

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАЗОВ И ГАЗОВЫХ ГИДРАТОВ В КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2015 г. Н.В. Шишова, Е.Е. Фесенко (мл.)

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушино Московской области, ул. Институтская, 3*

*E-mail: eugeny.ef@gmail.com, cryopreservation@list.ru*

Поступила в редакцию 23.07.15 г.

В обзоре предпринята попытка оценить известные свойства газогидратов и образующих их газов с точки зрения механизмов криповреждений и криозащиты, рассмотреть работы по замораживанию биологического материала в присутствии инертных газов и проанализировать перспективы развития этого направления. Для этого проведен поиск информации по физическим свойствам газов и газогидратов, проведено сопоставление процессов, протекающих при образовании газовых гидратов и водного льда, проанализировано влияние образования и роста газовых гидратов на структуру биологических объектов. Сделан краткий обзор биологического действия ксенона, криптона, аргона, углекислого газа, сероводорода, угарного газа с акцентом на гипотермические условия и возможное применение данных свойств в технологиях криоконсервации. Проанализированы описания существующих экспериментов по криоконсервации биологических объектов с применением газов. На основании найденной информации обозначены наиболее перспективные направления работ в области криоконсервации биологических объектов с применением газов и сделана попытка прогнозирования потенциальных проблем в этой области.

*Ключевые слова: криоконсервация, витрификация, гипотермия, газогидраты, клатраты, инертные газы, ксенон, криптон, аргон.*

Технологии хранения жизнеспособного биологического материала в глубокозамороженном состоянии (температура  $-80^{\circ}\text{C}$  и ниже), т.е. технологии криоконсервации, зародились в середине прошлого века [1–3]. С тех пор методы криоконсервации активно развивались и в настоящее время широко применяются в науке, медицине, сельском хозяйстве и биотехнологических производствах. Наряду с успехами в этой области, до сих пор остается нерешенным вопрос криоконсервации крупных объектов – органов и больших массивов тканей. Хранение такого материала является актуальной проблемой в связи с развитием методов трансплантации тканей и органов и, соответственно, необходимостью создания запаса трансплантатов в криобанках.

В рамках поиска новых направлений для дальнейшего развития технологий криоконсервации в конце 60-х годов прошлого века возникла идея применения газовых гидратов для криоконсервации биообъектов. В 1969-м г. Р. Прегода теоретически обосновал возможность использования инертных газов в качестве криопротекторов [4]. Благодаря малому размеру молекул, инертные газы свободно проникают через мембраны клеток и при этом не под-

вергаются какой-либо биотрансформации, поскольку не вступают в химические реакции. Таким образом, теоретически решаются основные проблемы криоконсервации крупных объектов: 1) вместо кристаллов льда формируются кристаллы газовых гидратов; 2) инертные газы заполняют весь объем органа; 3) инертные газы не токсичны.

Однако образование газогидратов как подход к криоконсервации до сих пор практически не исследован. Количество публикаций, посвященных криоконсервации с использованием газов, способных к образованию стабильных газогидратов, ограничено.

В настоящем обзоре мы попытались оценить известные свойства газогидратов и образующих их газов с точки зрения механизмов криповреждений и криозащиты, рассмотреть работы по замораживанию биологического материала в присутствии инертных газов и проанализировать перспективы развития этого направления.

### КЛАТРАТООБРАЗУЮЩИЕ ГАЗЫ И ГАЗОГИДРАТЫ

Ряд газов – Ar, Kr, Xe,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  – при низкой температуре и повышенном

**Таблица 1.** Растворимость некоторых газов в воде и жирах при температуре 37°C [9]

Газ	Коэффициент растворимости Оствальда, мл/мл		Соотношение растворимости вода/жир
	в воде	в жирах	
Кислород	0,029	0,120	4,1
Двуокись углерода	0,57	1,28	2,2
Аргон	0,026	0,140	5,3
Криптон	0,045	0,43	9,6
Ксенон	0,085	1,7	20,0

давлении способны образовывать гидраты, представляющие собой кристаллические структуры, напоминающие лед, но по своим физическим свойствам значительно отличающиеся от него. Суть газогидратного подхода к криоконсервации состоит в том, чтобы при замораживании биоматериала заместить процесс образования кристаллов льда на процесс образования кристаллов газовых гидратов. При этом наиболее перспективным гидратообразующим газом является ксенон, поскольку в ряду Ar–Kr–Xe газогидраты ксенона отличаются наибольшей стабильностью и образуются при околонулевой температуре и давлении порядка 1,5 атм (также для ксенона показан опыт медицинского применения; в России активно развивается техника ксенонового наркоза). В то же время в качестве криопротектирующих агентов рассматриваются и другие газы: аргон и криптон. Обобщенно аргон, криптон и ксенон объединяют под названием тяжелых нерадиоактивных инертных газов.

**Физические свойства тяжелых нерадиоактивных инертных газов. Растворимость в воде, жирах и биологических структурах. Влияние криопротекторов на растворимость.** Газовые гидраты составляют большой класс клатратных (от латинского *clatratus* – защищенный решеткой) соединений, которые представляют собой объемную решетку, образованную молекулами воды, полости которой заполнены молекулами газа. По внешнему виду газовые гидраты напоминают снег или рыхлый лед. К гидратообразованию способны газы, диаметр молекул которых находится в интервале 0,38–0,92 нм. К ним относятся метан, этан, пропан, азот, сероводород, углекислый газ, кислород, аргон, криптон, ксенон. Не образуют газовых гидратов (либо образуют при сверхвысоких давлениях) водород, неон, гелий, а также углеводороды, содержащие свыше пяти атомов углерода. Газовые гидраты устойчивы при пониженной температуре и повышенном давлении. При околонулевой температуре и давлении до трех атмосфер могут существовать газогидраты ксенона,

пропана, сероводорода. В качестве наиболее перспективного газа-криопротектора чаще всего рассматривают ксенон [5–7] или аргон–криптон–ксеноновую смесь [8].

Все тяжелые нерадиоактивные инертные газы обладают достаточно хорошей растворимостью в воде и еще лучшей растворимостью в гидрофобных растворителях (см. табл. 1). По уточненным данным значение растворимости ксенона (коэффициент Оствальда) в воде соответствует диапазону от 0,096 до 0,098 мл/мл [10].

Биологические жидкости содержат множество примесей, способных оказывать влияние на растворимость газов. Например, соли, содержащиеся в биологических жидкостях и тканях, обладают способностью понижать растворимость газов. Липиды, являясь хорошими растворителями для инертных газов, напротив, будут повышать растворимость инертных газов в жидкости. Помимо липидов, ксенон и криптон проявляют сродство к гидрофобным центрам белков, что также должно оказывать влияние на растворимость данных газов. В табл. 2 представлены коэффициенты растворимости ксенона и криптона для ряда биологических веществ, жидкостей и тканей. Для количественной характеристики растворимости газов используется коэффициент растворимости Оствальда, определяемый как отношение объема растворенного в жидкости газа ( $V_r$ ) к объему абсорбирующей его жидкости ( $V_{ж}$ ), измеренных при температуре эксперимента.

