови происходит во много раз медленнее охлаждения капель крови.

При разработке метода сверхбыстрого замораживания крови, помещаемой в контейнер, учитывали следующие факторы, влияющие на скорость теплоотвода: 1) материал, из которого изготовлен контейнер; 2) температуру кипения и другие свойства охлаждающей среды; 3) геометрическую форму контейнера и толщину слоя крови (эти факторы связаны отношением внешней поверхности контейнера к объему крови); 4) свойства веществ, входящих в ограждающие растворы; 5) различную устойчивость крови к воздействию низкой температуры.

Первые 4 условия в основном сохраняют свое значение постоянно, а последнее, как правило, зависит от индивидуальных свойств крови донора.

Частично этим объясняются те колебания в результатах, которые получаются после восстановления замороженной крови, что отмечено многими авторами.

После испытания различных материалов мы отдали предпочтение алюминию, из которого были сделаны контейнеры для разных объемов крови с учетом значимости геометрических параметров, усиливающих теплоотвод.

При испытании контейнеров мы судили об их преимуществе по степени восстановления замораживаемых в них эритроцитов, о чем судили по величине гемолиза, определявшегося в надстое размороженной и центрифугированной крови. Замораживание производили путем погружения контейнера с кровью, смешанной пополам с ограждающим раствором, в жидкий азот. Процесс затвердевания крови заканчивался через 1—3 минуты в зависимости от объема крови и вида контейнера. Для оттаивания контейнер быстро переносили в водяную баню с температурой 43—45°. Время оттаивания крови примерно соответствовало времени замораживания.

Остановимся на механизме отвода тепла при быстром замораживании крови в сочетании с различными добавляемыми компонентами и принципах выбора контейнера.

В момент погружения контейнера в жидкий азот происходит интенсивный отвод тепла от поверхности контейнера, в котором находится кровь, и начинается подогрев прилегающих слоев азота, в результате чего возникает его бурное кипение. Наблюдение показывает, что пузырьки газообразного азота, возникающие на стенках контейнера, быстро увеличиваются в объеме, отрываются и всплывают на поверхность жидкого азота; новые частицы жидкого азота занимают освободившееся место и входят в соприкосновение с контейнером. Это явление повторяется до тех пор, пока температура азота и контейнера не выравнивается. К этому моменту процесс теплоотвода закончен, что служит признаком завершившегося процесса замораживания. В данных условиях охлаждающей средой становится уже не жидкий азот, а своеобразная газо-жидкостная смесь, что значительно ухудшает условия теплоотвода. Тем не менее использование жидкого азота остается пока единственным удобным способом обеспечения быстрого замораживания крови.

При замораживании тепло, направленное от центрального слоя объекта (крови), преодолевает термическое сопротивление следующих элементов: а) жидкого слоя крови, б) замороженных слоев крови, в) стенок контейнера, г) газо-жидкостной смеси. Поэтому при выборе оптимального контейнера из числа испытываемых решающую роль играет определение коэффициента теплопередачи (K).

Расчетное значение этого фактора можно получить, используя известное уравнение теплопередачи:

$$Q = K \cdot F \cdot \Delta t \quad (1)$$

где Q — количество тепла, передаваемого в единицу времени; F — поверхность теплопередачи (которая легко определяется экспериментально); Δt — разность между температурой крови и охлаждающей среды (которая известна). Единственным фактором, влияющим на величину Q , является коэффициент теплопередачи — K .

Количество тепла (Q), подлежащего удалению, можно определить из уравнения:

$$Q = G[C_1 \cdot (t_1 - t_2) + W\omega R + C_2(t_2 - t_3)] \quad (2)$$

где G — вес кровяного образца (в кг); C_1 — теплоемкость незамороженной крови (в ккал/кг °С); C_2 — теплоемкость замороженной крови (в ккал/кг °С); t_1 — первоначальная температура крови; t_2 — температура начала замерзания крови; t_3 — конечная температура замороженной крови; $W\omega$ — вес льда в 1 кг замороженной крови (в кг/кг); R — скрытая теплота льдообразования (в ккал/кг).

Подставив полученное значение Q из уравнения (2) и все остальные составляющие уравнения (1), можно определить K , т. е. общий коэффициент теплопередачи (ккал/м² °С в час).

Однако для выбора формы контейнера имеет значение не только определение общего коэффициента теплопередачи, но и выяснение величины коэффициента теплоотдачи (α_2) от стенки контейнера к жидкому азоту (поскольку интенсивность движения азотной газожидкостной смеси зависит от формы контейнера). Этот коэффициент может быть определен при вычисленном выше значении K из следующей формулы (в случае плоской стенки контейнера):

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_1}{\lambda_1} + \frac{\delta_2}{\lambda_2} + \frac{1}{\alpha_2}} \quad (3)$$

где α_1 — коэффициент теплопередачи от жидкой крови к замороженной; δ_1 — общая толщина замороженных слоев (замеряемая от центра поперечного сечения контейнера к периферии); λ_1 — коэффициент теплопроводности замороженных слоев крови; δ_2 — толщина стенки контейнера; λ_2 — коэффициент теплопроводности контейнера; α_2 — коэффициент теплоотдачи от стенки контейнера к жидкому азоту. Откуда

$$\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_1}{\lambda_1} + \frac{\delta_2}{\lambda_2} + \frac{1}{\alpha_2} = \frac{1}{K} \quad \text{или} \quad \frac{1}{\alpha_2} = \frac{1}{K} - \frac{1}{\alpha_1} - \frac{\delta_1}{\lambda_1} - \frac{\delta_2}{\lambda_2}$$

Таким образом,

$$\alpha_2 = \frac{1}{\frac{1}{K} - \frac{1}{\alpha_1} - \frac{\delta_1}{\lambda_1} - \frac{\delta_2}{\lambda_2}}$$

ккал/м² °С в час [4].

Из полученных значений K или α_2 в испытываемых контейнерах мы выбрали те, которые обеспечивали максимальное значение этих коэффициентов. Из отобранных таким образом контейнеров наилучшие результаты восстановления эритроцитов после замораживания и оттаивания показали конструкции контейнеров с развитой поверхностью, у которых отношение поверхностей теплоотвода к объему замораживаемой крови ($\frac{S}{V}$) было наибольшим. Это могут быть цилиндрические, трубчатые или плоские прямоугольные сосуды (рис. 1).

При многочисленных опытах мы убедились в том, что быстрое замораживание крови в контейнерах с развитой поверхностью всегда сопровождалось намного лучшим восстановлением эритроцитов после их оттаивания, чем замораживание в гладких контейнерах (табл. 1 и 2).

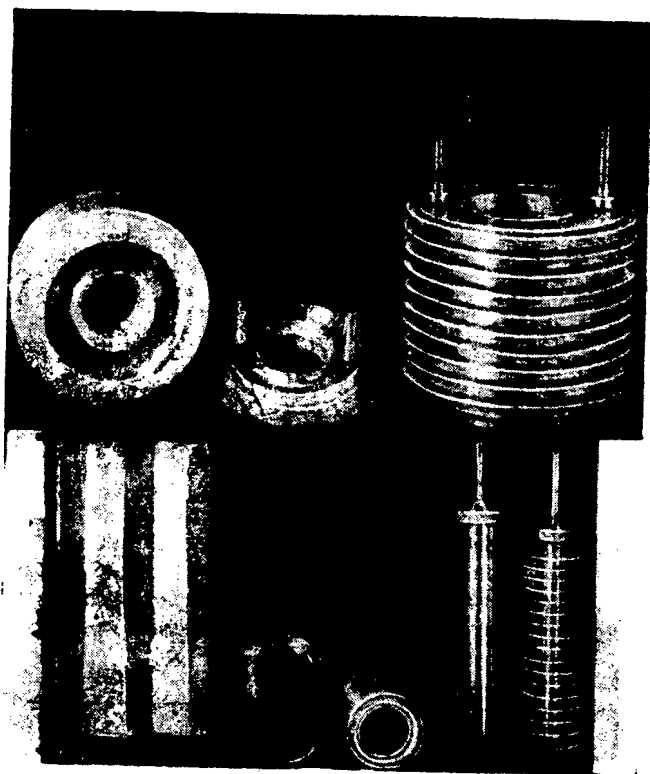


Рис. 1. Образцы испытанных алюминиевых контейнеров для крови.

Из табл. 1 видно, что в большинстве случаев при замораживании небольших (до 40 мл) объемов крови в контейнерах с развитой поверхностью (в наших исследованиях — с ребристой поверхностью) независимо от формы контейнера, его сечения и объема крови имелся высо-

Таблица 1

Влияние поверхности на восстановление эритроцитов (в %) после их замораживания

Контейнер	Объем замораживаемой крови (в мл)	Раствор № 11 ₁ Раствор № 11 ₂ Раствор № 11 ₃					
		поверхность					
		разви- тая	глад- кая	разви- тая	глад- кая	разви- тая	глад- кая
Кольцевой цилиндр	30	88	65	90	70	92	81
То же	30	84	65	91	68	92	76
»	30	82	70			90	83
»	30	81	62			93	72
Грубка	15	94	81	93	53	93	78
»	15	88	77	95	60	92	78
»	15	93	70	95	62		
»	40	91	45	87	35	92	40
»	40			90	40		

Таблица 2

Восстановление эритроцитов, замороженных в контейнерах с развитой поверхностью при различном значении отношения $\frac{S}{V}$

Контейнер		Объем (в мл)	Расчетное значение $\frac{S}{V}$	Восстановление эритроцитов (в %)	
форма	сечение (в мм) (толщина замораживаемого слоя)			раствор №	
				11 ₁	11 ₂
Ребристая трубка	10	10	4,2	92	92,5
То же	10	10	4,2	94	92,5
» »	10	10	4,2	93	92,5
Кольцевой ребристый цилиндр	2	100	2,8	91	94
То же	2	100	2,8	90	91
» »	2	100	2,8	86	93
» »	2	100	2,8	87	90
» »	2	30	2,6	93	91
» »	2	30	2,6	92	88
» »	2	30	2,6	88	88
» »	2	30	2,6	84	84

кий процент (от 90 до 95) восстановления эритроцитов после оттаивания крови на растворе № 11₂ и 11₁. В контейнерах же с гладкой поверхностью процент восстановленных эритроцитов был чаще в пределах 60—78 и даже ниже. Эта разница в количестве восстановленных эритроцитов закономерно отмечалась во всех наших опытах (рис. 2).

