
**КОМБИНИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ
ПРОЦЕДУРЫ ОБРАТИМОГО КРИОСОХРАНЕНИЯ КРУПНЫХ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ ВИТРИФИКАЦИИ**

***Пульвер А.Ю., *Артюхов И.В., **Артюхов В.И., ***Целиковский А.В.,
*Шамаев Н.В., *Пульвер Н.А., *Перегудов А.Г.**

**Институт биологии старения, 125284, Москва, Россия
E-mail: pulver@bioaging.ru*

***Department of Materials Science and NanoEngineering, Rice University, Houston, TX, USA*

****Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко,
Воронеж, Россия*

**COMBINED APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF PROTOCOL
FOR VITRIFICATION OF BULKY BIOLOGICAL OBJECTS**

***Pulver A., *Artyuhov I.V., **Artyukhov V.I., ***Tselikovskiy A.V., *Shamaev N.V., *Pulver N.A., *Peregudov A.**

**Institute of Biology of Aging, Moscow, 125284, Russia. E-mail: pulver@bioaging.ru*

***Department of Materials Science and NanoEngineering, Rice University, Houston, TX, USA
N.N. Burdenko Voronezh State Medical Academy, Voronezh, Russia*

Any means of cryopreservation generally relies upon vitrification, in which cells survive in glass between ice crystals. Proposals of a simultaneous vitrification of entire samples without the formation of ice even predate the discovery of the first cryoprotectants, in 1940s. However, the first practical implementation of vitrification (murine preimplantation embryos) was carried out only in 1985, by Gregory Fahy and William Rall. The present report provides a brief overview of different glass types resulting from liquids in a living system converting into the glassy state at low temperatures, as well as the potential benefits of vitrification for long-term large-sized biological objects preservation. We specify the main outstanding obstacles for the implementation of bulky biological objects vitrification, as well as ways proposed by various researchers to solve some of them.

One of those obstacles is the toxicity of extremely high cryoprotectant concentration (up to 60 % v/w) required for vitrification. That's why we turned our attention to xenon (Xe). The main prospective benefit of using Xe as a cryoprotectant is its absolute nontoxicity on tissue and cellular level, while even the most low-toxic cryoprotectants (such as glycerol, ethylene glycol etc.) are potentially dangerous due to osmotic effects. In order to assess the cryoprotective potential of Xe we have conducted two series of experiments – with yeast (*S. cerevisidae*) and mammalian (CHO-K1 and NIH-3T3) cell cultures in custom-built bronze miniature hyperbaric chambers.

Yeast survival in presence of Xe at all tested pressures appeared to be much better than in control experiments and approximately equal or slightly better than with 5% DMSO or glycerol; in experiments with joint application of Xe and DMSO or glycerol results have been even better. But in case of mammalian cells convincing results have been achieved only in experiments with the fastest cooling achievable.

Molecular dynamics simulations of Xe clathrate hydrate and ice crystal growth indicate vitrification of water inside cells under combined application of Xe and DMSO/glycerol as a possible explanation of the results observed (details are described in our report “Possible Mechanisms of Cryoprotective Effect of Xenon”).

Based on this hypothesis we offer approaches to both cooling (combined use of traditional cryoprotectants and clathrate forming gases for vitrification, patent applied), and to the subsequent heating (uniform heating of complex biological objects by means of electric and magnetic fields' phased emitters, guided by MRI thermometry, patent pending – discussed in yet another corresponding report at this conference), providing the theoretical background for the successful cryopreservation of bulky biological objects. And eventually – up to individual organs and whole organisms.

In addition, we offer some suggestions for improving the efficiency of gas perfusion for chilling procedure, and application of frequency and width-pulse electromagnetic field modulation within the initial stages of cooling.