Обращает на себя внимание тот факт, что растворимость ксенона в ткани печени с высоким содержанием липидов превышает растворимость ксенона в оливковом и парафиновых маслах и лишь немного ниже растворимости в лецитине. Это может свидетельствовать о том, что биологические ткани обладают дополнительными, помимо липидов, сайтами, обладающими высоким сродством к ксенону. Известно, что ксенон и криптон проявляют высокое сродство к гидрофобным центрам некоторых ферментов [14,15]. Из этого факта можно было бы

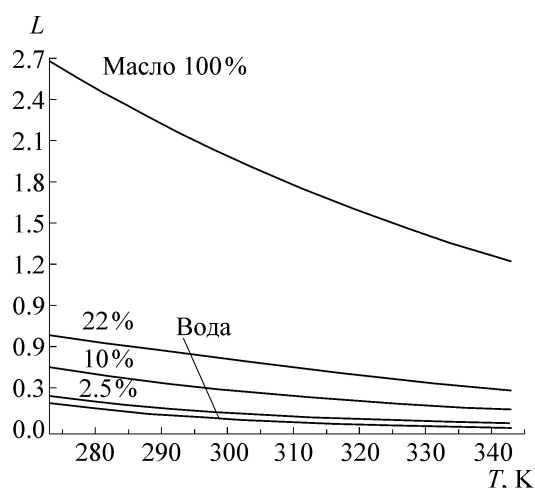
**Таблица 2.** Растворимость ксенона и криптона (коэффициент Оствальда) в биологических жидкостях и тканях при 37°C

Жидкость, ткань	Коэффициент растворимости Оствальда, мл/мл		Ссылка
	криптон	ксенон	
Дистиллированная вода	0,0481	0,0830	[11]
Раствор 0,9% NaCl	0,0458	0,0780	[11]
Оливковое масло	0,451	1,883	[11]
Парафиновое масло	0,481–0,492	2,065–2,079	[11]
Лецитин	0,367	4,767	[11]
Плазма крови	0,0494–0,0502	0,0942–0,0953	[11]
Красные кровяные тельца	0,0718	0,1966	[11]
Раствор гемоглобина (липиды 2,5 мг/мл, Hb 15,4%)	0,042	0,1241	[12]
Раствор гемоглобина (липиды 1,6 мг/мл, Hb 7,5%)	0,044	0,1046	[12]
Кровь человека (липиды 5,5%, Hb 14%)	0,045	0,141	[12]
Ткань печени (липиды 3%)	0,050–0,075	1,1–1,8	[13]
Ткань печени (липиды 15%)	1,1	3,8–3,9	[13]

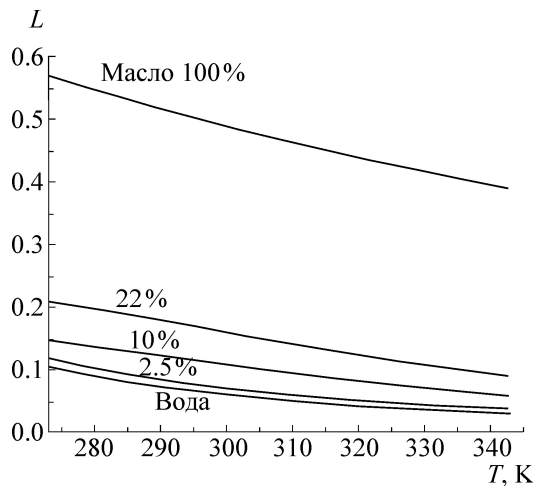
сделать заключение о связывании этих газов белками. Однако растворимость ксенона в плазме крови, содержащей около 7–8% белков, лишь немного превышает растворимость в физиологическом растворе солей. Можно сделать заключение, что ткани могут иметь дополнительные, неизвестные нам области, удерживающие ксенон и криптон.

Процесс подготовки биообъектов к криоконсервации протекает при температурах ниже физиологической. Соответственно насыщение тканей газами в процессе подготовки объекта к замораживанию необходимо проводить при пониженных относительно физиологической температурах. Хорошо известно, что растворимость газов в воде и водных растворах повышается при понижении температуры. Исследования растворимости ксенона и криптона в растворе альбумина и гомогенате некоторых животных тканей при температурах от 25 до 37°C свидетельствуют, что зависимость растворимости этих газов от температуры в биологических жидкостях подчиняется тем же закономерностям [12]. Влияние температуры на растворимость ксенона и криптона в биологических жидкостях в более широком диапазоне температур было исследовано в работах [10,16,17]. В качестве модельных биологических жидкостей были выбраны жировые эмульсии (молоко с жирностью 2,5%, сливки с жирностью 10 и 22%). На рис. 1 и 2 показаны зависимости коэффициента растворимости Оствальда от температуры для воды, жировых эмульсий и масла.

Растворимость ксенона при охлаждении биологических жидкостей от 37 до 0°C возрастает примерно в 1,4–1,5 раз, криптона – в 1,3–1,4 раза. Однако значения коэффициентов растворимости ксенона и криптона в эмульсиях молока при 37°C существенно ниже растворимости этих газов в тканях (табл. 2). В связи с этим фактом представленные материалы не могут выступать в качестве основы для расчетов количества растворенного ксенона в случаях насыщения органов газами при околонулевых температурах. Для получения точных данных по насыщению органов газами при криокон-



**Рис. 1.** Растворимость ксенона в воде, молоке (2,5% жирности), сливках (10 и 22% жирности), а также в масле: зависимость коэффициента Оствальда от температуры [10].



**Рис. 2.** Растворимость криптона в воде, молоке (2,5% жирности), сливках (10 и 22% жирности), а также в масле: зависимость коэффициента Оствальда от температуры [10].

сервации необходимы дополнительные исследования в этом направлении.

Ряд авторов предполагает, что газогидратная криоконсервация поможет полностью избежать применения традиционных криопротекторов. Однако нам представляется более вероятным успех применения комбинированных методов, когда газовая составляющая используется на фоне других криозащитных агентов. Для прогнозирования действия газов на фоне традиционных криопротекторов необходимо иметь представление об их влиянии на растворимость газов в водных растворах. Нами проведен поиск и анализ публикаций, описывающих влияние наиболее распространенных криопротекторов на растворимость инертных газов в водных растворах. В табл. 3 приведены растворимости ксенона и криптона в криопротекторах. Для количественной характеристики растворимости газов использовался коэффициент абсорбции Бунзена ( $\alpha$ ) – объем приведенного к нормальным условиям ( $t = 0^\circ$ , давление 1 атм) газа, растворенного в единице объема жидкости при данной температуре и парциальном давлении газа, равном 1 атм.

