

Криобласт™ — НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ СВЕРХБЫСТРОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ:

1. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕПРОДУКТИВНОЙ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

И.И.Катков*, В.Ф.Болюх**, Г.Т.Сухих***

*ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, РФ;

**CELLTRONIX, San Diego, California, USA;

***ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова Минздрава России, Москва

Кинетическая (динамическая) витрификация является перспективным направлением в криоконсервации биологических материалов, поскольку позволяет избежать образования летального внутриклеточного льда и сводит к минимуму вредное воздействие высокотоксичных проникающих криопротекторов. При этом практически для любого типа клеток может быть использован единый протокол охлаждения и соответствующая аппаратура. В существующих технологиях скорость охлаждения существенно ограничена эффектом Лейденфроста. Описана новая платформа для кинетической витрификации биологических материалов Криобласт™, реализующая сверхбыстрое криогенное охлаждение, которая позволяет практически полностью устранить эффект Лейденфроста. Это открывает перспективы создания новой технологии криоконсервации клеток в первую очередь для нужд репродуктивной и регенеративной медицины.

Ключевые слова: криоконсервация, криобанки, кинетическая витрификация; эффект Лейденфроста; репродуктивная и регенеративная медицина

Криоконсервация гоноцитов (зародышевой плазмы, germplasm), особенно взрослых гамет и ранних зигот, является ключевым в репродуктивных технологиях человека (клиники фертильности и криобанки спермы и ооцитов), в сельском хозяйстве (центры размножения элитных животных) и в сохранении генетического многообразия дикой природы (“Замороженные зоопарки”) [16,20]. Известно, что клетки не могут долго жить в жидких средах, а крупные кристаллы льда, которые могут образоваться в процессе замораживания внутри клетки, летальны для них [14]. Единственное состояние, в котором скоропортящиеся биологические материалы, особенно клетки, могут храниться в течение практически неограниченного времени — это витрифицированное (стеклообразное) состояние [3,11,12,17]. В этом состоянии вязкость внутриклеточного содержимого и ближайшего внеклеточного окружения в незамерзших каналах настолько высока (обычно принято го-

ворить о вязкости стекла $10^{13.6}$ Па·с), что реакции деградации полностью подавляются.

Витрификация — ключевое условие длительного хранения биологического материала. Известно 5 основных способов достижения витрификации клеток [7]. Наиболее распространенным способом витрификации в криобиологии является медленное, зачастую программируемое, замораживание, когда основная часть внеклеточной воды переходит в лед. При этом внутриклеточная вода выходит наружу, а сильно дегидратированные клетки в конечном итоге витрифицируются в высоко концентрированном “рассоле” (brine) в незамороженных каналах.

Второй широко распространенный способ витрификации обеспечивается специальными добавками-загустителями (витрификационные агенты, витрификанты), проницаемыми для клеток. Эти добавки при очень высоких концентрациях (на порядок выше, чем изотония) делают вязкость внутриклеточной и внеклеточной областей столь высокой, что витрификация может произойти даже при относительно малых скоростях охлаждения

Адрес для корреспонденции: prodvincell@hotmail.com.
Катков И.И.



[5, 19]. Поэтому такой метод полностью свободной от льда витрификации, практически не зависящей после некоторого предельного значения от скорости охлаждения, можно условно назвать эквilibрационной или равновесной витрификацией (РВФ), поскольку лед отсутствует как внутри, так и снаружи клетки. Такие “загустительные” добавки в методе РВФ часто ошибочно называют “криопротекторами” (криопротектирующие агенты — КПА). Однако этот термин применим лишь к медленному охлаждению, в котором КПА выполняют в основном роль осмотического буфера, препятствующего избыточной дегидратации клеток в процессе кристаллизации внутриклеточного льда.