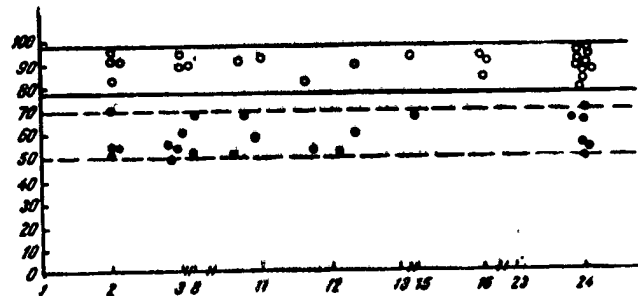


Рис. 2. Значение ребристой поверхности контейнера
Светлые кружки — ребристая поверхность, черные — гладкая.
На оси ординат — процент восстановленных эритроцитов; на оси абсцисс — время экспозиции (в часах) консервирующим раствором № 11 и 11₂ (объем — 200 мл).

В табл. 2 представлены данные, свидетельствующие в пользу контейнеров с большим расчетным значением отношения поверхности теплоотвода к объему замораживаемой крови, т. е. $\frac{S}{V}$, так как в них большей скоростью происходит отвод тепла от замораживаемой крови.

Для приближения метода к запросам практики (объемы крови, применяемые в клинике, простота метода, удобства замораживания и хранения) проведено изучение вопроса об оптимальной величине поперечного сечения и размера контейнера. Сравнение различных сечений при одной форме и емкости контейнера показало, что лучшие результаты получаются при сечении контейнера 2 мм, так как в нем быстрее происходит теплоотвод.

Так, в опытах с кровью одного и того же донора в контейнере емкостью 100 мл с поперечным сечением 2 мм процент восстановлен-

ных эритроцитов равнялся 87—94. В контейнере такой же емкости с сечением 5 мм восстановленные эритроциты составляли лишь 62—87% (в первом случае кровь замерзала за 25 секунд, во втором — за 45 секунд). Однако для создания удобного контейнера с большей емкостью (300—500 мл) потребовалось увеличить сечение контейнера до 15—20 мм, что привело к увеличению толщины замораживаемого слоя и, следовательно, к уменьшению скорости охлаждения крови. В результате этого процент восстановленных эритроцитов часто снижался. Поэтому были приняты меры по усовершенствованию техники замораживания и оттаивания. К ним относится помешивание крови (покачивание или встряхивание контейнера) при погружении в азот и особенно в водяную баню. Это ускоряет теплоотдачу, так как масса крови разделяется внутри контейнера на более тонкие пласты, наслаивающиеся при замерзании на пристеночные. Этот прием привел к некоторому улучшению результатов, но более значительное влияние на сохранность клеток при замораживании толстого слоя крови оказывает характер и количество веществ, добавленных в кровь для защиты клеток.

Для сверхбыстрого замораживания больших объемов крови мы применили различные варианты растворов, разработанных на основе рецепта раствора № 11, который был предложен нами ранее для распыления крови в жидкий азот (20). В его состав входили глюкоза (конечная концентрация 4%), один из дисахаридов — сахароза, лактоза (конечная концентрация 2%) или маннит, коллоиды (полиглюкин или альбумин), цитрат натрия (0,4%) и бромистый натрий (0,1%). Усовершенствование раствора заключалось в увеличении концентраций углеводов (раствор № 11₂). Повышенное содержание сахаров глюкозы и особенно дисахаридов (сахароза, лактоза), не проникающих в эритроциты и связывающих воду в экстрацеллюлярном пространстве, препятствует ее переходу в кристаллы льда. Благодаря этому добавки больших концентраций сахаров удлиняют период возможного пребывания клеток неповрежденными в опасной температурной зоне до нескольких десятков секунд, в то время как без сахаров охлаждение крови в этой зоне должно происходить в доли секунд для получения интактных клеток.

Мы испытали также роль добавления в растворы увеличенных концентраций коллоидных препаратов — полиглюкина (молекулярный вес 60 000—90 000), поливинилпирролидона (молекулярный вес 15 000—25 000). Эффект от добавления указанных коллоидных препаратов, также основанный на связывании свободной воды, получают путем уменьшения количества образующейся массы льда, поэтому концентрация растворенных веществ в межклеточных каналах, где размещаются эритроциты, не достигает степеней, вредных для мембраны. Известно также, что коллоиды, благодаря адсорбции на поверхности клеток, защищают легко повреждаемую мембрану эритроцитов.

Однако мы пока не отметили их лучшего защитного действия по сравнению с углеводами. Необходимо продолжение исследований подобными веществами. Нельзя также оставить без внимания требования безопасности введения в организм этих высокомолекулярных веществ, смешанных с кровью, поскольку они могут комплексоваться с протеинами плазмы. Физиологическое значение этой реакции комплексообразования подлежит углубленному изучению, и применение их в качестве добавок к замораживаемой крови еще не может быть рекомендовано для широкой клинической практики.

Таким образом, для клинического применения наиболее проверенными и безвредными препаратами пока остаются сахара. Эффективность добавки в замораживаемую кровь каждого из применяемых сахаров отмечалась в наших опытах с неизменностью, но наилучшие

показатели восстановления эритроцитов после замораживания (до 93—95%) наблюдались при совместном применении глюкозы и сахарозы или лактозы (рис. 3).

Кроме того, на восстановление эритроцитов оказывают влияние, с одной стороны, объем замораживаемой

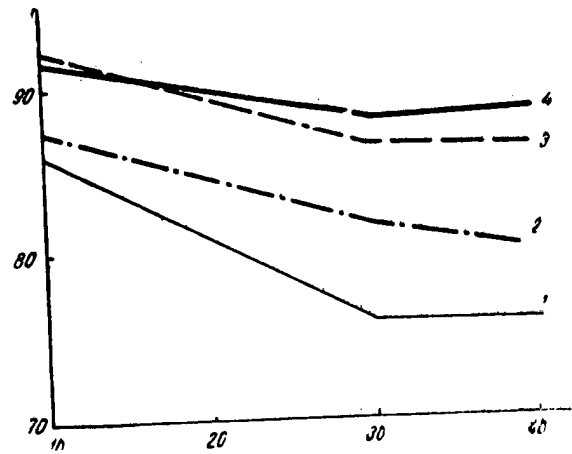


Рис. 3. Значение добавления углеводов.

На оси абсцисс — объемы крови (в мл); на оси ординат — процент восстановления эритроцитов: 1 — раствор № 11; 2 — раствор № 11 и лактоза; 3 — раствор № 11 и глюкоза; 4 — раствор № 11 с лактозой и глюкозой.

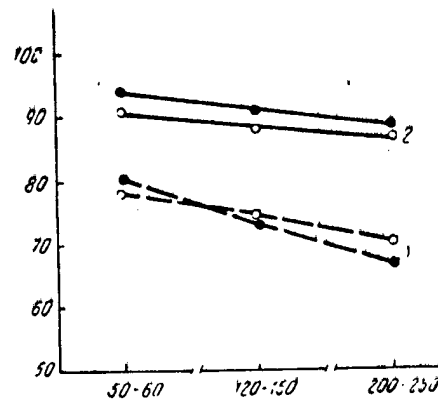


Рис. 4. Значение добавления к раствору № 11₂ небольших (5—6%) количеств глицерина.

На оси абсцисс — объемы (в мл); на оси ординат — процент восстановления эритроцитов: 1 — раствор № 11; 2 — раствор № 11; кружки — эритроцитная масса; точки — кровь.

Так как в оттаянной крови обычно имеется примесь свободного гемоглобина и стром, что служит противопоказанием для переливания больным, мы считаем пока нецелесообразным подвергать замораживанию цельную кровь. Лучше хранить в замороженном состоянии для применения в клинике эритроцитную массу, в которой имеется в тех же объемах вдвое большее количество клеток, тем самым можно рационально утилизировать остающиеся после заготовки плазмы эритроциты.

устойчивости эритроцитов к воздействию холода у разных доноров. Это влияние можно нивелировать добавкой в раствор, помимо сахаров, небольшого количества глицерина — до 6% (раствор № 11₃). Это целесообразно делать при замораживании эритроцитной массы, остающейся после отделения плазмы. На рис. 4 приводятся результаты опыта с кровью и эритроцитной массой одного и того же донора, на рис. 5 — результаты многих опытов по замораживанию эритроцитной массы (на растворах № 11₂ и 11₃) от разных доноров. Добавка такого небольшого количества глицерина не

требует после оттаивания эритроцитов последующей длительной обработки для извлечения глицерина из клеток после удаления надстоя. Из рисунков видно, что основная масса клеток после сверхбыстрого замораживания и оттаивания эритроцитной массы остается неповрежденной. При замораживании цельной крови в тех же больших объемах мы получали почти аналогичные данные.

В табл. 3 приводятся данные о восстановлении эритроцитов после замораживания и оттаивания различных объемов эритроцитной массы и цельной крови с ограждающим раствором № 11₃.

Полученные нами показатели восстановления эритроцитов при сверхбыстром замораживании в контейнере близки к опубликованным другими авторами [48, 56].

Морфологические свойства, а также физиологическая полноценность эритроцитов, подвергавшихся замораживанию и оттаиванию, мало изменяются.