Из представленных данных можно сделать вывод, что растворимость ксенона и аргона в криопротекторах существенно выше, чем в воде. Температурная зависимость растворимости инертных газов в криопротекторах различается и зависит от природы газа и растворителя. Так, растворимость ксенона в метиловом спирте и диметилформамиде в исследованном диапазоне увеличивается при понижении температуры, в диметилсульфоксиде – слабо зависит

от изменения температуры. Растворимость аргона в пропиленгликоле увеличивается при повышении температуры. Зависимость растворимости благородных газов от концентрации криопротекторов в водных растворах имеет нелинейный характер. На рис. 3 представлены кривые растворимости аргона в водном растворе метанола в зависимости от концентрации спирта и температуры [20]. При температуре  $10^\circ\text{C}$  ( $283\text{ K}$ ) растворимость газа увеличивается с ростом концентрации метанола в растворе. При более низких температурах растворимость газа повышается до достижения локального максимума в области концентраций около 0,1 мольной доли (5,5 моль/л). При увеличении концентрации метанола до 0,18–0,19 мольных долей ( $\approx 10$  моль/л) растворимость аргона падает, а при дальнейшем увеличении содержания метанола в растворе растворимость газа снова растет.

Аналогичная закономерность, хотя и не настолько ярко выраженная, проявляется в растворах этанола [20], ацетамида [22] и пропиленгликоля [19]. В растворах пропиленгликоля с концентрацией криопротектора менее 0,15 мольных долей ( $\approx 8$  моль/л) растворимость аргона растет с понижением температуры. В растворах с более высокой концентрацией пропиленгликоля характер температурной зависимости растворимости аргона меняется на противоположный. При температуре ниже  $15^\circ\text{C}$  с ростом концентрации пропиленгликоля наблюдается локальный минимум (0,05 мольных долей) и локальный максимум (0,15–0,17 мольных долей). Однако изменение растворимости в этой области не такое резкое, как в случае метанола. Можно сделать вывод, что при температуре  $15^\circ\text{C}$  изменение концентрации пропиленгликоля от 0 до 0,2 мольных долей (11–12 моль/л) оказывает незначительное влияние на растворимость аргона [19]. Нами не обнаружено данных по растворимости аргона в присутствии пропиленгликоля для околонулевых температур. По аналогии с метанолом мы предполагаем, что при  $0^\circ\text{C}$  и ниже влияние небольших концентраций пропиленгликоля будет более заметным.

**Кристаллизация воды и газогидратов.** Кристаллизация как воды, так и газогидратов представляет собой фазовый переход первого рода. Образование кристаллов льда и газогидратов включает две стадии: нуклеацию и рост кристаллов.

Нуклеацией называется процесс образования зародышей новой фазы, в нашем случае кристаллов льда или газогидратов. Для образования устойчивого «критического» зародыша

новой фазы система должна преодолеть энергетический барьер, называемый работой образования критического зародыша. Вследствие преодоления энергетического барьера при охлаждении кристаллизация почти никогда не происходит в точке равновесного кристаллообразования, а происходит при более низкой температуре в переохлажденной жидкости. В случае образования газогидратов задержка кристаллизации относительно точки равновесия более выражена, чем в случае кристаллизации льда [23]. Различают гомогенную и гетерогенную нуклеацию. Гомогенной называют нуклеацию в объеме раствора. Гетерогенная нуклеация происходит на неоднородностях и на границе раздела фаз (на стенках сосуда, на включениях – пузырьках воздуха, соринках). Нуклеация – это случайный процесс, однако можно выделить условия, в которых нуклеация происходит с наибольшей вероятностью.

Для криобиологии наиболее важны температура равновесной кристаллизации и нуклеации. Считается, что температура равновесной кристаллизации зависит от значения активности воды в растворе, другими словами – от осмолярности раствора, и не зависит от природы растворенных веществ [24,25]. Температура гомогенной нуклеации зависит от осмолярности и скорости охлаждения раствора. Отдельно нужно отметить, что изменение давления в пределах от 1 до 300 атм практически не влияет на температуру равновесной кристаллизации воды.

Нуклеация газогидратов имеет более сложную природу. Для нуклеации кристаллов газогидрата необходимо наличие как молекул воды, так и молекул газа. Вследствие этого на границе вода/газ возникают более благоприятные условия для образования газогидрата, так как, во-первых, концентрация газа в газовой фазе выше, чем в жидкой, во-вторых, раздел фаз является сайтом гетерогенной нуклеации. При наличии раздела фаз жидкость/газ кристаллы газогидратов образуются на границе, причем рост кристаллов в большей степени направлен в сторону газовой среды, чем в раствор. Рост газогидратов в газовой среде происходит за счет воды, мигрирующей в растущие конгломераты твердых газогидратов по капиллярам, в массе присутствующим в рыхлых газогидратах [23]. Равновесные условия гидратообразования на границе жидкость/газ зависят от температуры и давления. На равновесные условия оказывают влияние также примеси, растворенные в воде. В литературе отсутствуют прямые свидетельства того, что температура равновесного гидратообразования зависит от активности воды (ос-

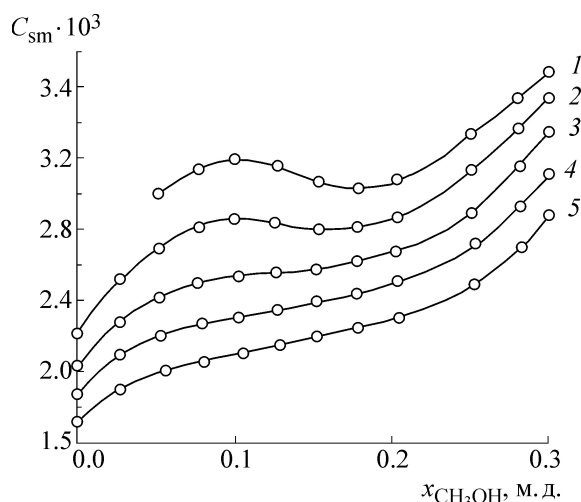


Рис. 3. Зависимости растворимости аргона в водном растворе метанола в зависимости от концентрации метанола при температуре (К): 1 – 268,15; 2 – 273,15; 3 – 278,15; 4 – 283,15; 5 – 288,15 [20].

молярности), но тот факт, что наличие в растворе солей понижает температуру образования газогидратов тем больше, чем выше концентрация солей [26], заставляет предположить наличие такой зависимости.