Способ кинетической витрификации (КВФ) требует гораздо меньше добавок-загустителей (или же можно вообще обойтись без них), но многократно более высоких скоростей охлаждения. При этом необязательна полная витрификация внеклеточного содержимого, поскольку условием выживания клеток является внутриклеточная витрификация или, в крайнем случае, образование мелкокристаллического внутриклеточного льда, который нелетален для клеток. Подробно о фундаментальных различиях между РВФ и КВФ описано в работе [7].

Эти три способа витрификации формируют основу для существующих технологий криогенной консервации клеток, аксессуаров (комплектующих) и требуемого оборудования. Способы витрификации при высокой (комнатной) температуре реализуются двумя методами: лиофилизацией (первичная сушка сублимацией льда под высоким вакуумом и вторичная сушка при температуре выше 0°C) и ксероконсервацией (сушка при температуре выше 0°C в течение всего процесса в вакууме, на воздухе или в атмосфере инертного газа). Два последних метода используются для стабилизации вирусов и прокариотических клеток, но не подходят для сохранения эукариотических клеток, поэтому криогенные методы остаются главным направлением биостабилизации зародышевой плазмы клеток.

Медленное замораживание. Первые попытки криоконсервации спермы были по существу КВФ [7], но на раннем этапе развития криобиологии этот метод не обеспечивал высокую стабильность выживаемости биологических образцов. Добавление проникающего криопротектора глицерина позволило значительно улучшить результаты [2, 4, 18]. Глицерин, наряду с другими проникающими КПА, позволил эффективно заморозить сперматозоиды, а затем и другие виды клеток, например клетки крови, при относительно низких скоростях охлаждения. В то же время,

если клетки замораживаются медленно, то длительное воздействие “рассола” концентрированных растворенных веществ убивает их (так называемый “эффект раствора”). Если клетки замораживаются быстрее, чем оптимальная скорость медленного замораживания (но со скоростями охлаждения, недостаточными для КВФ), то образуется внутриклеточный лед, который также убивает клетки.

Двухфакторная гипотеза [15] объясняла феномен существования оптимальной скорости медленного замораживания. Это привело к быстрому развитию методов криоконсервации различных типов клеток, в том числе спермы животных, яйцеклеток и эмбрионов. Тем не менее методы медленного замораживания обладают двумя существенными недостатками. Первым недостатком является то, что оптимальная скорость охлаждения сильно зависит от типа и особенно от размера клеток (точнее от отношения клеточного объема к площади поверхности клетки); она может отличаться на несколько порядков — от нескольких тысяч градусов в минуту для эритроцитов до долей градусов в минуту для ооцитов млекопитающих. Кроме того, оптимальная скорость зависит от проницаемости клеточной мембраны для воды (L_p) и КПА (P_{CPA}) и в меньшей степени — от типа криопротектора *per se*. Таким образом, для любого нового типа клетки оптимальная скорость охлаждения должна определяться как теоретическими, так и экспериментальными исследованиями, которые могут занимать много времени. Вторым недостатком является то, что каждый вид клеток для получения максимальной выживаемости нуждается в сочетании оптимальной скорости замораживания и концентрации КПА. Так, стволовые клетки костного мозга имеют наибольшую выживаемость при скорости охлаждения ~2°C/мин и концентрации КПА 1.25 М, в то время как наибольшая выживаемость бычьих эритроцитов наблюдается при скорости охлаждения 1500°C/мин и концентрации КПА 2.2 М [13]. Кроме того, наиболее эффективный протокол медленной криоконсервации — это сложное многоступенчатое замораживание [10]. Он специфичен для каждого типа клеток и требует дорогостоящих программных замораживателей. При этом весь процесс охлаждения занимает длительное время (зачастую более 1 ч).

Протоколы витрификации — от РВФ к КВФ. Медленное замораживание показало свои ограничения для определенных типов клеток (например, ооцитов). Витрифицирование целой почки кролика с использованием высоких концентраций витрификационных агентов и относительно низкой скорости охлаждения [5] открыло новую эру

в криобиологии. Фактически была применена РВФ, которую условно можно назвать “медленной” по сравнению с существенно более быстрой КВФ. Однако эти скорости значительно выше, чем оптимальные для большинства видов клеток скорости медленного замораживания. В целом можно отметить, что оптимальные скорости охлаждения медленного замораживания варьируют в пределах от долей до сотен градусов в минуту. Для РВФ необходимо охлаждение в сотни-тысячи градусов в минуту, а для полностью свободной от экзогенных витрификантов КВФ (за редким исключением, например, для спермы человека [7]) — сверхбыстрое охлаждение (сотни тысяч градусов в минуту).