Выживание клеток при криоконсервации любым способом в подавляющем большинстве случаев происходит за счет так называемой витрификации внутриклеточного содержимого. Внутриклеточный лед – как правило, смерть клетки. Даже при программном медленном замораживании клетки оказываются в окружении незамерзшей жидкости между растущими кристаллами льда [Mazur 1984]. В процессе заморозки в остающейся жидкости повышается концентрация растворенных веществ, что вызывает соответствующее повышение их концентрации и внутри клеток. В конечном счете, вне- и внутриклеточная концентрация становится настолько высокой, что оставшаяся вода уже не может замерзнуть. Дальнейшее охлаждение, в конце концов, и приводит к стеклованию клеток вместе с окружающей жидкостью, иначе называемому витрификацией.

Витрификация – процесс, при котором во время охлаждения жидкость переходит в твердую фазу (точнее, приобретает большинство свойств твердого вещества) без какого-либо существенного изменения в расположении молекул или термодинамических параметрах состояния. В частности – отсутствует кристаллизация с сопутствующим ей выделением тепла и увеличением объема. Помимо витрификации отдельных клеток в небольшом количестве жидкости, остающейся при замораживании между кристаллами льда, можно создавать условия, при которых образец одномоментно витрифицируется целиком. Предположения о возможности создания условий, при которых образец одномоментно витрифицируется целиком без присутствия льда, делались еще в сороковых годах XX века [Luyet 1937], до открытия первых криопротекторов [Polge, Smith et al. 1949]. Однако на практике витрификация впервые была осуществлена только в 1985 г. Грегори Фэем и Вильямом Раллом – для предимплантационных мышинных эмбрионов, слишком капризных для обычного программного замораживания [Rall, Fahy 1985].

При кристаллизации вода вытесняет растворенные в ней вещества в еще не замерзшую жидкость, понижая тем самым температуру ее кристаллизации. Из-за увеличения своей концентрации растворенные вещества (особенно электролиты) в непосредственном окружении клеток, как правило, становятся слишком токсичными для выживания последних. Подобные условия выдерживают только некоторые группы организмов (преимущественно, прокариоты), в процессе эволюции специально приспособившиеся к гибернации в подобных условиях [Wilson 2003; Тимофеев 2005].

Выживание же всех прочих обеспечивается добавлением различных видов криопротекторов перед замораживанием. Криопротекторы уменьшают количество льда, должного образоваться для прекращения заморозки оставшейся жидкости и уменьшают внутриклеточное содержание воды. Проникающие криопротекторы, замещая собою внутриклеточную воду, за счет восстановления осмотического равновесия уменьшают опасность осмотического шока в крайне гипертонических внешних условиях [Pegg 2007]. В дискурсе же витрификации – важнейшей функцией криопротекторов является повышение вязкости жидкости при охлаждении.

Главным условием наступления витрификации при охлаждении является увеличение вязкости жидкости до 10^{13} П. На молекулярном уровне это выражается в прекращении вращательных и поступательных степеней свободы молекул, с сохранением только лишь колебательных, что приводит к понижению теплоемкости и коэффициента теплового расширения [Wowk 2010].

Критическая скорость охлаждения, позволяющая витрифицировать чистую воду, должна быть не менее 10^7 град/мин [Armitage 1991]. Криопротекторы же понижают скорость охлаждения, необходимую для витрификации, обратно пропорционально своей концентрации в охлаждаемом растворе. Замедляя ее до величин, вполне доступных для современной техники.

Температура стеклования (T_g) растворов криопротекторов, используемых в современной криобиологии, обычно имеет диапазон от -110°C до -130°C .

Из-за потери подвижности молекул жидкость, превращаясь в стекло, сильно отклоняется от состояния термодинамического равновесия, в стремлении к достижению которого при температурах ниже T_g , несмотря на практически полное отсутствие диффузии, за счет остаточной молекулярной подвижности в стекле начинают идти процессы достижения равновесного состояния. Происходит релаксация сдвиговых напряжений с постепенным его уплотнением и выделением тепла. Причем перед моментом витрификации переохлажденный раствор ведет себя скорее не как жидкость, а как полимерный гель, и в зависимости от скорости охлаждения свойства (в частности, плотность и объем) образующегося стекла получают различными [Mazur 2010; Wowk 2010].