В биологических объектах – тканях и органах – представляется маловероятным значительное нарастание газогидратов в сторону газовой среды. В отличие от свободного раствора, водная фаза в биологических объектах ограничена мембранами, соединительно-тканными структурами, фасциями, кожей. Миграция воды в таких условиях ограничена. Образующиеся на поверхности твердые газогидраты имеют возможность перекрыть приток газа из газовой среды в жидкую фазу, что приведет к формированию на поверхности объекта тонкого слоя газогидратов. Во внутреннем пространстве объекта возможно образование газогидратов только из запаса растворенного в жидкости газа, т.е. в системе с отсутствием фазовой границы жидкость/газ.

Образование газогидратов при отсутствии фазовой границы жидкость/газ несколько отличается. При образовании в объеме раствора существенное влияние на температуру равновесного образования клатрата оказывает концентрация растворенного газа. При постоянном давлении с уменьшением концентрации газа снижается температура равновесного образования газогидрата и его диссоциации [27,28]. При дефиците газа образуется газогидрат с пониженной концентрацией газа [29]. Это необходимо учитывать при расчете количества воды, участвующей в образовании газовых гидратов.

**Таблица 3.** Растворимость (коэффициент Бунзена) ксенона и аргона в воде и некоторых криопротекторах

Растворитель	Растворимость ксенона, мл/мл					Ссылка
	Температура, К					
	278,15	288,15	298,15	308,15	318,15	
Вода	0,184	0,131	0,098	0,077	0,062	[18]
Метилловый спирт	2,394	2,037	1,632	1,314	0,980	[18]
Диметилформамид	1,462	1,338	1,222	1,104	1,000	[18]
	Температура, К					
		293,15	303,15	313,15	323,15	
Диметилсульфоксид		0,542	0,538	0,533	0,526	[18]
	Растворимость аргона, мл/мл,					
	Температура, К					
				318,15	328,15	
Вода				0,024	0,023	
Пропиленгликоль				0,269	0,303	[19]

Разные газы образуют устойчивые газогидраты в различных условиях. Температура равновесного гидратообразования (и диссоциации) зависит сразу от нескольких факторов: природы газа, его концентрации в растворе, давления, активности воды. Температура гомогенной и гетерогенной нуклеации газогидратов зависит от вышеперечисленных факторов, а также от скорости охлаждения раствора, наличия или отсутствия модификаторов нуклеации. При описании образования, роста и диссоциации газогидратов необходимо учитывать большее количество факторов, чем при описании образования и таяния кристаллов льда. С одной стороны, это затрудняет прогнозирование динамики образования и диссоциации газогидратов в процессе криоконсервации, делает процесс более чувствительным к изменению условий и менее воспроизводимым. С другой стороны, данное обстоятельство повышает возможности по управлению процессом газогидратообразования по сравнению с льдообразованием.

**Влияние криопротекторов на кристаллизацию газогидратов.** Данных по влиянию криопротекторов на образование газогидратов нет. В то же время два вещества, применяющиеся в криобиологии в качестве криопротекторов, одновременно известны как ингибиторы образования газогидратов в газовой промышленности – это метанол и пропиленгликоль [30]. Более внимательное рассмотрение, однако, не позволяет принять за данность тот факт, что введение этих веществ в криопротектирующий раствор предотвратит образование газогидратов. В газовой промышленности метанол и пропиленгликоль используют для предотвращения газогидратообразования в газовых трубопроводах.

Поскольку газ содержит воду в виде примеси, то добавки метанола и пропиленгликоля происходят в избыточных количествах, заведомо предотвращающих образование газогидратов путем связывания находящейся в недостатке воды. В то же время обнаружено, что в небольших концентрациях метанол, напротив, может способствовать образованию газогидратов [23]. Показано также, что метанол в концентрации 0,05 мольной доли (2,7 моль/л) изменяет механизм массовой кристаллизации гидратов. Даже при наличии фазовой границы жидкость/газ образование газогидратов отмечается и в объеме раствора [23]. Автор связывает это с повышением растворимости газа в растворе, что особенно интересно в связи с тем, что растворимость тяжелых инертных газов в животных тканях также достаточно высока (см. табл. 2).

Добавление к воде поверхностно-активных веществ замедляет процесс нуклеации и одновременно ускоряет рост уже образовавшихся кристаллов газогидрата [13–23]. При этом следует отметить, что многие высокомолекулярные органические молекулы в той или иной степени проявляют свойства поверхностно активных веществ. В частности поверхностно-активными свойствами обладает альбумин, часто вводимый в состав криозащитных и перфузионных растворов. В связи с этим представляется интересным свойство поверхностно-активных веществ влиять на динамику нуклеации и роста кристаллов газогидратов.

Еще один немаловажный вопрос – сайты нуклеации газогидратов в биологических структурах. Рядом авторов высказано мнение, что газогидраты будут связывать воду одновремен-

но во вне- и внутриклеточной среде, что предотвратит осмотические нагрузки на клетку в процессе образования твердой фазы в растворе [8]. Однако исследования по изучению гидратообразования в суспензии бактерий методом ЯМР – «парамагнитного допинга» показали, что гидраты ксенона образуются в основном во внеклеточной среде. В результате этого повышалась осмоляльность внеклеточной среды, что приводило к дегидратации и сжатию клеток [33,34]. Нужно отметить, что бактериальные клетки по составу содержат меньше воды по сравнению с большинством клеток млекопитающих. Аналогичные исследования на клетках млекопитающих не обнаружены.

**Нуклеаторы и блокаторы нуклеации. Предполагаемое воздействие на нуклеацию газогидратов.** Как упоминалось выше, нуклеация льда может быть гомогенной и гетерогенной. Сайтами гетерогенной нуклеации могут служить разделы фаз, газовые пузырьки или твердые частицы. Однако существуют вещества, которые отличаются особой эффективностью в качестве сайтов гетерогенной нуклеации и практически полностью нивелируют явление переохлаждения растворов. Такие вещества используются в практике криоконсервации и называются нуклеаторами (см. обзор [35]). Существуют также агенты, снижающие вероятность зародышеобразования кристаллов, так называемые ингибиторы нуклеации или блокаторы льда [36]. Будут ли известные нуклеаторы льда и блокаторы настолько же эффективно воздействовать на образование газогидратов? С одной стороны, неспецифические нуклеаторы, такие как микрочастицы пыли, облегчают образование зародыша новой фазы независимо от ее природы. С другой стороны, не исключено, что наиболее эффективные нуклеаторы биологического происхождения, как, например, бактериальный нуклеатор Spn<sub>оx</sub>, несущий на поверхности структуры, имитирующие кристалл льда, могут по-разному воздействовать на нуклеацию льда и газогидратов.