Важное значение имела витрификация эмбрионов мыши с использованием таких же высоких концентраций витрификантов, как и в случае с почкой [19]. Для эмбрионов мыши витрификация была успешной. Между тем такие высокие концентрации витрификантов (40-0% об/об) ДМСО, этиленгликоля, пропиленгликоля или глицерина являются осмотически повреждающими и химически токсичными. Они не подходят для многих кле-

ток, таких как ооциты и сперматозоиды, последние выдерживают в лучшем случае 10-15% ДМСО, этиленгликоля, пропиленгликоля или глицерина. Таким образом, исследователи постепенно переходят от РВФ к гораздо более быстрой КВФ, особенно для ооцитов, которые не могут выдерживать ни медленного замораживания, ни РВФ в основном из-за осмотической хрупкости их цитоскелета. В настоящее время многие существующие протоколы криоконсервации и криоконтейнеры разработаны для витрификации ооцитов и эмбрионов (рис. 1), но все они требуют небольших объемов проб и точного времени исполнения всех операций, что делает их уязвимыми для технических ошибок.

Эффект Лейденфроста (LFE) — влияние на максимальную скорость охлаждения при витрификации. Принято считать, что использование маленьких витрификационных криоконтейнеров (мининосителей) позволяет достигать относительно высоких (десятки тысяч градусов в минуту) скоростей охлаждения [6,9], однако данное утверждение в значительной степени игнорирует