Экспериментальные трансфузии размороженных эритроцитов дали хорошие результаты. Перед переливанием жидкую часть, содержащую гипертонический раствор № 11₃, небольшую примесь свободно-

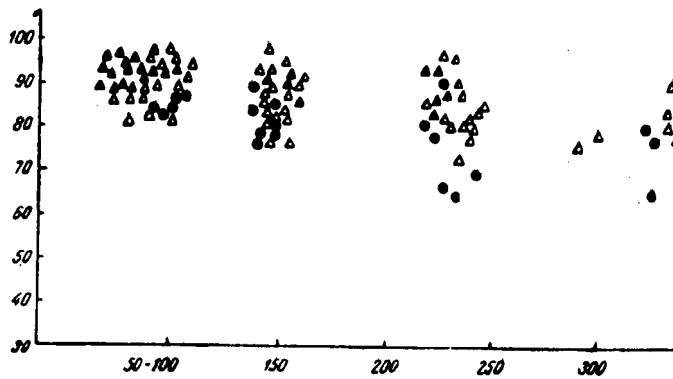


Рис. 5. Восстановление эритроцитов при разных объемах эритроцитной массы.

На оси абсцисс — объемы (в мл); на оси ординат — процент восстановления эритроцитов; кружки — раствор № 11₂; треугольники — раствор № 11₃.

го гемоглобина и стром, снимают. Для этого эритроцитную массу предварительно разбавляют серией растворов (цитрат-лактозо-солевых) различной осмотической концентрации, однократно центрифуги-

Таблица 3
Восстановление эритроцитов (в %) после замораживания (средние данные 160 опытов)

Среда	Объем (в мл)		
	75—100	150—200	200—300
Эритроцитная масса	91	88	86
Цельная кровь	93	92	87

руют, надстой удаляют и замещают (до нормального гематокритного объема) изотоническим сахарозо-солевым раствором или гомологичной плазмой. После такой обработки эритроциты становятся осмотически стабильными для введения в кровеносное русло.

Для клинического применения разработан метод подготовки эритроцитов, позволяющий производить быстро с соблюдением стерильности их обработку при отсутствии аппарата для фракционирования крови. Мы пользуемся для этой цели сдвоенными пластикатными мешками, из которых после центрифугирования можно асептично закрытым способом отделить надстой и добавить плазмозаменяющий раствор. В этом растворе эритроцитную взвесь можно несколько дней хранить в пригодном для переливания состоянии при 4—6°.

На рис. 6 дана схема асептической подготовки к переливанию размороженных эритроцитов и указана последовательность проводимых этапов.

Таким образом, приведенный в настоящем сообщении материал показывает возможность решения практической задачи сверхбыстрого

замораживания больших объемов эритроцитной массы и крови для долгосрочного хранения.

С этой целью было разработано несколько конструкций алюминиевых контейнеров с оптимальными геометрическими параметрами, в которых кровь при погружении в азот замерзает в течение 1—2 минут. Разработаны также специальные ограждающие растворы как для цельной крови, так и для эритроцитной массы. Обеспечение стерильности и физиологической полноценности решает вопрос их пригодности для клинического применения.

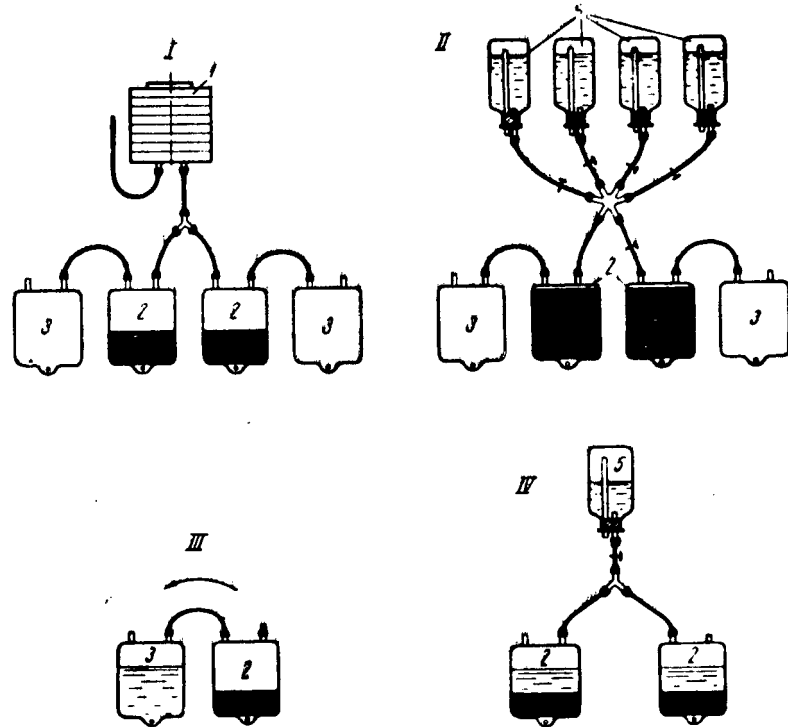


Рис. 6. Схема асептической подготовки размороженной крови.
 I — закрытый перевод размороженной взвеси из контейнера в пластиковые мешки; II — последовательное добавление к эритроцитной взвеси разбавляющих растворов; III — перевод закрытым способом надстоя в свободный мешок после центрифугирования; IV — добавление к эритроцитам плазмозамещающего раствора; 1 — контейнер с кровью; 2 — мешки с кровью; 3 — пустые мешки, предназначенные для закрытого отделения жидкости от эритроцитов после центрифугирования; 4 — разбавляющие растворы; 5 — плазмозамещающий раствор.

Мы не касаемся в данном сообщении практического осуществления долгосрочного хранения замороженной крови и клинического применения такой крови. Эти вопросы явятся предметом отдельных сообщений. Укажем лишь, что успешное проведение процессов быстрого замораживания обеспечивает решение только половины поставленной перед нами задачи. Чтобы избежать повреждения клеток при дальнейшем хранении от возможной рекристаллизации, необходимо хранить замороженные эритроциты также при сверхнизких температурах. Мы наблюдали, что хранение крови при температурах, близких к -196° (в жидком азоте), почти не влечет за собой дальнейших повреждений эритроцитов. Об этом свидетельствуют и теоретические предпосылки.

В настоящее время требуется разрешение технических проблем по созданию специального оборудования для долгосрочного хранения крови в замороженном состоянии при сверхнизких температурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков А. Д. Тезисы докл. 30-го пленума Ученого совета Центрального ин-та гематологии и переливания крови. М., 1952, стр. 4.—2. Он же. В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. М., 1955, в. 31, стр. 46.—3. Он же. Пробл. гематол., 1956, № 1, стр. 35.—4. Он же. В кн.: Актуальные вопросы переливания крови. Л., 1957, в. 5, стр. 51.—5. Он же. Вестн. хир., 1958, № 10, стр. 11.—6. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Каухчишвили Э. И. и др. Тезисы докл. 35-го пленума Ученого совета Центрального ин-та гематологии и переливания крови. М., 1956, стр. 51.—7. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. и др. Пробл. гематол., 1958, № 1, стр. 27.—8. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. и др. В кн.: Достижения и задачи в производстве и применении холода в народном хозяйстве. М., 1960, стр. 338.—9. Виноград-Финкель Ф. Р. Тезисы докл. 38-го пленума Центрального ин-та гематологии и переливания крови. М., 1959, стр. 37.—10. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. В кн.: Актуальные вопросы переливания крови. Л., 1959, в. 7, стр. 87.—11. Виноград-Финкель Ф. Р., Разумова Л. Л., Кудряшова С. Н. Биогематология. 1960, т. 5, в. 2, стр. 229.—12. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. World Refrigeration, 1960, v. 11, p. 65.—13. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. и др. Proceedings 8th congress Europ. Soc. Haematology. Basel, 1962, p. 533.—14. Виноград-Финкель Ф. Р. IX congress Internat. Soc. Blood Transfusion. Abstracts, p. 26.—15. Гинзбург Ф. Г. Тезисы докл. 38-го пленума Ученого совета Центрального ин-та гематологии и переливания крови. М., 1959, стр. 39.—16. Граевский Э. Я. Исследования по глубокому охлаждению протоплазмы. Дисс. докт. Л., 1946.—17. Граевский Э. Я. Успехи совр. биол., 1948, т. 25, в. 2, стр. 185.—18. Калабухов Н. И. Там же, 1958, в. 2/5, стр. 217.—19. Каухчишвили Э. И. Тезисы докл. 38-го пленума Ученого совета Центрального ин-та гематологии и переливания крови. М., 1959, стр. 40—41.—20. Каухчишвили Э. И., Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г. и др. В кн.: Достижения и задачи в производстве и применении холода в народном хозяйстве. М., 1960, стр. 341.—21. Киселев А. Е. В кн.: V congress International de transfusion Sanguine. Paris, 1955, p. 779.—22. Лозина-Лозинский Л. К. Известия Естеств. научного ин-та им. Лесгафта, 1952, т. 25, № 1, стр. 3.—23. Лозина-Лозинский Л. К. В кн.: Достижения и задачи в производстве и в применении холода в народном хозяйстве. М., 1960, стр. 332.—24. Покровский П. И. В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. М., 1952, в. 26, стр. 143.—25. Покровский П. И., Винокурова Г. П. Там же, 1953, в. 28, стр. 75.—26. Разумова Л. Л., Кудряшова С. Н. Тезисы докл. 38-го пленума Ученого совета Центрального ин-та гематологии и переливания крови. М., 1959, стр. 41.—27. Федорова Л. И. Там же, стр. 42.—28. Федорова Л. И. Консервирование крови при температурах ниже 0°C. Дисс. канд. М., 1960.—29. Федоров И. И. и др. В кн.: Механизмы патологических реакций. Л., 1945, в. 7—8, стр. 122; 136.—30. Bricka M., Bessis M., C. R. Soc. Biol., 1953, v. 149, p. 875.—31. Haynes L. L., Tullis J. L., Pyle H. M., J.A.M.A., 1960, v. 173, p. 1657.—32. Huggins C. E., IX Congress of the International Soc. of Blood Transfusion. Abstracts, p. 25.—33. Ketchel M. M., Tullis J. L. et al., J.A.M.A., 1958, v. 168, p. 404.—34. Genenio P. M., Luyet B. J. В кн.: Proceedings of the 6th Congress of the International Society of Blood Transfusion. Basel, 1958, p. 330.—35. Lovelock J. E., Biochim. biophys. Acta, 1953, v. 10, p. 414.—36. Lovelock J. E., Proc. roy. Soc. B., 1957, v. 147, p. 427.—37. Lovelock J. E., Bishop M. W. H., Nature, 1959, v. 183, p. 1394.—38. Luyet B. J., Biodynamica, 1949, v. 6, p. 207.—39. Luyet B. J., Proc. roy. Soc. B., 1957, v. 147, p. 434.—40. Meryman H. T., Kafig E., Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1955, v. 90, p. 587.—41. Meryman H. T., Hollingsworth J. W. В кн.: Proceedings of the 6th Congress of the International Society of Blood Transfusion. Basel, 1958, p. 317.—42. Meryman H. T., Proc. roy. Soc. B., 1957, v. 147, p. 452.—43. Mollison P. L., Sloviter H. A., Lancet, 1952, v. 2, p. 501.—44. Mollison P. L. В кн.: 5 congrès International de transfusion sanguine. Paris, 1955, p. 759.—45. Jones N. C. H., Mollison P. L., Robinson M. A., Proc. roy. Soc. B., 1957, v. 147, p. 476.—46. Parkes A. S., Proc. roy. Soc. B., 1957, v. 147, p. 424.—47. Pyle H. M., Haynes L. L., et al., IX congress Internat. Soc. of Blood Transfusion. Abstracts, p. 22.—48. Rinfret A. P., Doebbler G. F., Cowley C. W., Proceedings 8th Congress of the International Society of Blood Transfusion. Basel, 1962, p. 439.—49. Rinfret A. P., Cowley C. W., Doebbler G. F. et al., IX congress. Intern. Soc. of Blood Transf. Abstracts. 1962, p. 27.—50. Sloviter H. A., Ravdin R. G. В кн.: Proceedings 7th Congress of the International Society of Blood Transfusion. Basel, 1958, p. 70.—51. Sloviter H. A., Am. J. med. Sci., 1956, v. 231, p. 437.—52. Smith A. U., Lancet, 1950, v. 2, p. 910.—53. Idem, Nature, 1958, v. 182, p. 911.—54. Sproul M. T., Sloom M. H., Papers in Dedication P. H. Andersen Birthday Published by Munkgaard. Copenhagen, 1957.—55. Strumia M. M., Colwell L. S., Strumia P. V. В кн.: Proceedings of the 8th Congress of the Inter-