Биологические блокаторы роста кристаллов льда (антифризные белки и гликопротеины) имеют на поверхности специфические структуры, позволяющие им устанавливать эффективные связи с зародышевыми кристаллами воды. В работе [37] методами математического моделирования установлено, что активные центры гликопротеинов также могут активно взаимодействовать и с зародышевыми кристаллами газогидратов. Синтетические блокаторы нуклеации, подавляющие гетерогенную нуклеацию (например, X1000), с большой вероятностью будут воздействовать на образование кристал-

лов газогидратов так же, как и на льдообразование. Таким образом, для предотвращения газогидратообразования в биологических системах можно воспользоваться наработанными знаниями по подавлению нуклеации льда.

Отдельный вопрос возникает о взаимном влиянии кристаллов льда на нуклеацию газогидратов и кристаллов газогидратов на нуклеацию кристаллов льда. Кристаллы льда или газогидратов в водной среде, так же как и любые твердые частицы, являются точками возмущения, которые могут служить сайтами гетерогенной нуклеации. Дисперсную нуклеацию льда в биологической системе с помощью мелкодисперсных кристаллов газогидратов авторы работы [8] рассматривают как один из механизмов воздействия клатратобразующих газов на биообъекты при криоконсервации. Однако есть основания предполагать, что структура газогидратов и льда достаточно разнородна и провоцирует нуклеацию «чужих» кристаллов неохотно, так что их нельзя отнести к разряду взаимных нуклеаторов. В работах [6,38] было проведено математическое моделирование поведения водного раствора ксенона при отрицательных температурах и различных давлениях. Расчеты показывают, что в присутствии небольшого массива льда в жидкой фазе зарождение кристаллогидратов происходит не на поверхности раздела вода/лед, а в толще жидкой фазы. Аналогично и нуклеация кристаллов воды происходит независимо от кристаллов газогидратов. Некоторым экспериментальным подтверждением этих расчетов служит работа [23], в которой при исследовании диссоциации газогидратов пропана наблюдалось длительное сосуществование кристаллов гидрата пропана и переохлажденной воды. Несмотря на то, что такие случаи, по свидетельству автора, были достаточно редкими, они подтверждают сказанное выше, так как будь кристаллы гидрата пропана эффективными нуклеаторами для льда, длительное сосуществование переохлажденной воды и кристаллов газогидратов было бы невозможно.

**Диссоциация газогидратов.** Диссоциация газогидратов является наиболее сложной проблемой для разработки новой технологии «клатратной криоконсервации». Газогидраты связывают большое количество газа. При разложении 1 мл газогидрата ксенона выделяется около 130–170 мл газа (в зависимости от плотности газогидрата). Быстрое выделение такого количества газа в живых тканях приведет к их полной деструкции. Исследователи, выдвигающие идею использования газогидратов для криоконсервации, отмечают необходимость

разработки адекватных режимов декомпрессии. Однако обычные приемы декомпрессии не обязательно будут применимы к данному случаю.

Декомпрессия – это способ растянуть во времени выделение из живого организма излишков газа, связанного с уменьшением растворимости газа при понижении давления. При падении давления растворимость падает постепенно, следовательно, замедляя скорость снижения давления (или делая остановки) можно замедлить выделение газа. В случае диссоциации газогидратов постепенного снижения растворимости не происходит. До определенного предела, пока газогидрат устойчив, излишков свободного газа в биологическом объекте наблюдаться не будет. Но после прохождения границы устойчивости по температуре/давлению начнется лавинообразный процесс разложения газогидрата с выделением одномоментно большого количества газа. Для того, чтобы удержать выделившийся газ в растворе, необходимо давление многократно большее по сравнению с условиями образования газогидрата в системе жидкость/газ.

Диссоциация газогидратов имеет и другие особенности, неблагоприятные для криоконсервации. Диссоциация гидратов является эндотермической реакцией и сопровождается поглощением тепла, удельная величина которого в полтора раза превышает теплоту плавления льда [39]. В том случае, когда температура диссоциации газогидратов ниже точки кристаллизации воды, распад гидратов может вызвать образование льда, даже если окружающая температура выше температуры кристаллизации воды [23,28,40] (см. рис. 4а). С точки зрения криобиологии это будет означать перекристаллизацию – один из разрушительных факторов, ухудшающий выживание биообъектов в процессе замораживания-оттаивания. При этом затормозить распад газогидратов в таком процессе почти невозможно, так как энергию на распад газогидрата система будет черпать из скрытой теплоты льдообразования.

На том же свойстве основано и явление самоконсервации газогидратов. Диссоциация крупных кристаллов газогидратов происходит в два этапа. Диссоциация начинается на поверхности кристаллов, и по мере ее развития гидраты покрываются коркой льда. Образование льда препятствует дальнейшей диссоциации, вплоть до ее полной остановки. Полностью диссоциация завершается на втором этапе после разогрева и плавления льда. Может ли проявляться явление самоконсервации в условиях диссоциации газогидратов внутри живых тканей – неизвестно.

В том случае, если равновесная температура распада газогидрата выше точки таяния льда, лед образовываться не будет, но возможно кратковременное снижение температуры значительно ниже точки распада газогидратов (см. рис. 4б) Это явление также может провоцировать излишне бурное высвобождение газа из распадающихся газогидратов, даже при ограничении разогрева в точке диссоциации газогидрата, так как в данном случае энергия на распад газогидратов будет черпаться из охлаждения раствора.