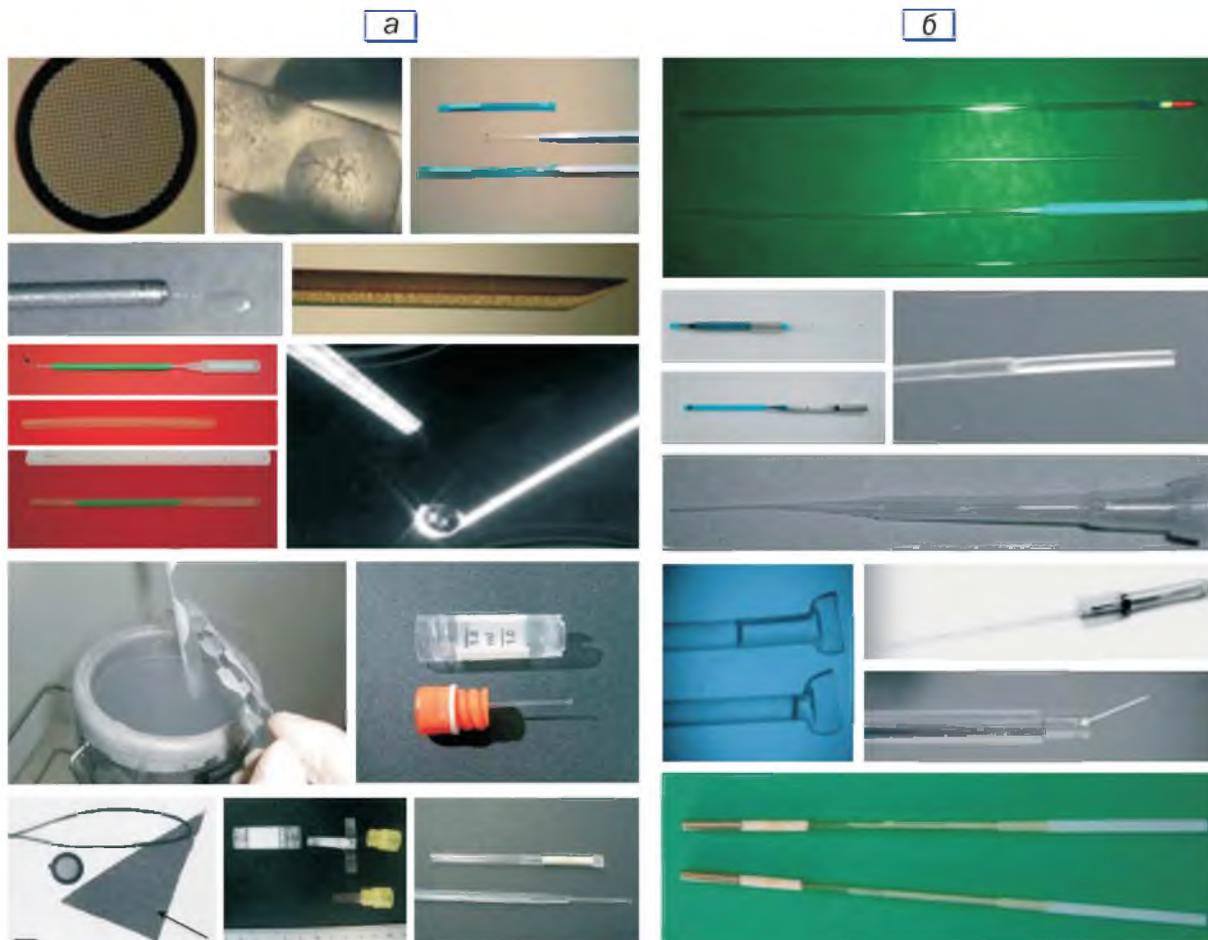


Рис. 1. Образцы криоконтейнеров, применяемых для витрификации ооцитов и эмбрионов. а — открытые (поверхностные) носители, б — закрытые носители [20].



эффект Лейденфроста. Указанный эффект описывает образование паровой пленки, покрывающей “горячий” образец (по сравнению с температурой жидкого азота LN_2 начальная разность температур охлаждаемого образца и охлаждающей жидкости ΔT_e находится в диапазоне от $120^\circ C$ и выше). Образование паровой пленки, особенно в зоне, близкой к температуре Лейденфроста, препятствует передаче тепла, поскольку тепловой поток с поверхности образца при пленочном кипении от одного до двух порядков ниже, чем при пузырьковом кипении, которое происходит при более низкой ΔT_e (менее $30^\circ C$). Для воды отношение максимального теплового потока q_{max} (при $\Delta T_e=30^\circ C$) к минимальному q_{min} в точке Лейденфроста (при $\Delta T_e=120^\circ C$) равно ~ 50 .

Для жидкого азота LN_2 отношение q_{max}/q_{min} (24) немного меньше, но в более узком диапазоне ΔT_e (от 14 до $35^\circ C$ для q_{min} и q_{max} соответственно) [1]. Это соответствует более низкому (в 60 раз) коэффициенту теплопередачи ($h \equiv q/\Delta T_e$) в точке Лейденфроста. В совокупности эти данные означают, что скорости охлаждения для малых образцов могут быть пропорционально ниже и не могут превышать $20-30$ тыс. $^\circ C/мин$ для очень маленьких образцов и быть на порядок ниже для образцов размером более 10 мкл. При таких скоростях охлаждения по-прежнему необходимы относительно большие, а значит, потенциально опасные концентрации витрификантов (например, концентрации ДМСО и этиленгликоля 30% и выше).

Устранение эффекта Лейденфроста. Кардинальным решением проблемы повышения скорости охлаждения является разработка способа и устройства, позволяющего полностью исключить эффект Лейденфроста. Данное устройство должно быть масштабируемым, что позволило бы легко увеличить объем витрифицированных образцов. Решение данной проблемы найдено в далеких от биотехнологии областях: в пожаротушении и ракетостроении, где используются охлаждающие жидкости, подаваемые на охлаждаемый объект под высоким давлением, что позволяет очень быстро и эффективно охладить поверхность горячего (или горящего) объекта. Такая вынужденная конвекция позволяет значительно увеличить поток тепла от поверхности горячего объекта (по сравнению с температурой охлаждающей жидкости) и устранить эффект Лейденфроста. Основное отличие предлагаемого способа сверхбыстрого охлаждения состоит в том, что объект не погружается в резервуар с жидким азотом, а охлаждается мощным потоком криогенной жидкости, подаваемой под повышенным давлением.