Новая книга

Л. Г. Лайта. ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОТОПОВ В ГЕМАТОЛОГИИ.
Перев. с англ.

Автор --- один из основоположников применения изотопов в медицине. В систематизированной, монографической форме он излагает современные вопросы использования радиоактивных изотопов для целей диагностики различных болезней крови и научных исследований по разным проблемам гематологии и переливания крови.

Если учесть, что в литературе до настоящего времени имелись лишь отдельные статьи, посвященные использованию изотопов в гематологии, то данную монографию следует признать уникальной.

Большое, если не основное, внимание уделено автором описанию методик использования изотопов в клинических условиях, что придает работе особую ценность.

Несмотря на то что и по названию, и по содержанию книга отражает применение изотопов в гематологии, она представляет интерес и для других специальностей медицинской науки, как, например, биохимия, физиология, гистология, клиника внутренних болезней и хирургия. Имеется в виду применение изложенных методик для исследования обменных процессов, механизма действия трансфузий препаратов крови, жизнеспособности и пролиферативной активности различных клеточных категорий, для оценки функционального состояния гемопоэза при различных заболеваниях, определений объема циркулирующей крови, изменений сосудистой проницаемости и др.

Цена книги 24 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО КНИГИ НЕ ВЫСЫЛАЕТ

МЕДГИЗ

30 коп.

70708

Новая книга

Л. Л. Шепуто. ВОПРОСЫ ДИАЛЕКТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛИЗМА И МЕДИЦИНА.

В работе освещаются отдельные проблемы теоретической и практической медицины в свете научной методологии диалектического материализма: марксистская философия и медицина, философские вопросы теории, патологии и диагноза (о современных теориях патологии; чувственная сторона процесса познания в диагностике — анамнез и первичное обследование, абстрактное мышление в процессе диагностики, роль практики в процессе познания болезни).

Книга рассчитана на практических врачей, аспирантов и научных работников и может быть использована как учебный материал при проведении занятий по диалектическому материализму.

Цена 76 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО КНИГИ НЕ ВЫСЫЛАЕТ

МЕДИЗ

STAT

Problemy Gematologii i Perelivaniya ~~Krovi~~
(Problems of Hematology and Blood Transfusion)
Vol. 5, (entire issue pp. 3-16) 1963

[Inside cover is a notice to subscribers about subscriptions]

USE OF DEEP-FREEZING FOR THE PROLONGED PRESERVATION OF BLOOD IN THE
FROZEN STATE

By: Prof. F. R. Viograd-Finke, Assoc. Prof., A. E. Kiselev,
F. G. Ginzburg, L. I. Federova, E. I. Kaukhchishvili

Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Order of Lenin
(Director, Assoc. Prof. A. E. Kiselev), Ministry of Health
of the USSR

At the present time the development of methods for preserving blood in the frozen state occupies a central place in the field of blood conservation. For many years living cells, erythrocytes in particular, could not be maintained following freezing and thawing. The great practical importance of this problem lies in the fact that owing to the complete suppression of metabolism at subzero temperatures it is possible to keep the cell viable for long periods (many months and even years). This cannot be accomplished at positive temperatures.

The advances made in this field open up, even now, great possibilities for a significant extension of the period over which blood can be preserved. It has been established that erythrocytes that were kept (in glycerol) in the frozen state for a period of many months and even several years, after thawing remain basically intact and retain their physiological properties [31,47].

-2-

When work on this problem was begun small quantities of blood were frozen, and the authors proposed this method for the prolonged storage of standard erythrocytes necessary for determining rare blood groups [30,44].

In a number of papers it was pointed out [31,47] that this method makes it possible to preserve blood of rare groups for long periods for transfusion or for preparing heparinized blood in advance for extra-corporeal circulation.

It is also thought that prolonged preservation of blood at sub-zero temperatures becomes of very great importance in creating blood reserves in special conditions [49,50,57].

We believe that the preservation of blood in a frozen state should gain wide use in the practical work of blood service institutions. In the first place, this is necessary for use in transfusions of erythrocytes remaining after the preparation of dry plasma, the period of storage of which at $4-6^{\circ}$ is limited only to 3-4 weeks. Under these circumstances it was possible to preserve blood of rare groups and Rh-negative blood.

I. I. Fedorov and Smith [29,52] were the first to report that it is possible to freeze and thaw erythrocytes without considerable impairment to them. Several authors have reported the use of erythrocytes for transfusion after storage of several months at -10 , -20° [2,3,5-7,21,27,28,43,44]; there are also data on the freezing of blood cells without damage to them for periods of several years [31,47].

Advances in the field of blood preservation by freezing have substantially aided modern biology in the study of the stability of living cells and other biological objects (up to the level of entire organisms) to the action of cold. This new branch of biology is

-3-

called cryobiology. Cells and tissues have been found to exhibit a great variety of reactions to the action of cold and it was found that negative temperatures as low as -195° do not bring about death of cells and tissues under certain conditions. Following such a high degree of cooling they remain viable, they "take" in transplants, and exhibit growth in tissue cultures. In addition, significant advances have been made in tests with deep freezing and revival following warming of entire animal organisms. These experiments include the freezing of insects and other living organisms at temperatures down to -190° [18,22,23]. In 1957 Smith and associates [46,53] showed that hamsters frozen for an hour at -5° , survive following warming by means of diathermy and artificial respiration and they completely regain their function. In connection with this it was noted that only those animals survive in which the conversion of water to ice crystals did not exceed 50% of the total amount of fluid in the organism. Rabbits and certain primates (galago crassicaudatus) did not endure such freezing: in spite of the restoration of cardiac activity and voluntary movements immediately following warming, the animals died soon thereafter. This indicates that it is more difficult to reach compatibility of the life of an organism with a considerable degree of freezing of water, than to preserve the viability of isolated cells and tissues under these conditions.

These results necessitated the review of many previously dominant concepts in the scientific literature on the boundaries of life and the problem of anabiosis, the causes of the damaging action of deep freezing, and on the basis of this it became necessary to study the conditions under which it is possible to maintain the viability of frozen live cells.

-4-

It was found possible to protect erythrocytes from destruction only after studying the causes of the injurious action of the freezing process. In this respect there were numerous investigations of the biochemical and biophysical changes occurring in cells and the nature of the crystallization of water in blood subjected to various degrees of cooling [11,24,26,35,39,42]. The majority of investigators believe that the damage to erythrocytes is the result of two phenomena: the trauma by ice crystals and the effect of hyperconcentrated salt solutions formed intra-cellularly and extra-cellularly in the remaining living substance upon conversion of water to ice. Under these conditions erythrocytes undergo progressive dehydration along with an increase in the osmotic gradient between their internal medium and their external medium.

Lovelock [36] observed the denaturation of lipoprotein complexes in the presence of hyper-concentrated salt solutions. He also found that in addition to gross damage during the period of growth of ice crystals, freezing also destroys the molecular bonds in the living cells and most of all in membranes. In a medium with a high ionic strength obtained by increasing the salt concentration, the binding components of the phospholipids of the cell membrane are weakened which results in increased permeability and swelling. Upon transfer of such a cell back into a physiological medium, a slow lysis sets in upon thawing.

Other not yet known factors may also play a role in the destruction of cells, such as the damage to enzymatic and other active systems of living cells [46], but the dominant reason is the extreme extraction of water during the process of crystal formation. It has been established experimentally [38,55] that crystallization and, consequently,

-5-

its harmful action is observed most of all in the -3 - -40° zone. For this reason this temperature range is called critical or dangerous. The period during which the frozen erythrocytes are in this zone in an environment of hyper-concentrated salt solution affects their stability. Luyet [38] showed that when the critical temperature zone is passed over in a period of several milliseconds no lethal effect is found: he succeeded in preserving the morphology of erythrocytes by very rapid freezing of blood in a thin layer (on a metal plate) at -196° . When this period becomes longer, for example, when cooling a large amount of blood under the same conditions, without using protective substances the majority of erythrocytes are destroyed. The period that the cell spends in the critical zone is equally important during the thawing of the blood.