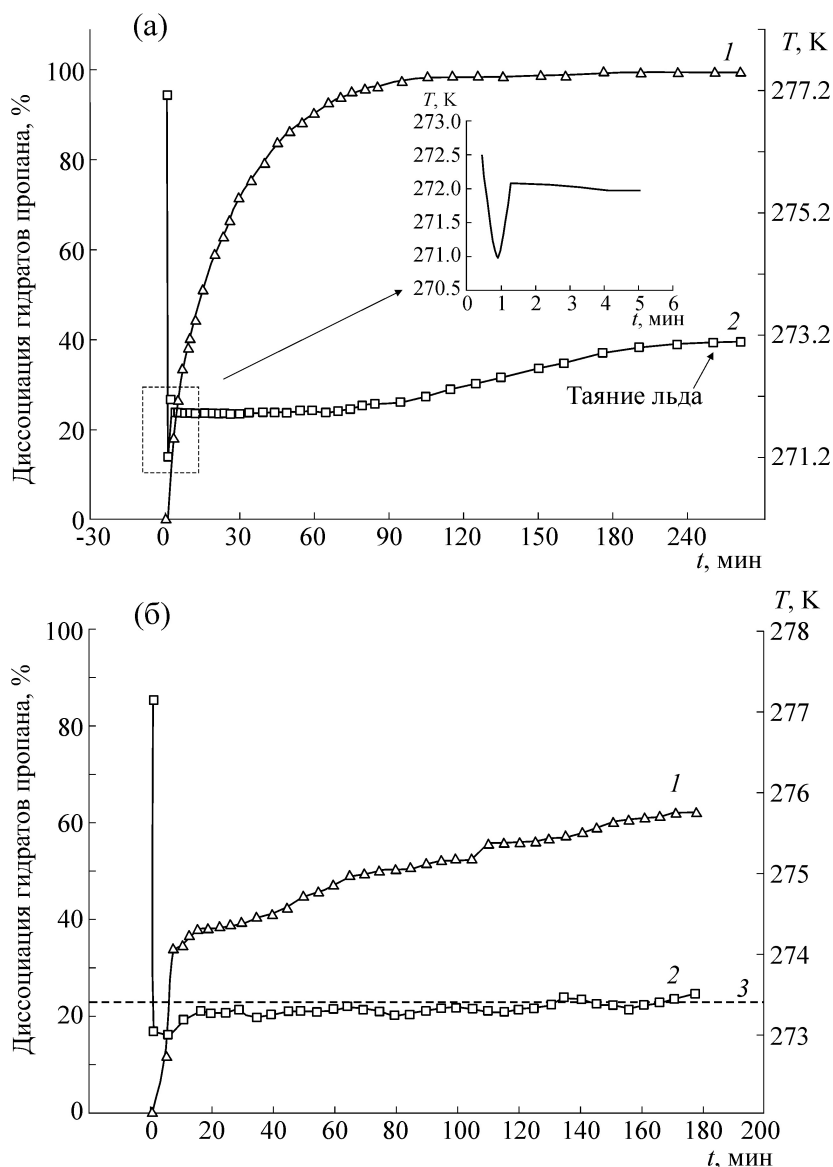
Нулевой момент времени на графике (см. рис. 4) отвечает понижению давления в реакторе с 0,4 МПа до 0,1 МПа (а) или 0,19 МПа (б) при температуре образцов 277 К. Понижение давления вызывает бурное разложение газогидратов (зависимость 1). Разложение газогидрата приводит к скачкообразному падению температуры (зависимость 2). В том случае, если температура равновесного гидратообразования ниже точки таяния льда (а), температура образцов при разложении гидратов не опускается ниже 271 К, несмотря на то, что равновесная температура диссоциации гидратов пропана при 0,1 МПа равна 263 К. После начальной понижения температуры происходит ее скачкообразное повышение до 272–273 К и стабилизация на этом уровне. Такой характер изменения температуры свидетельствует о том, что помимо разложения гидратов происходит еще один фазовый переход с выделением тепла – образование кристаллов льда. В том случае, если температура равновесного гидратообразования выше точки таяния льда (б), температура образца резко падает и затем стабилизируется в области равновесного гидратообразования для данного давления (273,5 К).

Возможное решение данной проблемы лежит в области создания «депо» для выделяющихся газов внутри биологического объекта, например липидных или перфторуглеродных суспензий, способных поглотить значительный объем газа (см. табл. 1). Но следует отметить, что процесс растворения газа в гидрофобных растворителях занимает определенное количество времени, что актуализирует поиск путей замедления распада газогидратов.

**Процессы перекристаллизации.** Одним из факторов, влияющих на сохранность биообъектов в процессе замораживания/оттаивания, является перекристаллизация воды. Под этим термином скрываются два разных физических явления, связанных с изменением кристаллов льда в области отрицательных температур.

Во-первых, существуют разные модификации кристаллической решетки льда, которые





**Рис. 4.** Кинетика диссоциации гидратов пропана: (а) – при 0,1 МПа и внешней температуре 277 К; (б) – при 0,19 МПа и внешней температуре 277 К. Зависимость 1 – разложение образцов, зависимость 2 – температура образцов, 3 – равновесная температура диссоциации при  $P = 0,19$  МПа [23].

при изменении условий могут переходить один в другой. В области нормального давления может существовать наиболее привычный нам гексагональный лед (Ih), низкотемпературный лед XI и метастабильный кубический лед (Ic) [41]. Как правило, при замораживании воды и водных растворов, в том числе и при криоконсервации, образуется гексагональный лед. Кубический лед в чистой воде образуется при сверхбыстром охлаждении или при охлаждении в капиллярах. Однако некоторые криопротекторы способствуют кристаллизации воды в форме кубического льда и при более медленных, традиционных для криоконсервации режимах ох-

лаждения [42]. Независимо от способа получения кубического льда, при нагревании происходит его превращение в гексагональный лед. Кристаллы кубического льда обладают более сглаженными формами по сравнению с гексагональным и считаются менее повреждающими для клеточных структур. Но в силу собственной нестабильности при отогреве биообъектов он может переходить в более травмирующую гексагональную форму.

Во-вторых, перекристаллизацией называется процесс укрупнения кристаллов льда на стадии отогрева биообъектов [43,44]. Подавляющее большинство протоколов криоконсервации тре-

бует достаточно высоких скоростей оттаивания. Именно явления перекристаллизации полагают ответственными за снижение жизнеспособности криоконсервированного материала при медленных скоростях оттаивания.

Что можно ожидать с точки зрения перекристаллизации от клатратных структур? Газогидраты имеют несколько модификаций кристаллов, но в области невысоких давлений (до 10 атм) модификация кристаллической решетки зависит от клатратобразующего агента и не меняется при понижении/повышении температуры [39]. Таким образом, изменений модификации кристаллов газогидратов в процессе замораживания-оттаивания биообъектов ожидать не приходится.

Второй вариант перекристаллизации – рост кристаллов на стадии оттаивания – возможен и для газогидратов. Скорость роста кристаллов зависит от концентрации и подвижности молекул, составляющих кристалл. Скорость диффузии большинства клатратных газов существенно ниже коэффициента диффузии воды. Концентрация молекул газа в растворе также снижена по сравнению с молекулами воды. Поэтому процессы перекристаллизации газогидратов будут лимитированы молекулами газа и должны происходить значительно медленнее, чем перекристаллизация кристаллов воды. Можно ожидать, что перекристаллизация газогидратов не станет причиной критических повреждений в процессе оттаивания биологического материала.

В процессе криоконсервации с газогидратами мы можем столкнуться с еще одним видом перекристаллизации, незнакомым в классической криобиологии, – образованием водных кристаллов, сопутствующим диссоциации газогидратов (см. раздел «Нуклеаторы и блокаторы нуклеации»). Повреждающее воздействие перекристаллизации такого рода еще предстоит исследовать.

**Сравнение повреждающих факторов для биологических структур в процессе классической криоконсервации (медленным способом) и криоконсервации с образованием газогидратов.** К чему может привести замещение кристаллов льда на кристаллы газогидратов в технологии замораживания биообъектов?