КриоБласт™-1: пилотное (первое) устройство сверхбыстрого охлаждения. Система, реали-

зующая данный способ криогенного охлаждения, разработана в компании “CELLTRONIX” (San Diego, California) [8]. Был построен опытный образец первого поколения *КриоБласт™-1* — прототип устройства с ручным управлением введения образца в зону охлаждения (рис. 2).

В устройстве *КриоБласт™-1* определена скорость охлаждения до криогенных температур с помощью маркерных растворов глицерина, для которых известна скорость охлаждения, обеспечивающая витрификацию, как функция концентрации витрификанта. Максимальная скорость охлаждения определялась по минимальной концентрации глицерина, при которой образец остается витрифицированным (метод детально описан в работе [21]). Применение непрямого метода измерения связано с тем, что при таких высоких скоростях охлаждения термическая инерционность термпары не позволяет измерять температуры охлаждения, поскольку весь процесс заканчивается за миллисекунды, а то и за микросекунды.

В экспериментах были использованы концентрации растворов глицерина с шагом 5% — от 60 до 0% об/об. При охлаждении образца наблюдалась витрификация через правый иллюминатор (рис. 2, 15). Витрификация фиксировалась по прозрачности образца или его кристаллизации (молочный цвет, непрозрачный внешний вид). Особо отметим, что глицерин в данном случае был использован как витрификант — маркер скорости охлаждения, однако это не означает, что КВФ клеток будет нуждаться в этом витрифицирующем агенте.

В исследованиях удалось достичь витрификации 4000 мкл 15% глицерина, что соответствует скорости охлаждения в диапазоне $100\ 000-200\ 000^\circ C/мин$ [21]. Подробно результаты экспериментов как на модельных растворах, так и на клетках будут описаны в следующей работе.

Это первая публикация по масштабируемой системе сверхбыстрого охлаждения до криогенных температур, в которой реализуется КВФ. Данная система характеризуется универсальностью, надежностью, простотой в эксплуатации и в дальнейшем может быть автоматизирована.

В предварительных экспериментах не удалось добиться более высоких скоростей охлаждения и обеспечить витрификацию более разбавленных растворов глицерина по следующим основным причинам:

- образец перемещался в зону охлаждения вручную (рис. 2, 14);
- скорость потока жидкого азота LN_2 в используемом криогенном “душе Шарко” не была достаточно высокой, чтобы полностью устранить эффект Лейденфроста;