These biophysical data served as the basis of the now-proven position that the rates of freezing and thawing play an important role in preserving the integrity of erythrocytes, the water phase of which is present primarily in the free state and is readily transformed to ice crystals upon cooling.

It was found that slow freezing is accompanied by extra-cellular formation of large ice crystals which do not necessarily rupture the cells owing to their position in the canals between the crystalline lattice of the forming ice. But the resulting dehydration and concentration of salts have a more powerful destructive effect on the cell than the extracellular crystals. By using substances that strongly bind water it is possible to prevent its transformation into ice crystals or to interfere with their growth in size. On the other hand, rapid freezing leads to the formation of very fine crystals and is not accompanied by a large extraction of water from the solution and does not render it hyper-concentrated. Therefore, in trying to avoid factors that result in

-6-

damage the investigators directed their efforts toward both binding the free water by adding various substances to the blood, such as glycerol, sugars, colloidal substances, and ethyl alcohol, as well as toward increasing the rate of cooling and thawing.

The various modern approaches to the solution of the problem of prolonged preservation of blood by freezing have also been based on the above theoretical premises.

In the USSR attempts have been made to preserve blood at negative temperatures without the formation of crystals - in the liquid state. The preserving solutions with protecting substances proposed especially for this purpose make it possible to preserve blood at temperatures of -80° and somewhat lower in the liquid state without hemolysis, so that it remains suitable for transfusion on the average for 100 days [1,3,4,7,9,21].

However, it was not possible to preserve blood in the liquid phase without hemolysis for longer periods. Preservation of blood for many months or even years necessitates complete suppression of metabolism in the cells and cooling to a complete solidification.

At the present time two concepts are being widely used in the solution of the problem of the storage of blood in the solid frozen state. One of these is the preservation of erythrocytes with high concentrations of glycerol (up to 50%) at moderately low temperatures [-80° , -120°]. This so-called slow freezing, developed about ten years ago, has been subjected to detailed experimental studies and it has been widely discussed in the literature [31,43,45,47,51,57]. Clinical experience with the use of such blood is accumulating.

-6-

In recent years [32,37] they began to study the use of dimethylsulfoxide which is similar to glycerol in terms of the mechanism of its protective action. The protective action of glycerol on the cell lies in preventing the formation of large ice crystals outside or within the cells owing to its especially strong ability to bind free water and to penetrate into erythrocytes. In this manner, glycerol lowers the degree of hyper-concentration of salts and makes it possible to extend the period that erythrocytes can exist in the dangerous temperature zone without damage to them. Therefore, the cells can be frozen slowly in the presence of glycerol. Thus a flask or plastic bag with 500 ml. of a mixture of erythrocytes and glycerol placed in a refrigerator reaches this temperature (-80°) only after seven hours [31]. This method makes it possible to preserve the frozen erythrocytes for many months with insignificant (from 2 to 10%) damage to them following thawing. However, this method is not yet readily accessible for clinical use due to the cumbersome nature of the extraction of high concentrations of glycerol causing sharply expressed hypertonia in the cells and due to the need for special apparatus [45].

For the treatment under sterile conditions of glycerolized blood with several solutions of successively decreasing concentrations of glycerol and salts there have been built in the U.S.A. costly and very inefficient fractionators, the so-called Cohn centrifuges [31,33]. Even with these fractionators the washing out of glycerol takes a great deal of time. The defrosted erythrocytes cannot be transfused without washing out the glycerol, because upon transferring them into the isotonic medium of the blood stream they are rapidly destroyed. During the

-2-

washing out procedure an additional loss of a certain portion of the erythrocytes occurs as a result of their lysis. According to recent data [57] the loss of erythrocytes following their storage with glycerol and washing amounts on the average to about 20%.

The other concept is the super-highspeed cooling (requiring not more than several minutes) to ultra-low temperatures without using glycerol.

At this rate of cooling the time spent by blood in the unfavorable critical temperature zone is greatly reduced, i.e., conditions are created under which the period of transition of the erythrocytes through the dangerous temperature zone will be less than that necessary for damage to occur to the cells in this zone. This method is more promising and it does not require the lengthy treatment of blood after thawing, since in the protective solutions that are also required in this method one can do without glycerol.

This method directed at obtaining crystal-free freezing as a result of high rates of cooling has been used as the basis of the method of preserving blood at negative temperatures worked out recently at the Central Institute of Hematology and Blood Transfusion.

Rapid freezing of blood is favored by a number of American authors [40,41,48,49,55,58]. These authors, as well as the authors of this paper, used high concentrations of carbohydrates and colloids in the protective solutions. Working along the line of replating in these solutions glycerol which is impractical to use, by other water-binding substances, we have been using the above substances right from the start of the studies on the freezing of blood [6,8, 10,12,14].

-8-

We are presenting below our experience in connection with the use of deep-freezing in the ultra-highspeed freezing of blood, its long-term storage and subsequent clinical use. We have worked on the problem of rapid freezing of such quantities of blood that are practically applicable to blood transfusion (250-500 ml.). The possibility of preserving erythrocytes in an intact condition, after rapid freezing in liquid nitrogen of minute quantities of blood (around 0.2 ml.), was noted by Luyet as early as 1949 [38]. Later it was confirmed by other authors [25], and also in studies in connection with the spraying of blood into liquid nitrogen [12,19,40,41]. However, in connection with obtaining undamaged erythrocytes with rapid freezing of large volumes of blood required in transfusion, it was necessary to search for other conditions for achieving rapid cooling. Simultaneously it was necessary to develop more effective solutions for protecting the frozen cells from destruction.

It would be undoubtedly efficient to achieve such a rapid cooling of blood which completely excludes the formation of crystals and results in glassy solidification, i.e., vitrification [16,17,34]. It is thought theoretically possible to achieve vitrification by spraying very small blood droplets directly into liquid nitrogen (at -196°) since the result is instantaneous cooling (up to 100 per second). It is also thought that by storing the vitrified blood at the same temperature it is possible to preserve it without recrystallization for an indefinitely long period, i.e., without damage to the cells (rapid thawing is again/necessary condition). The experiments we carried out in this direction [12,20] showed that the spraying of blood directly into liquid nitrogen can serve as one of the ways of

-9-

vitriifying large amounts of blood. However, such an open freezing and thawing (by immersion of blood granules into a warm physiological solution) does not guarantee the sterility of the blood destined for transfusion purposes. Therefore, the problem was to work out a method of super-highspeed freezing of blood placed in a closed vessel. The latter must maintain the sterility of the blood upon contact of the container with the cooling and the regenerating media.

Going to the closed method of freezing in a container posed new problems, the major one being the creation of conditions for the rapid elimination of heat from the container containing the blood. The difficulty lay in the fact that the cooling of large amounts of blood proceeds at a much slower rate than the cooling of blood droplets.

In working out a method of super-highspeed freezing of blood placed in the container, we took into account the following factors affecting the rate of elimination of heat: 1) material of which the container is made, 2) boiling point and other properties of the cooling medium, 3) geometric shape of the container and thickness of the water layer (these factors were related to the ratio of the external surface of the container to the volume of blood), 4) the properties of substances used in the protective solutions, 5) the varying stability of blood to the action of low temperatures.

The first four conditions are constant, but the last one does, as a rule, depend on the peculiar properties of the blood of the donor.

This frequently explains the variations in the results obtained following recovery of frozen blood, as noted by many authors.

-10-

After testing various materials we selected aluminum, and made aluminum containers of different capacities keeping in mind the importance of geometric parameters that promote the elimination of heat.

In testing these containers we judged the advantages offered by them through the degree of recovery of erythrocytes subjected to freezing in them, using as a criterion for this the extent of hemolysis determined in a definite sample of thawed and centrifuged blood. The freezing was brought about by immersing the container with the blood, mixed half and half with the protective solution, liquid nitrogen. Solidification of the blood was completed in 1-3 minutes, depending on the volume of blood and the shape of the container. In thawing, the container was rapidly transferred to a water bath at 43-45°. The period of thawing of the blood corresponded approximately to the period of freezing.

The following is a discussion of the mechanism of elimination of heat with rapid freezing of the blood in conjunction with different components added and the selection of the container.

At the moment of immersion of the container in liquid nitrogen, intensive elimination of heat is taking place from the surface of the container containing the blood and there begins a warming up of the adjacent layers of nitrogen, as a result of which nitrogen begins to undergo violent boiling. Observations indicate that bubbles of nitrogen gas arising on the walls of the container rapidly increase in volume, break away and float to the surface of the liquid nitrogen; new particles of liquid nitrogen occupy the place freed in this manner and come into contact with the container. This process is repeated until the temperatures of the nitrogen and the container are equalized. ~~At this~~

-11-

At this time the process of elimination of heat is completed thereby serving as an indication of the completion of the process of freezing. Under these conditions the cooling medium is not liquid nitrogen any more but a peculiar gas-liquid mixture which considerably impairs the conditions of the elimination of heat. Nevertheless, the use of liquid nitrogen remains the single convenient method of achieving rapid freezing of blood.

During freezing, the heat directed from the central layer of the object (blood) overcomes the thermal resistance of the following elements: a) a layer of liquid blood, b) frozen layers of blood, c) walls of the container, d) gas-liquid mixture. Therefore, in selecting the optimal container from a number of containers tested an important role is played by the determination of the coefficient of heat transfer (K).

The numerical significance of this factor may be demonstrated by using the well-known heat transfer equation

$$Q_1 = K \cdot F \cdot \Delta t \quad (1)$$

where Q - amount of heat transferred per unit time; F - surface of heat transfer (readily determined in experiments); Δt - difference between the temperature of blood and the cooling medium (a known quantity). The only factor that affects the value of Q is the coefficient of heat transfer, K .