Все это диктует крайне жесткие требования к скоростям согревания – как правило, считается, что во избежание девитрификации скорость его должна быть как минимум в три раза быстрее критической скорости охлаждения, а порою и существенно выше [Hopkins, Badeau et al. 2012]. Такие же жесткие и даже противоречивые условия предъявляются к транспортировке и температуре хранения макроскопических образцов. Хранение их при температуре жидкого азота (LN_2) или неосторожные манипуляции при перемещении могут приводить к растрескиванию, в то время как хранение при температуре чуть ниже (вплоть до 15 град) T_g – к формированию наноразмерных кристаллов льда из-за латеральной диффузии молекул воды. При последующем разогреве это в разы увеличивает критическую скорость согревания.

Вопрос об оптимальной температуре хранения макроскопических образцов также пока еще остается открытым.

Если для криоконсервации отдельных клеток вполне достаточно традиционного замо-

раживания, а для несколько более капризных эмбрионов разработаны различные протоколы криоконсервации для разных стадий развития: зиготы, формирования пронуклеусов, периода дробления, бластоцисты [Isachenko, Alabart et al. 2003], то в случае с объектами макроскопических размеров исследователи столкнулись с рядом иных проблем. Самые главные из них:

- a. Токсичность криопротекторов при высоких (до 60% w/v и более) концентрациях.
- b. Неравномерность распределения криопротекторов в паренхиме органа.
- c. Неравномерность охлаждения (наличие температурных градиентов).
- d. Недостаточная скорость охлаждения.
- e. Растрескивание при хранении ниже T_g .
- f. Возникновение сайтов нуклеации при около- T_g температурах.
- g. Неравномерность согревания (температурные градиенты, локальные перегревы).
- h. Девитрификация при согревании органа из-за ее недостаточной скорости.
- i. Реперфузионный синдром по окончании согревания.

И каждый решает их, как может. Подробный обзор всего спектра исследований требует отдельной статьи – даже, скорее, монографии, и выходит за пределы тематики данной работы. Тем более что особых успехов никто пока так и не добился – разве что с 1996 г. научились витрифицировать кровеносные сосуды. Дальше всех продвинулись на ниве витрификации в компании «21 Century Medicine» во главе с Грегори Фэем и Брайаном Вовком. В 2005 г. они сообщили о случае успешной витрификации почки кролика, функционировавшей при возврате хозяину после согревания в течение девяти дней [Fahy, Wowk, et al. 2009].

В принципе, Фэй с коллегами справились с пунктами “a”, “d” “g” и “i”, до пункта “e” просто не дошли, а вот с пунктами “b” и/или “c”, а также “g” и/или “f” и/или “h” – не справились. Именно поэтому успешное функционирование пересаженной почки в отдаленном периоде до

сих пор является единичным наблюдением, воспроизвести которое не удалось. Отметим особо, что все неудачи тем или иным образом связаны в первую очередь с согреванием, равномерность которого одновременно с высокой скоростью в случае крупного биологического объекта сочетать крайне трудно.

Возможных способов ускоренного согревания макроскопических биологических объектов – три: диэлектрическое согревание [Wusteman, Robinson et al. 2004], сосудистая перфузия органов хладагентами, остающимися жидкими при криогенных температурах, и газовая перфузия [Schimmel, G. Wajcner et al. 1964; Bickis & Henderson 1966; Hamilton, Holst et al. 1973]. В настоящее время газовой перфузией начала заниматься американская компания Arigos [Van Sickle & Jones 2014].

Использование ВЧ и СВЧ приводит к крайне неравномерному согреванию.

Охлаждать непосредственно растворами криопротекторов до криогенных температур затруднительно, так как с понижением температуры их вязкость прогрессивно возрастает, при перфузии увеличивается периферическое сосудистое сопротивление. В результате скорость перфузии падает. И, соответственно, падает скорость охлаждения. Начиная с определенного момента, не имея возможности проходить по сосудам микроциркулярного русла, хладагенты начинают «шунтироваться», проходя по крупным сосудистым аркадам. Из-за этого теплообмен дополнительно ослабляется даже при сохраняющейся перфузии, и охлаждение становится неравномерным. С дальнейшим повышением вязкости жидкости перфузия либо вообще останавливается, либо происходят разрывы в паренхиме.