Перед анализом напомним, что криоконсервация биообъектов может проходить двумя способами: 1) медленным или программным замораживанием и 2) витрификацией. Первый способ подразумевает контролируемое образование кристаллов льда, при этом режим замораживания подбирается таким образом, чтобы повреждающий эффект льдообразования свести

к минимуму. Второй способ позволяет избежать образования кристаллов льда как таковых. Несмотря на некоторые отличия, кристаллы газогидратов образуются и растут по тем же законам, что и кристаллы льда. Поэтому сравнивать повреждающий эффект кристаллов газогидратов имеет смысл в аспекте медленного замораживания. Роль клатратных газов в технологиях витрификации будет рассмотрена отдельно.

Одна из основных идей, повторяемая в работах по криоконсервации биообъектов с использованием газогидратов, состоит в меньшей травмоопасности газогидратов [4]. Действительно, газогидраты обладают более рыхлой структурой, причем геометрия кристаллов газогидратов в большей степени напоминают более безопасный кубический лед, чем гексагональный. Мы вправе ожидать, что механические повреждения клеток кристаллами газогидратов будут снижены по сравнению с действием кристаллов льда.

Механические повреждения клеток кристаллами льда очень часто происходят не на стадии замораживания, а на стадии оттаивания, вследствие процессов перекристаллизации [43,44]. В отличие от кристаллов льда, газогидраты гораздо менее подвержены процессам перекристаллизации. Главной опасностью следует считать возможное образование водных кристаллов, сопутствующее диссоциации газогидратов.

Однако формирование кристаллов льда опасно не только из-за механических повреждений. В процессе вымораживания воды в оставшемся незамерзшим растворе концентрируются соли, криопротекторы, прочие вещества. При оттаивании происходит обратный процесс. В результате этого, в процессе образования и таяния льда клетки испытывают колоссальные осмотические напряжения. При образовании и диссоциации газогидратов должно происходить то же самое. Возможно, осмотические шоки будут несколько ниже при одновременном образовании газогидратов вне и внутри клетки, однако это остается спорным вопросом. С одной стороны, нуклеация газогидратов скорее всего будет проходить во внеклеточном пространстве, а не внутри клетки (см. раздел «Кристаллизация воды и газогидратов»), с другой – безопасность внутриклеточного образования газогидратов в настоящее время не подтверждена.

В литературе существуют данные о том, что ксенон в водных растворах способен стабилизировать структуру белков, в том числе в зоне отрицательных температур [45]. Однако денатурация белков не является ведущим ме-

**Таблица 4.** Сравнение повреждающих факторов при замораживании биообъектов медленным способом и криоконсервации с образованием газогидратов

Повреждающий фактор	Образование (таяние) кристаллов воды	Образование (распад) кристаллов газогидратов
Механическое повреждение кристаллами	Гексагональный лед сильно повреждает мембранные структуры. Кристаллы льда значительно сглаживаются при добавлении криопротекторов	Кристаллы льда имеют сглаженную и рыхлую структуру, повреждения незначительны
Сдавливание клеток массивом льда	При сдавливании клетки гибнут	Неизвестно. Возможно, клетки могут выдержать давление при сдавливании рыхлыми структурами газогидратов
Осмотический и постосмотический шок, вызванный замораживанием воды	Идентично	
Изменение конформации белков, вызванное обезвоживанием при замораживании	Замерзание воды обезвоживает белки	Гидратобразование, так же как и льдообразование, способно обезвоживать биологические структуры. Однако существует гипотеза, что ксенон способен поддерживать гидратную оболочку вокруг белков при обезвоживании и, таким образом, является протектором белков
Перекристаллизация	Высокая вероятность перекристаллизации	Низкая вероятность перекристаллизации
Бурное выделение газа при разогреве объектов и распаде кристаллов	Нет	Высокая вероятность повреждения клеток выделяющимися газами. Требуется разработка специальных приемов, снижающих повреждающий эффект

ханизмом криповреждений, ее роль в потере жизнеспособности биологического материала при криоконсервации невелика, соответственно и роль протекции белков в криозащите нельзя считать значительной.

Отдельно стоит проблема разработки методов безопасной диссоциации газогидратов в живых системах. Это наиболее проблемный момент в газогидратной криоконсервации. Режимы диссоциации будут зависеть от количества газогидрата в живой системе. При образовании небольших количеств, в том случае, если образование газогидрата будет играть вспомогательную роль в технологии криоконсервации, вероятно, можно будет обойтись обычными приемами декомпрессии: некоторое повышение давления в зоне распада газогидрата, для повышения растворимости газа в жидкости и впоследствии понижение давления с такой скоростью, при которой дегазация объекта не вызовет повреждений. Однако в том случае, если разрабатываемые технологии потребуют связывания газогидратами большого объема воды, необходимо будет разрабатывать специальные приемы, замедляющие разложение гидратов на

стадии разогрева и возвращения материала в нормальные физиологические условия.

Краткий перечень повреждающих воздействий образования и распада кристаллов льда и газогидратов приведен в табл. 4.

#### КЛАТРАТООБРАЗУЮЩИЕ ГАЗЫ И СТЕКЛОВАНИЕ РАСТВОРОВ

Образование твердых газогидратов, конкурирующих с кристаллами льда, не является единственным возможным способом оказать влияние на структуру водных растворов в процессе замораживания. Рядом авторов высказано предположение, что инертные газы, в частности ксенон, могут способствовать стеклованию биологических растворов. Так, в работах 2014 г. авторы указали на то, что растворенный ксенон способен замедлять рост кристаллов льда [6] и увеличивать вязкость раствора [46]. В работе по криоконсервации мультипотентных мезенхимальных клеток с применением ксенона было обращено внимание на то, что в замороженных образцах клеточной суспензии, насыщенных ксеноном, не наблюдалось видимых кристаллов льда [47].

Ксенон влияет на структуру воды и водных растворов, и не исключено, что он может оказывать влияние и на процессы кристаллизации воды. Газы растворяются в воде по «пустотному механизму», внедряясь в полости, образованные молекулами воды. Вблизи неполярных частиц происходит упрочнение водородных связей, уменьшение трансляционного движения ее молекул и увеличение общей структурированности раствора [48]. При растворении ксенона в спиртах (к которым относятся многие криопротекторы) могут появляться новые структуры [18,49].

Растворенный в воде газ, как и любое растворенное в воде вещество, будет частично вытеснять молекулы воды и взаимодействовать с ними, изменяя показатель активности воды. Соответственно, будет изменяться температура равновесной кристаллизации воды, которая зависит от показателя активности воды [24]. В то же время в связи с невысокой растворимостью ксенона в воде нельзя ожидать, что снижение показателя активности воды и температуры равновесной кристаллизации воды будет существенным. С другой стороны, упрочнение водородных связей может менять энергию зарождения зародышевых кристаллов и влиять на фактическую температуру гомогенной и гетерогенной нуклеации.