The amount of heat (Q) that is to be removed can be determined from the equation

$$Q = G[C_1 \cdot (t_1 - t_2) + WWR + C_2(t_2 - t_3)] \quad (2)$$

where G - weight of blood sample (in kg.); C_1 - specific heat of non-frozen blood (in kcal/kg °C); C_2 - specific heat in frozen blood (in kcal/kg. °C); t_1 - initial temperature of blood; t_2 - temperature at the

-12-

beginning of freezing of blood; t_3 - final temperature of frozen blood; W - weight of ice in a kilogram of frozen water (in kg/kg); R - latent heat of ice formation (in kcal/kg.).

By substituting the value obtained for Q from equation (2) and all the remaining terms into equation (1), one can determine K , i.e., the overall coefficient of heat transfer (kcal/m² °C per hour).

However, in selecting the shape of the container not only the determination of the overall coefficient of heat transfer is important, but also that of the value of the coefficient of ^{heat} emission (α_2) from the wall of the container to the liquid nitrogen (since the intensity of movement of the nitrogen gas-liquid mixture depends on the shape of the container). This coefficient can be determined using the value of K calculated above from the following formula (in the case of a flat-walled container)

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_1}{\lambda_1} + \frac{\delta_2}{\lambda_2} + \frac{1}{\alpha_2}} \quad (3)$$

where α_1 - coefficient of heat transfer from liquid to frozen blood; δ_1 - total thickness of frozen layers (measured from the center of the cross section of the container to the periphery); λ_1 - coefficient of thermal conductivity of the frozen layers of blood; δ_2 - wall thickness of container; λ_2 - coefficient of thermal conductivity of the container; α_2 - coefficient of heat emission from the wall of the container to the liquid nitrogen. From here

$$\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_1}{\lambda_1} + \frac{\delta_2}{\lambda_2} + \frac{1}{\alpha_2} = \frac{1}{K} \quad \text{or} \quad \frac{1}{\alpha_2} = \frac{1}{K} - \frac{1}{\alpha_1} - \frac{\delta_1}{\lambda_1} - \frac{\delta_2}{\lambda_2}$$

-13-

Therefore,

$$\alpha_2 = \frac{1}{\frac{1}{K} - \frac{1}{\alpha_1} - \frac{\delta_1}{\lambda_2} - \frac{\delta_2}{\lambda_2}}$$

kcal/m²°C per hour [4]. From the values obtained for K or α_2 for the containers tested, we chose those that provided the highest values for these coefficients. From the containers selected in this manner the best results in the recovery of erythrocytes following freezing and thawing were obtained with containers with a built-up surface in which the ratio of surfaces of elimination of heat to the volume of frozen blood ($\frac{S}{V}$) was the highest. These may be cylindrical, tubular, or flat rectangular vessels (Fig. 1).

In numerous experiments we established that rapid freezing of blood in containers with a built-up surface was always accompanied by a considerably better recovery of erythrocytes after thawing than freezing in smooth containers (Tables 1 and 2)

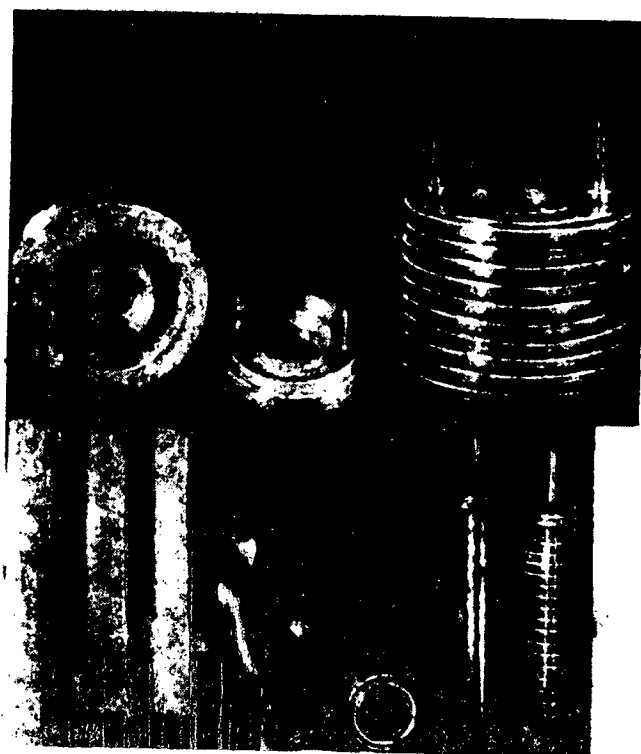


Figure 1 - Aluminum blood-c

-14-

It is seen from Table 1 that in the majority of cases in freezing small amounts of blood (up to 40 ml.) in containers with a built-up surface (we used corrugated surfaces in our studies), independent of the shape of the container, its cross section, and the volume of blood, the percentage recovery of erythrocytes was high (from 90 to 95% after thawing blood in solutions No. 11₂ and 11₃. In the same

Table 1

INFLUENCE OF THE SURFACE ON THE RECOVERY OF ERYTHROCYTES
(in %) FOLLOWING FREEZING

Container	Volume of blood frozen (in ml.)	Solution no. 11 ₁		Solution No. 11 ₂		Solution No. 11 ₃	
		Surface					
		Built-up	Smooth	Built-up	Smooth	Built-up	Smooth
Circular container	30	88	65	90	70	92	81
"	30	84	65	91	68	92	76
"	30	82	70			90	83
"	30	81	62			93	72
Tube	15	94	81	93	53	93	78
"	15	88	77	95	60	92	78
"	15	93	70	95	62		
"	40	91	45	87	35	92	40
"	40			90	40		

containers with smooth surfaces the percentage recovery of erythrocytes was most frequently 60-78% and even lower.

-15-

Table 2

REGENERATION OF ERYTHROCYTES FROZEN IN CONTAINERS WITH A BUILT-UP SURFACE AT DIFFERENT VALUES OF THE $\frac{S}{V}$ RATIO

Container		Volume in ml.	Calculat- ed value of $\frac{S}{V}$	Regeneration of erythro- cytes (in %)	
Shape	Gage size (in mm.) (thickness) of frozen layer			Solution Number	
				11 ₁	11 ₂
Corrugated tube	10	10	4.2	92	92.5
"	10	10	4.2	94	92.5
"	10	10	4.2	93	92.5
Circular corrugated cylinder	2	100	2.8	91	94
"	2	100	2.8	90	91
"	2	100	2.8	86	93
"	2	100	2.8	87	90
"	2	30	2.6	93	91
"	2	30	2.6	92	88
"	2	30	2.6	88	88
"	2	30	2.6	84	88

This difference in the amount of regenerated erythrocytes was regularly observed in all our tests (Fig. 2).

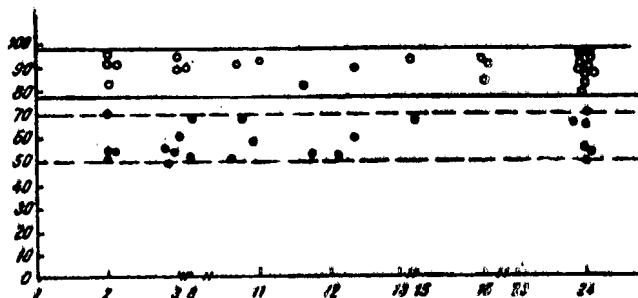


Figure 2. Importance of corrugated surface of container. Hollow circles - corrugated surface; dark circles - smooth. Ordinates: per cent recovery of erythrocytes; abscissas - period of exposure (in hours) to preserving solution No. 11₂ and 11₃ (Volume 150-200 ml.).

-16-

In Table 2 there are presented data that favor containers with a large calculated value of the ratio of the surface of elimination of heat to the volume of frozen blood, i.e., $\frac{S}{V}$ since the elimination of heat from the frozen blood proceeds at a greater rate in them.

In order to adapt the method to the requirements of practice (blood volumes used in clinical work, simplicity, convenience of freezing and storage) we made a study of the optimal value of the cross section and size of the container. A comparison of various cross sections with the same form and capacity of the container showed the best results are obtained in a container of 2 mm. cross section, since it provides for a faster elimination of heat.

Thus in experiments using blood from the same donor in a 100 ml. container with a 2 mm. cross section the percent recovery of erythrocytes was 87-94. In a container of the same capacity with a 5 mm. cross section only 62-87% of the erythrocytes were recovered (in the first case blood froze in 25 seconds, in the second in 45 seconds). However, in order to make a convenient container with a large capacity (300-500 ml.) it was necessary to increase the cross section of the container to 15-20 mm. which resulted in an increase in the thickness of the layer to be frozen and consequently in a decrease in the rate of cooling of the blood. This frequently resulted in a reduction of the percent recovery of erythrocytes. Therefore, measures were taken to improve the technique of freezing and thawing. These included the stirring of the blood (swinging or shaking of the container) upon immersion in the nitrogen and especially in the water bath. This

-17-

speeds up the emission of heat since the blood is divided inside the container into thinner films stratified onto the layers near the wall during freezing. This measure did result in a certain improvement but a more significant influence is exerted on the preservation of cells in the case of freezing a thick layer of blood by the nature and amount of substances added to the blood for protecting the cells.

For the super-highspeed freezing of large volumes of blood we used various versions of solutions worked out on the basis of the composition of solution No. 11 which we proposed earlier for spraying blood into liquid nitrogen [20]. This solution included glucose (final concentration 4%), one of the disaccharides—sucrose, lactose (final concentration 2%), or mannitol, colloids (dextran or albumin), sodium citrate (0.4%), and sodium bromide (0.1%). The improvement of the solution involved an increase in the concentration of the carbohydrates (solution No. 11). A higher content of sugars, glucose and especially disaccharides (sucrose, lactose), not permeating the erythrocytes and binding water in the extra-cellular space, prevents the transformation of water to ice crystals. Accordingly, the addition of large concentrations of sugars extends the period, that the cells may spend in the dangerous temperature zone without injury, to several tens of seconds, at the same time that without sugars the cooling of blood in this zone must occur in a fraction of a second in order to obtain intact cells.