Жидкие хладагенты на основе перфторуглеродов тоже полностью не решают проблемы достаточной скорости охлаждения в силу тех же причин, хотя и при существенно более низких температурах. Также наличествует проблема жидкостной (перфторуглероды нерастворимы в воде) эмболии при замене водных растворов криопротекторов на хладагент.

Газы же, несмотря на несравнимую с жидкими хладагентами теплоемкость, обладают вязкостью на два-три порядка меньшей, и свободно проходят по сосудистому руслу даже при криогенных температурах, позволяя как охлаждать, так и согревать органы. Самым популярным в этой области является гелий, в силу самой низкой температуры превращения в жидкость и высочайшей диффузионной подвижности.

Конечно, у газовой персуфляции имеются свои недостатки:

- низкая теплоемкость, заставляющая использовать повышенное давление для ускорения прохождения газов сквозь паренхиму, что может привести к баротравме;
- газовая эмболия – особенно на этапе согревания, когда газовый хладагент сменяется на жидкий;
- «высушивание» эндотелия и прилегающих к нему участках тканей.

С учетом всего вышеизложенного для достижения обратимой витрификации изолированных органов, пригодных после хранения и согревания к трансплантации (а в перспективе – вплоть до целых организмов), необходимо:

1. Использовать газовые криопротекторы. Причем не просто так, а довольно хитрым способом. Первоначально мы обратили свое внимание на ксенон, как потенциальный газовый криопротектор, перспективы использования которого являются весьма заманчивыми, но до сих пор нереализованными [Prehoda 1969; Rodin, Isangalin et al. 1984; Shcherbakov, Tel'pukhov et al. 2004; Sheleg, Nixon et al. 2008], из-за его абсолютной нетоксичности, в то время как даже самые малотоксичные криопротекторы (такие как глицерин и этиленгликоль) потенциально опасны своими гиперосмотическими эффектами.

Для оценки криопротективного потенциала ксенона мы провели две серии экспериментов – с культурами клеток дрожжей (*S. cerevisidae*) и млекопитающих (CHO-K1 и NIH-3T3) в ми-

ниатюрных бронзовых барокамерах нашей собственной конструкции [Пульвер, Целиковский с соавт., 2014]. Выживаемость дрожжей при всех опробованных парциальных давлениях ксенона (от 2,5 до 11 атм) оказалась выше, и даже лучше, чем при использовании конвенциональных (5% ДМСО или глицерин) криопротекторов; при совместном применении ксенона и ДМСО обнаружались признаки аддитивного криопротекторного действия.

Однако в экспериментах по программному замораживанию суспензий культуральных клеток млекопитающих при парциальных давлениях ксенона от 2,5 до 11 атм во время согревания происходило полное разрушение клеток. Даже после разработки сложного протокола декомпрессии удалось добиться только выживания клеток только в присутствии ДМСО. Контрольные же эксперименты с высокими скоростями охлаждения (максимально быстрое охлаждение от 0°C до –196°C путем погружения барокамеры в жидкий азот) с 7 атм ксенона неожиданно показали клеточную выживаемость $22,5 \pm 13,4\%$.

Для интерпретации результатов экспериментов мы прибегли к помощи коллег, проведя математическое моделирование молекулярной динамики фазовых переходов в водных растворах ксенона (подробнее в отдельном докладе) [V. Artyukhov, Pulver et al. 2014; Пульвер, Целиковский с соавт., 2014], позволившее получить не только предположительное объяснение механизмов наблюдаемых нами явлений, но и сформулировать теоретические предпосылки для успешной витрификации крупных биологических объектов, в перспективе – вплоть до отдельных органов и целых организмов. Главным для нас явилось заключение, что «гидрофобная сольватация ксенона в воде с понижением температуры возрастает быстрее, чем термостабильность клатратного гидрата» [V. Artyukhov, Pulver et al. 2014]. В результате должно получиться, что химические криопротекторы, являясь подавителями образования кристаллических гидратов (которое, по на-

шим данным, не намного менее опасно, чем кристаллы льда), на этапе охлаждения будут позволять насыщать жидкость газом до существенного повышения ее вязкости (опять же, по нашим данным моделирования взаимодействия ксенона с водой при низких температурах). Это позволит достигать витрификации с использованием куда меньшего количества химических криопротекторов. Нами подана заявка на патент.