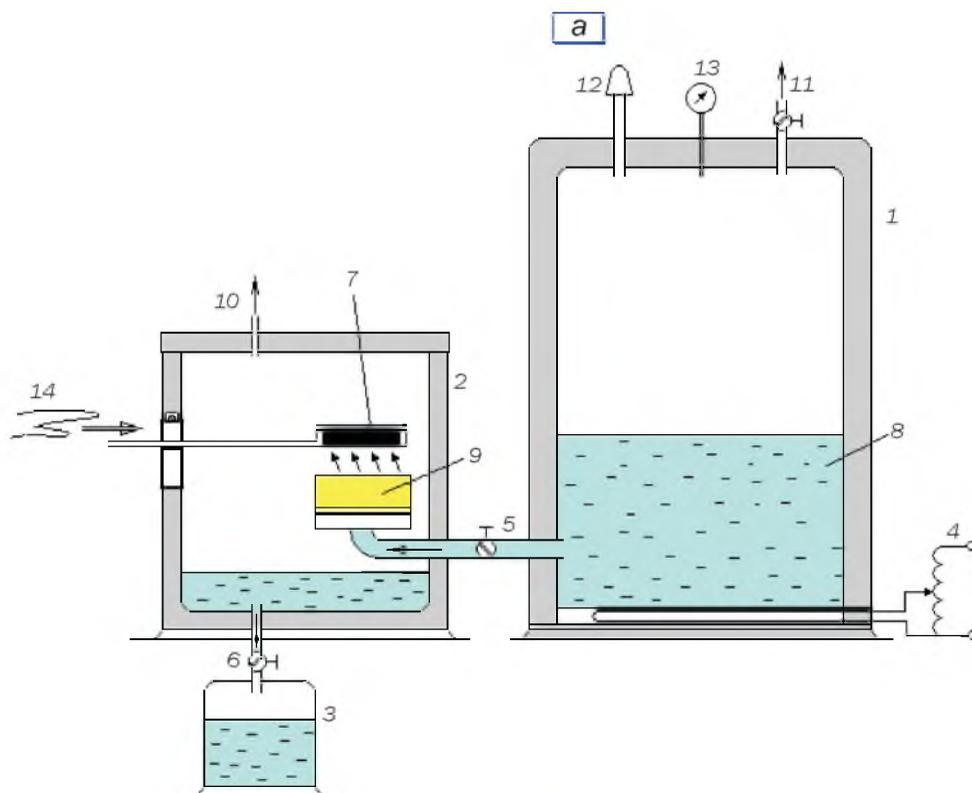


Рис. 2. КриоБласт™-1 – прототип устройства для сверхбыстрого охлаждения с ручным управлением (первое поколение).

а – двухмерная схема, б – трехмерная конфигурация.

1 – сосуд повышенного давления с жидким азотом (LN_2); 2 – охлаждающая камера; 3 – сосуд Дьюара для использованного LN_2 ; 4 – регулируемый тепловой нагреватель для создания повышенного давления LN_2 ; 5 – трубопровод с вентилем для подачи LN_2 повышенного давления; 6 – трубопровод с вентилем для выпуска использованного LN_2 ; 7 – ручной плунжер с присоединенным держателем биологического образца в плашке; 8 – LN_2 ; 9 – сопло, которое образует криогенный “душ” со скоростными струями LN_2 ; 10 – патрубок для сброса паров азота из охлаждающей камеры при нормальном давлении (1 атм); 11 – клапан с ручным управлением для сброса паров сжатого азота из резервуара LN_2 ; 12 – аварийный клапан безопасности для сброса повышенного давления (>2 атм) LN_2 из сосуда; 13 – манометр; 14 – рука оператора; 15 – вид сбоку на два вакуумно плотных окна (иллюминатора): левое окно для освещения образца в LN_2 лазерным пучком, правое окно для наблюдения за процессом витрифицирования биологического образца в LN_2 .

После сверхбыстрого охлаждения струями LN_2 образец может быть погружен в объем LN_2 около иллюминатора. Степень прозрачности витрифицированного биологического раствора в плашке можно увидеть и оценить путем наблюдения за процессом через иллюминатор. Вакуум между двумя стеклами иллюминаторов 15, который создается с помощью вакуумного насоса (не показан на рисунке), предотвращает образование конденсата (запотевания) на внешнем (теплом) стекле иллюминатора.



В



Рис. 2. КриоБласт™-1 — прототип устройства для сверхбыстрого охлаждения с ручным управлением (первое поколение).

в — фото установки без верхней крышки охлаждающей камеры.

- пластина с образцом была закрыта целлофановым пластиком;
- в будущем суспензия с клетками должна быть закрыта и надежно изолирована от потоков жидкого азота.

Все эти моменты учтены в следующем поколении системы КриоБласт™-2 и будут описаны в отдельной публикации, где также будут приведены данные экспериментов по КВФ плюрипотентных стволовых клеток и сперматозоидов с помощью этой системы.

Авторы выражают благодарность Р.А.Полтавцевой (ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова) за ценные замечания.