We also studied the effect of the addition to the solution of increased concentrations of colloidal preparations - dextran (molecular weight 60,000-90,000), polyvinylpyrrolidone (molecular weight 15,000-25,000). The effect of the addition of these colloidal preparations,

-18-

also based on binding free water, is the result of reducing the amount of ice formed, therefore the concentration of the dissolved substances in the tiny channels between the ice crystals where the erythrocytes are located does not reach levels that are harmful to the membrane. It is also known that colloids, due to adsorption on the surface of the cells, protect the readily permeable membrane of the erythrocytes.

However, we have not yet established whether their protective action is better than that of the carbohydrates. It is necessary to continue the investigations using similar substances. One should also make mention of the requirement that the introduction into the organism of these high molecular weight substances mixed with blood has to be harmless, inasmuch as they may form complexes with plasma proteins. The physiological significance of the complex formation is the subject of detailed study, and their use as an additive to frozen blood cannot as yet be recommended for large-scale clinical practice.

Therefore sugars still remain the most proven and harmless preparations for clinical use. The effectiveness of the addition to frozen blood of each of the sugars used has been invariably observed in our experiments, but the optimal indices of recovery of erythrocytes following freezing (up to 93-95%) were obtained by combined use of glucose and sucrose or lactose (Fig. 3).

In addition, the regeneration of erythrocytes is influenced on the one hand by the volume of frozen blood, and on the other by the

-19-

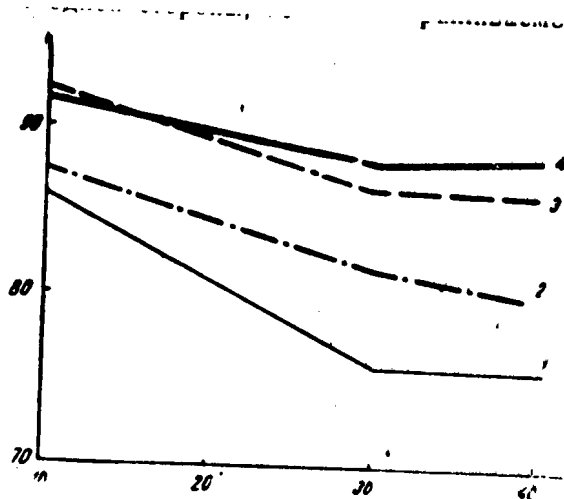


Рис. 3. Значение добавления углеводов.
 На оси абсцисс -- объемы крови (в мл); на оси ординат -- процент восстановления эритроцитов: 1 -- раствор № 11₂; 2 -- раствор № 11₁ и лактоза; 3 -- раствор № 11₁ и глюкоза; 4 -- раствор № 11₂ с лактозой и глюкозой.

Figure 3 - Importance of adding carbohydrates
 Abscissas = volume of blood (in ml.);
 ordinates - per cent recovery of erythrocytes;
 1 - solution No. 11₂; 2 - solution No. 11₁ and
 lactose; 3 - solution No. 11₁ and glucose;
 4 - solution No. 11₂ with lactose and glucose.

difference in the stability of the erythrocytes to the action of cold in different donors. This influence could be equalized by the addition to the solution, outside of sugars, of a small amount of glycerol, up to 6% (solution No. 11). This can best be done upon freezing the erythrocytes remaining after separation of the plasma. In Figure 4 there are shown the results of an experiment using the blood and erythrocytes of the same donor, and in Figure 5 the results of many tests of freezing the erythrocytes (in solutions No. 11₂ and 11₃) of various donors. The addition of such a small amount of glycerol does not necessitate, after thawing of the erythrocytes, subsequent lengthy treatment in order to remove glycerol from the cells after removal of the sample (?).

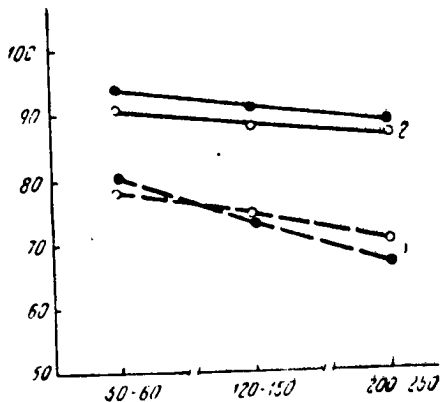


Рис. 4. Значение добавления к раствору № 11₂ небольших (5-6%) количеств глицерина.
 На оси абсцисс - объемы (в мл); на оси ординат - процент восстановления эритроцитов: 1 - раствор № 11₃; 2 - раствор № 11₂; кружки - эритроцитная масса; точки - кровь.

Figure 4 - Importance of addition to solution No. 11₂ of small amounts (5-6%) of glycerol.

Abscissas - volumes (in ml.); ordinates - per cent recovery of erythrocytes; 1 - solution No. 11₃; 2 - solution No. 11₂; circles - erythrocytes; dots - blood.

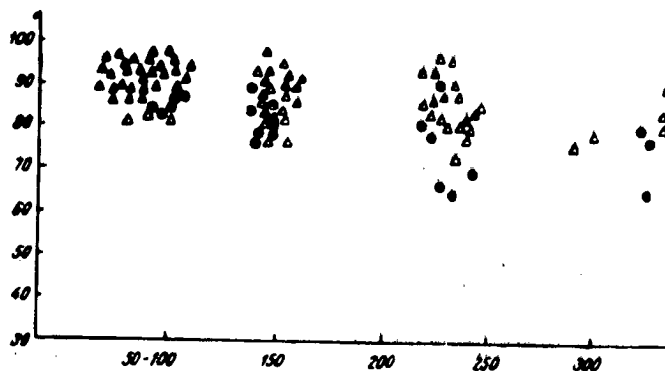


Рис. 5. Восстановление эритроцитов при разных объемах эритроцитной массы.
 На оси абсцисс - объемы (в мл); на оси ординат - процент восстановления эритроцитов; кружки - раствор № 11₂; треугольники - раствор № 11₃.

Figure 5 - Recovery of erythrocytes using different volumes of erythrocytes.

Abscissas - volume (in ml.); ordinates - per cent recovery of erythrocytes; circles - solution No. 11₂; triangles - solution No. 11₃.

-21-

These figures indicate that following ultra-highspeed freezing and thawing of erythrocytes, the main portion of the cells remains unharmed. Nearly analogous data were obtained by freezing whole blood in the same large volumes.

In Table 3 there are given data on the recovery of erythrocytes following freezing and thawing of different volumes of erythrocytes and whole blood with protecting solution No. 11₃.

The indices of recovery of erythrocytes we obtained with super-high-speed freezing in a container are close to those published by other authors [48, 56].

Since in defrosted blood there is usually a mixture of free hemoglobin and stroma which is a contraindication for transfusion, we believe that for the time being it is not advisable to subject whole blood to freezing. It is better to store erythrocytes in the frozen state for clinical use which contains twice the number of cells in the same volume, whereby it is possible to use erythrocytes left over after the preparation of plasma.

The morphological properties and the physiological integrity of erythrocytes subjected to freezing and thawing underwent little change.

Experimental transfusions of defrosted erythrocytes gave good results. Before transfusion of the liquid portion containing hypertonic solution No. 11₃, the small impurity of free hemoglobin and stroma are removed. For this reason the erythrocytes are previously diluted with a series of solutions (citrate-lactose-salt) of different osmotic concentrations, they are centrifuged once, the sample (?) is removed and replaced (to the normal hematocrit volume) by an iso-osmotic

-22-

sucrose-salt solution or by homologous plasma. After such treatment erythrocytes become osmotically stable for introduction into the blood stream.

Table 3

RECOVERY OF ERYTHROCYTES (IN PER CENT) AFTER FREEZING (AVERAGE OF 160 EXPERIMENTS)

Medium	Volume in ml.		
	75-100	150-200	200-300
Erythrocytes	91	88	86
Whole blood	93	92	87

For clinical use we worked out a method of preparing erythrocytes that makes their rapid and sterile treatment possible without the need for a blood-fractionating apparatus. For this purpose we use double plastic bags, from which, after centrifuging, it is possible to aseptically separate the sample (?) by the closed method and to add the plasma-replacing solution. In this solution the erythrocyte suspension can be stored for several days in a state suitable for transfusion at 4-6°.

In Figure 6 there is shown the scheme of the aseptic preparation for transfusion of defrosted erythrocytes, showing the sequence of the various stages.

This material presented in this paper indicates that it is possible to solve the practical problem of the super-highspeed freezing of large volumes of erythrocytes and blood for prolonged storage.

To achieve this we built several aluminum containers having optimal geometric parameters, in which, when immersed in nitrogen, blood freezes in 1-2 minutes. We also developed special protective solutions for whole blood as well as for erythrocytes. Securing the

-23-

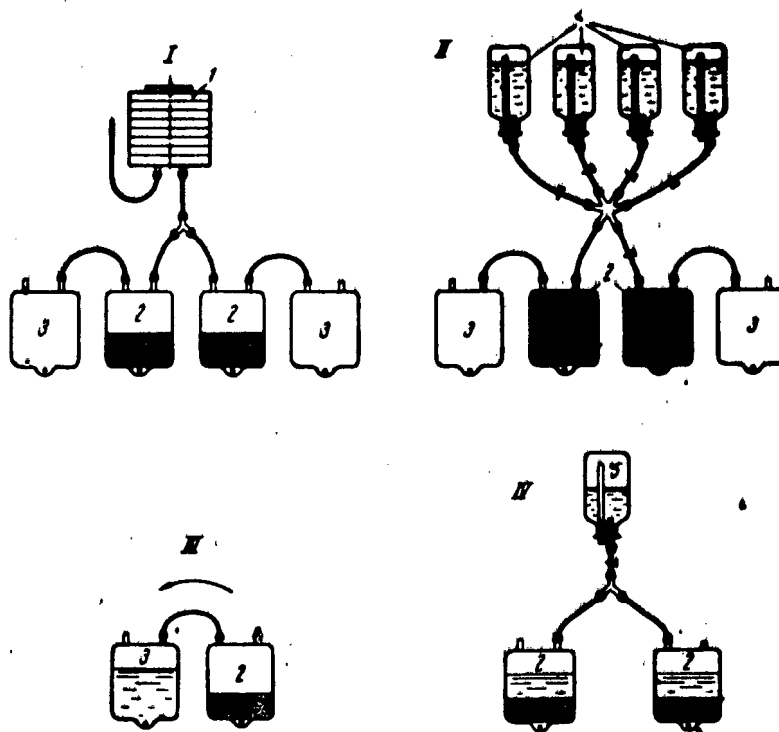


Рис. 6. Схема асептической подготовки размороженной крови.
 I - закрытый перевод размороженной взвеси из контейнера в пластиковые мешки; II - последовательное добавление к эритроцитной взвеси разбавляющих растворов; III - перевод закрытым способом надстоя в свободный мешок после центрифугирования; IV - добавление к эритроцитам плазмозамещающего раствора: 1 - контейнер с кровью; 2 - мешки с кровью; 3 - пустые мешки, предназначенные для закрытого отделения жидкости от эритроцитов после центрифугирования; 4 - разбавляющие растворы; 5 - плазмозамещающий раствор.