Подобное сочетание различных криопротекторов, нейтрализующих негативные эффекты друг друга, применялось в исследовании [Fahy, Wowk et al. 1994], позволившем, помимо сочетания повышения концентрации криопротекторов при уменьшении температуры (чем ниже температура, тем ниже оказывается токсичность) совместно применять диметилсульфоксид с амидами (формаид, ацетаид, N-метилформаид и т. д.) в присутствии этиленгликоля, нейтрализующие токсичность друг друга.

2. Второй важнейший этап – разработать собственную методику принципиально нового подхода к равномерному согреванию разноструктурных биологических объектов при помощи фазированных излучателей электрического и магнитного полей посредством их фокусировки под контролем ЯМР-термометрии – также подана заявка на патент, подробнее см. наш доклад «Равномерное согревание разноструктурных...».

А дальше остаются не столь кардинальные, но тоже немаловажные улучшения:

3. Разработать улучшенный раствор-носитель для криопротекторов с упором на кондиционирование органа в предкриоконсервационный период, нейтрализацию активных форм кислорода, активации каскадов апоптоза и в целом реперфузионного синдрома в процессе согревания. В частности, за счет использования:

- различных типов антиоксидантов, в том числе комплексообразователей (антагонистов железа);

- ингибиторов каспаз, сериновых протеаз, матриксных металлопротеиназ, липоксигеназ и т. д.;

- блокаторов различных ионных каналов;

- антагонистов кальция и NMDA-рецепторов;

- особое внимание должно быть уделено применению газообразных органопротекторов – того же ксенона [Ma, Yang et al. 2003] и H₂S [Blackstone, Morrison et al. 2005; Baumgart, Georgieff et al. 2008].

4. Несколько усовершенствовать методику газовой перфузии гелием (или иными газами) для использования ее вместо жидкостной перфузии при температурах, препятствующих свободному прохождению жидких хладагентов по микроциркуляторному руслу. Экспериментальная работа по подбору достаточно эффективных, но при том безопасных, режимов использования персуфляционных хладагентов, будет требовать особой объемности и в то же время кропотливости. Для увеличения эффективности теплообмена имеет смысл применять высокие давления персуфляции в сочетании со звуковыми и ультразвуковыми волнами.

5. Использовать частотную и широтно-импульсную модуляцию (в т. ч. с использованием частотного диапазона ЯМР) для понижения температуры начала применения высоких концентраций витрифицирующих смесей. Не ограничиваясь простой 50 Гц осцилляцией, применяемой в низкотемпературном морозильнике CAS корпорации Абико [Owada, Saito 2010], применение которого в криобиологии [Kaku, Namada et al. 2010; Kawata, Kaku et al. 2010] вызвало ряд закономерных вопросов у Брайана Вовка [Wowk 2012], отметившего, тем не менее, что влияние переменных электромагнитных полей на образование льда посредством нетепловых механизмов является, пожалуй, самым важным прорывом в криобиологии за последние 30 лет.

6. Определить наилучшую температуру хранения витрифицированных по нашей методике

органов (с учетом предполагаемого стабилизирующего эффекта газовых криопротекторов [Артюхов 2014]).

7. На последних же этапах согревания растворенные в перфузате газовые криопротекторы, оставшиеся после декомпрессии, обеспечат дополнительное кондиционирование органа, препятствуя активации сразу нескольких видов каскадов апоптоза, а также развитию реперфузионного синдрома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Armitage W.J.* Preservation of viable tissues for transplantation // B.J. Fuller, B.W.W. Grout (Eds.). *Clinical Applications of Cryobiology* / CRC Press, 1991. P. 169–190.