Литература

1. Архаров А.М., Марфенина И.В., Микулин Е.И. Теория и вычислительные методы для криогенных систем. М., 1978. С. 389-400.
2. Бернштейн А.Д., Петропавловский В.В. Влияние неэлектролитов на переживаемость сперматозоидов (сообщение III) // Бюл. экспер. биол. 1937. Т. 3, № 1. С. 41-43.
3. Граевский Е.Ю. Стеклообразное состояние протоплазмы в условиях глубокого холода // Успехи соврем. биол. 1948. Т. 14, № 4. С. 186-202.
4. Смирнов И.В. Консервация семени домашних животных путем глобоко охлаждения // Советская зоотехния. 1949. № 4. С. 63-65.

5. Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A., Meryman H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation // Cryobiology. 1984. Vol. 21, N 4. P. 407-426.
6. Isachenko E., Isachenko V., Katkov I.I., Dessole S., Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success // *Reprod. Biomed. Online*. 2003. Vol. 6, N 2. P. 191-200.
7. Katkov I.I., Bolyukh A.F., Chernetsov O.A., Dudin P.I., Grigoriev A.Y., Isachenko V., Isachenko E., Lulat A.G.-M., Moskovtsev S.I., Petrushko M.P., Pinyaev V.I., Sushko A.B., Sokol K.M., Sokol Y.I., Yakhnenko I. Kinetic vitrification of spermatozoa of vertebrates: what can we learn from nature? // *Current frontiers in cryobiology* / Ed. I.I. Katkov. InTech Open Access Books, 2012. Ch. 1. P. 3-40. URL: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology>.
8. Katkov I.I., Bolyukh V.F., Lupikov V.S. Method and device for hyper-fast cooling of small samples // US Patent 9,557,090. 2017, Assignee: CELLTRONIX, priority April 6, 2011.
9. Katkov I.I., Isachenko V., Isachenko E. Vitrification in small quenched volumes with a minimal amount of, or without vitrificants: basic biophysics and thermodynamics // *Vitrification in assisted reproduction: a user's manual and troubleshooting guide* // Eds. M.J. Tucker, J. Liebermann. London, 2007. P. 21-32.
10. Katkov I.I., Kan N.G., Cimadamore F., Nelson B., Snyder E.Y., Terskikh A.V. DMSO-free programmed cryopreservation of fully dissociated and adherent human induced pluripotent stem cells // *Stem Cells Int*. 2011. Vol. 2011. ID 981606. doi: 10.4061/2011/981606.
11. Luyet B.E. The vitrification of organic colloids and of protoplasm // *Biodynamica*. 1937. Vol. 1. P. 1-14.
12. Luyet B., Hodapp A. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air // *Proc. Meet. Soc. Exp. Biol.* 1938. Vol. 39. P. 433-434.
13. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems // *Science*. 1970. Vol. 168. P. 939-949.
14. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol.* 1984. Vol. 247, N 3, Pt 1. P. C125-C142.
15. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H. A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from chinese hamster tissue-culture cells // *Exp. Cell Res.* 1972. Vol. 71, N 2. P. 345-355.
16. Mazur P., Leibo S.P., Seidel G.E. Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions // *Biol. Reprod.* 2008. Vol. 78, N 1. P. 2-12.
17. Parkes A.S. Preservation of spermatozoa at low temperatures // *Br. Med. J.* 1945. Vol. 2. P. 212-213.
18. Polge C., Smith A.U., Parkes A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures // *Nature*. 1949. Vol. 164. P. 666.
19. Rall W.F., Fahy G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification // *Nature*. 1985. Vol. 313. P. 573-575.
20. Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // *Reproduction*. 2011. Vol. 141, N 1. P. 1-19.
21. Warkentin M., Stanislavskaja V., Hammes K., Thorne R.E. Cryocrystallography in capillaries: critical glycerol concentrations and cooling rates // *J. Appl. Crystallogr.* 2008. Vol. 41, Pt 4. P. 791-797.