Figure 6 - Scheme of aseptic preparation of defrosted blood.

I - closed transfer of defrosted suspension from container to plastic bags; II - successive addition to the erythrocyte suspension of diluting solutions; III - closed transfer of sample (?) to the free bag after centrifuging; IV - addition to the erythrocytes of plasma-replacing solution: 1 - container with blood; 2 - bag with blood; 3 - empty bags for closed separation of liquid from erythrocytes after centrifuging; 4 - diluting solution; 5 - plasma-replacing solution.

-24-

sterility and the physiological competency makes these suitable for clinical use.

In this paper we have not discussed the practical realization of prolonged storage of frozen blood and the clinical use of this blood. These problems are the subject of separate reports. We wish to note only that the successful conducting of processes or rapid freezing solves only half of the problem facing us. In order to avoid damage to the cells during prolonged storage as a result of possible recrystallization, it is also necessary to store frozen erythrocytes at ultra-low temperatures. We observed that the storage of blood at temperatures near -196° (in liquid nitrogen) involves almost no further harm to erythrocytes. This is also indicated by theoretical considerations.

At the present time it is necessary to solve the technical problems related to building special equipment for the prolonged storage of blood in the frozen state at ultra-low temperatures.

REFERENCES

1. A. D. Belyakov, Reports to the Thirtieth Plenum of the Scientific Council of the Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, M., 1955, p. 4.
2. A. D. Belyakov, Current Problems in Hematology and Blood Transfusion. M., 1955, No. 31, p. 46.
3. A. D. Belyakov, Probl. Gematol., 1956, No. 1, p. 35.
4. A. D. Belyakov, Current Problems in Blood Transfusion. L., 1957, No. 5, p. 51.
5. A. D. Belyakov, Vestn. Khir., 1958, No. 10, p. 11.
6. F. R. Vinograd-Finkel, F. G. Ginzburg, E. I. Kaukhchishvili, et al., Reports to the Thirty-fifth Plenum of the Scientific Council of the Central Institute of Hematology and Blood Transfusion M., 1956, p. 1

-25-

7. F. R. Vinograd-Finkel, F. G. Ginzburg, L. I. Federova, et al., Probl. Dermatol., 1958, No. 1, p. 27.
8. F. R. Vinograd-Finkel, F. G. Ginzburg, L. I. Federova, et al., Advances and Problems in the Production and Use of Refrigeration in the National Economy, M., 1960, p. 338.
9. F. R. Vinograd-Finkel, Reports to the Thirtieth Plenum of the Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, M. 1959, p. 37.
10. F. R. Vinograd-Finkel, F. G. Ginzburg, L. I. Federova, Current Problems in Blood Transfusion, L., 1959, No. 7, p. 87.
11. F. R. Vinograd-Finkel, L. L. Razumova, S. H. Kudryashova, Biofizika, 1960, Vol. 5, No. 2, p. 229.
12. F. R. Vinograd-Finkel, F. G. Ginzburg, L. I. Federov, World Refrigeration, 1960, V. 11, p. 65.
13. F. R. Vinograd-Finkel, F. G. Ginzburg, L. I. Federov, Proceedings 8th Congress Europ. Soc. Hematology, Basel, 1962, p. 533.
14. F. R. Vinograd-Finkel, IX Congress International Soc. Blood Transfusion, Abstracts, p. 26.
15. F. G. Ginzburg, Reports to the Thirty-eighth Plenum of the Scientific Council of the Institute of Hematology and Blood Transfusion, M., 1959, p. 39.
16. E. Ya. Graevskii, An Investigation of the Deep Cooling of Protoplasm. Doctoral Dissertation, L. 1946.
17. E. Ya. Graevskii, Uspekhi Sovr. biol., 1948, Vol. 25, No. 2, p. 185.
18. N. I. Kalabukhov, ibid., 1958, No. 2/5, p. 217.
19. E. I. Kaukhchishvili, see ref. 15, pp. 40-41.
20. E. I. Kaukhchishvili, F. R. Vinograd-Finkel, F. G. Ginzburg, et al., Advances and Problems in the Production and Use of Refrigeration in the National Economy, M., 1960, p. 341.
21. A. E. Kiselev, Vth Congress International de transfusion Sanguine, Paris, 1955, p. 779.
22. L. K. Lozina-Lozinskii, Izvestia Estestv. Nauchnogo in-ta im. Lesgafta, 1952, Vol. 25, No. 1, p. 3.
23. L. K. Lozina-Lozinskii, Advances and Problems in the Production and Use of Refrigeration in the National Economy, M., 1960, p. 332.

24. P. I. Pokrovskii, Current Problems in Hematology and Blood Transfusion. M., 1952, No. 26, p. 143.
25. P. I. Pokrovskii, G. P. Vinokurova, *ibid.*, 1953, No. 28, p. 75.
26. L. L. Razumova, S. N. Kudriashova, Reports to the Thirty-eighth Plenum of the Scientific Council of the Central Institute of Hematology and Blood Transfusion. M., 1959, p. 41.
27. L. I. Fedorova, *ibid.*, p. 42.
28. L. I. Fedorova, Conservation of Blood at Temperatures Below 0°C. Cand. Dis., M., 1960.
29. I. I. Fedorov, *et al.*, Mechanism of Pathological Reactions., L., 1945, Chapter 7-8, p. 122, 136.
30. M. Bricka, Bessis M., C. R. Soc. Biol., 1955, V. 149, p. 875.
31. L. L. Haynes, J. L. Tullis, H. M. Pyle., J.A.M.A., 1960, V. 173, p. 1657.
32. C. E. Huggins, IX Congress of the International Soc. of Blood Transfusion. Abstracts, p. 25.
33. M. M. Ketchel, J. L. Tullis, *et al.*, J.A.M.A., 1958, V. 168, p. 404.
34. P. M. Genenio, B. J. Luyet, Proceedings of the 6th Congress of the International Blood Transfusion, Basel, 1958, p. 330.
35. J. E. Lovelock, Biochim. biophys. Acta, 1953, V. 10, p. 414.
36. J. E. Lovelock, Proc. roy. Soc. B., 1957, V. 147, p. 427.
37. J. E. Lovelock, M. W. H. Bishop, Nature, 1959, V. 183, p. 1394.
38. B. J. Luyet, Biodynamica, 1949, V. 6, p. 207.
39. B. J. Luyet, Proc. roy. Soc. B., 1957, V. 147, p. 434.
40. H. T. Meryman, E. Kafig., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1955, V. 90, p. 587.
41. H. T. Meryman, J. W. Hollingsworth, Proceedings of the 6th Congress of the International Society of Blood Transfusion, Basel, 1958, p. 317.
42. H. T. Meryman, Proc. roy. Soc., B., 1957, V. 147, p. 452.
43. P. L. Mollison, H. A. Sloviter, *Lancet*, 1952, V. 2, p. 501.
44. P. L. Mollison, 5th congrès International de transfusion sanguine, Paris, 1955, p. 759.
45. N. C. H. Jones, P. L. Mollison, M. A. Robinson, Proc. roy. Soc. B., 1957, V. 147, p. 476.

-28-

46. A. S. Parkes, Proc. roy. Soc. B., 1957, V. 147, p. 424.
47. H. M. Pyle, L. L. Haynes, et al., IX congress Internat. Soc. of Blood Transfusion. Abstracts p. 22.
48. A. P. Rinfret, G. F. Doebbler, C. W. Cowley, Proceedings 8th Congress of the International Society of Blood Transfusion. Basel, 1962, p. 439.
49. A. P. Rinfret, C. W. Cowley, G. F. Doebbler, et al., IX congress. Intern. Soc. of Blood Transfusion. Abstracts, 1962, p. 27.
50. H. A. Sloviter, R. G. Ravdin, Proceedings 7th Congress of the International Society of Blood Transfusion, Basal, 1959, p. 70.
51. H. A. Sloviter, Am. J. med. Sci., 1956, V. 231, p. 437.
52. A. U. Smith, Lancet, 1950, V. 2, p. 910.
53. Ibid., Nature, 1958, V. 182, p. 911.
54. M. T. Sproul, M. H. Sloon, Papers in Dedication P. H. Andersen Birthday Published by Munkaard. Copenhagen, 1957.
55. M. M. Strumia, L. S. Colwell, P. V. Strumia, Proceedings of the 8th Congress of the Interantional Society of Blood Transfusion. Basel, 1962, p. 433.
56. M. M. Strumia, P. V. Strumia, L. S. Colvell, et al., IX congress Intern. Soc. Blood Transfusion Abstracts 1962, Mexico, 1962. p. 24.
57. J. B. Tullis, Proceedings of the 7th Congress of the International Society of Blood Transfusion. Basal, 1959, p. 43.
58. J. Tullis, M. T. Sproul, L. L. Haynes, Proceedings of the 8th Congress of the International Society of Blood Transfusion, Basel, 1962, p. 447.

Page Denied