2. *Artyukhov V.I., Pulver A.Yu., Peregudov A., Artyukhov I.* Can xenon in water inhibit ice growth? Molecular dynamics of phase transitions in water-Xe system // *J. Chem. Phys.* 141, 034503. 2014, doi: 10.1063/1.4887069.

3. *G.M. Fahy, B. Wowk, et al.* Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances // *Cryobiology*, 2004. 48. P.157–178.

4. *Fahy G.M., Wowk B., et al.* Physical and biological aspects of renal vitrification // *Organogenesis*, 2009. 5(3). P.167–75.

5. *Federowicz M.G., Harris S. B. et al.* A method for rapid cooling and warming of bio-logical materials // *United States Patent* 6274,303. 1999.

6. *Bickis I.J., Henderson I.W.D.* Helium Perfusion Technique Advances // *JAMA*, 1966. 197(11). P.36–37.

7. *Hamilton R., Holst H.I. et al.* Successful preservation of canine small intestine by freezing // *J. Surg. Res.* 1973. 14(4). P.313–8.

8. *Hopkins J.B., Badeau R. et al.* Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions // *Cryobiology*, 2012. 65(3). P.169–178.

9. *Isachenko V., Alabart J.L. et al.* New technology for vitrification and field (microscope-free) thawing and transfer of the small ruminant embryos // *Theriogenology*, 2003. 59. P. 1209–1218.

10. *Mazur P.* A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology // *Cryobiology*, 2010. 60(1). P. 4–10.

11. *Mazur P.* Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol.*, 1984. 247. P. C125–C142.

12. Pegg D.E. Principles of cryopreservation // *Methods Mol. Biol.*, 2007. **368**. P. 39–57.
13. Prehoda R.W. *Suspended Animation: The Research Possibility that May Allow Man to Conquer the Limiting Chains of Time*. Chilton Book Company, 1969.
14. Rodin V.V., Isangalin F.S. et al. Structure of protein solutions in a presence of xenon clathrate // *Cryobiology & Cryo-Medicine*. 1984. **14**. P. 3–7.
15. Shcherbakov P.V., Tel'pukhov V.I. et al. Method for Organs and Tissues Cryoconservation *In Situ*. 2004.
16. Sheleg S., Hixon H. et al. Cardiac Mitochondrial Membrane Stability after Deep Hypo-thermia using a Xenon Clathrate Cryostasis Protocol – an Electron Microscopy Study // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2008. **1**(5). P. 440–447.
17. Schimmel H., Wajcner G. et al. Freezing of whole rat and dog kidney by perfusion of liquid nitrogen through the renal artery // *Cryobiology*. 1964. **1**(2). P. 171–5.
18. Van Sickle S., Jones T. Method and apparatus for prevention of thermo-mechanical fracturing in vitrified tissue using rapid cooling and warming by persufflation // *United States Patent 5952,168*. 2014.
19. Wilson P.W., Heneghan A.F. et al., Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation // *Cryobiology*. 2003. **46**(1). P. 88–98.
20. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification // *Cryobiology*. 2010. **60**. P. 11–22.
21. Wusteman M., Robinson M., Pegg D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution // *Cryobiology*. 2004. **48**. P. 179–89.
22. Артюхов И.В. Перспективы создания криопротекторов на основе инертных газов и их смесей // *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии / Материалы Международной заочной научно-практической конференции*. Сыктывкар, 2014. С. 88–94.
23. Пульвер А.Ю., Целиковский А.В., Пульвер Н.А., Артюхов И.В., Перегудов А.Г. Криоконсервация *Saccharomyces cerevisidae* с использованием ксенона. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии // *Материалы Международной заочной научно-практической конференции*. Сыктывкар, 2014. С. 220–226.
24. Пульвер А.Ю., Целиковский А.В., Пульвер Н.А., Артюхов И.В., Перегудов А.Г. Криоконсервация клеточных культур млекопитающих с использованием ксенона // *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии / Материалы Международной заочной научно-практической конференции*. Сыктывкар, 2014. С. 226–233.
25. Тимофеев Н.Н. ГИПОБИОЗ И КРИОБИОЗ. Прошлое, настоящее и будущее // М.: Информ-Знание, 2005.