Было предположено, что молекулы ксенона могут накапливаться в рыхлом слое на границе вода–лед и замедлять рост кристаллов льда. Для проверки данного предположения был проведен большой объем вычислений с целью молекулярного моделирования взаимодействия молекул ксенона с водой и льдом при температурах вблизи 0°C и ниже [38]. По результатам моделирования авторы данной работы пришли к выводу, что ксенон не оказывает какого-либо воздействия на рост кристаллов льда.

Еще один возможный механизм влияния на образование кристаллов льда – воздействие на гетерогенные сайты нуклеации. В том случае если кристаллы гидратов образуются выше точки нуклеации воды, то они могут «занимать» наиболее эффективные нуклеаторы, присутствующие в растворе, делая их недоступными для воздействия на жидкую воду. В этом случае средняя температура гетерогенной нуклеации воды может опуститься на несколько градусов. Нам не удалось обнаружить в научной литературе данных, подтверждающих или опровергающих данное предположение.

Перспективной с точки зрения разработки технологии криоконсервации представляется гипотеза о возможном влиянии ксенона на вязкость водных растворов [46]. Витрификация

(или стеклование) – это переход растворов из жидкого состояния в твердое, минуя процесс кристаллизации. Витрификация основана на свойстве жидкостей увеличивать вязкость при охлаждении. Если жидкость достигает вязкости, характерной для твердого тела (примерно  $10^{13}$  П), без инициации кристаллообразования, то аморфное состояние, характерное для жидкой фазы, становится достаточно стабильным и может существовать долгое время. Таким образом, для витрифицирующих технологий в криоконсервации вязкость растворов и степень ее нарастания в процессе охлаждения является одним из ключевых факторов.

Молекулярное моделирование, проведенное в работе [38], показало, что с возрастанием концентрации ксенона и с понижением температуры вязкость раствора возрастает очень быстро. При температурах ~ 255–250 К вязкость растворов ксенона становится настолько высокой, что за время расчета (~ 100 нс) термодинамические параметры системы не успевают прийти к равновесию, это позволяет предположить возможность витрификации раствора.

Высказанные соображения позволяют надеяться, что насыщение растворов ксеноном и, возможно, другими гидрофобными газами действительно может способствовать витрификации, однако для конкретизации необходимых параметров необходимы экспериментальные исследования.

#### ВЛИЯНИЕ КЛАТРАТОБРАЗУЮЩИХ ГАЗОВ НА ЛИПИДНУЮ ФАЗУ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Повреждающее воздействие охлаждения в процессе криоконсервации не ограничивается структурными перестройками водных растворов. Значительные повреждения клетка может получать за счет температурных перестроек в липидном бислое мембран. Охлаждение приводит к изменению взаимной растворимости липидов, входящих в состав мембран, и приводит к их латеральному разделению. В процессе фазового перехода жидкий кристалл/гель изменяется упаковка молекул липидов, что приводит к уменьшению площади мембраны и образованию микротрещин, нарушающих полупроницаемые свойства мембран. Температурные изменения конформации липидов приводят к выдавливанию слабозаякоренных белков с поверхности мембраны. При охлаждении мембрана теряет и некоторые липиды.

Возникает вопрос, не могут ли клатратобразующие газы оказывать воздействие на клеточные мембраны, защищая их от холодого

**Таблица 5.** Характеристика фазового перехода гель/жидкий кристалл в липосомах из диолеилфосфотидилохолина, полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии [52]

Давление насыщения ксеноном, бар	Образование газогидратов в суспензии	Средняя температура фазового перехода фосфолипида, °С	Нижняя граница фазового перехода фосфолипида, °С	Верхняя граница фазового перехода фосфолипида, °С	Интервал фазового перехода, °С
Нет ксенона	–	11,8	11,7	12,2	0,5
3	Нет	9,3	8,5	10,1	1,6
10	Нет	4,8	3,3	6,4	3,1
10	Есть	9,2	8,9	9,6	0,7
13	Есть	9,2	8,9	9,6	0,7
17	Есть	9,4	8,8	10	1,2
Ксенон дегазирован	–	11,4	11,0	11,8	0,8

воздействия или, напротив, провоцируя повреждения в липидном бислое мембран?

Все клатратобразующие газы относятся к гидрофобным, т.е. обладают высоким соотношением растворимость в липидах/растворимость в воде. Соответственно, при проникновении в живые ткани клатратобразующие газы будут испытывать сродство к гидрофобным компонентам клеток, в том числе к липидному бислою мембран. Действительно, рядом авторов экспериментально и с помощью математического моделирования подтверждено, что ксенон [50–53], а также другие инертные газы [54], поступающие в организм, аккумулируются в липидном бислое. При этом значительное количество молекул газа сосредотачивается в центральной части бислоя, где смыкаются гидрофобные «хвосты» противоположных монослоев мембраны [51,52,54], также часть молекул газа локализуется рядом с изломами углеродной цепи жирных кислот в месте двойных связей [52].

Внедрение газа в липидный бислой приводит к увеличению толщины мембраны. В условиях нормального давления сильнее всего меняет толщину мембраны наиболее гидрофобный инертный газ – ксенон. При этом увеличение толщины мембраны главным образом происходит за счет «раздвижения» двух монослоев мембраны, молекулами газа, внедренными в центральную часть бислоя [52].

Изменяется и латеральная плотность упаковки липидов в фосфолипидном бислое. В мембране, насыщенной газом, на единицу площади приходится меньшее количество фосфолипидных молекул, чем в интактной. При насыщении фосфотидилохолиновой мембраны ксеноном в условиях нормального атмосферного давления площадь мембраны увеличивается примерно на 10% [54].

Инертные газы влияют не только на гидрофобный бислой мембраны. За счет изменения структурированности водородных связей инертные газы увеличивают гидратированность гидрофильных групп фосфолипидов мембраны. При этом парадоксальным образом наиболее существенное влияние на этот параметр оказывают наиболее легкий гелий и наиболее тяжелый ксенон (еще более тяжелый родон исследован не был) [52]. К сожалению, температурная зависимость этого параметра не исследовалась.

Насыщение мембраны ксеноном оказывает влияние на фазовые переходы в липидном бислое мембраны. В табл. 5 представлены экспериментальные данные калориметрии фазовых переходов искусственной фосфотидилохолиновой мембраны в присутствии ксенона под давлением до 10 атм [52]. Как следует из термограммы, ксенон снижает температуру фазового перехода и делает его более растянутым. При насыщении суспензии липосом ксеноном под давлением 10 атм температура фазового перехода в мембранах снижается на 7°С, что является очень существенным сдвигом. Похожее действие характерно для холестерина, который является известным стабилизатором клеточных мембран при охлаждении и замораживании и заметно снижает количество криповреждений [55]. В работе [52] также приводятся данные по влиянию клатратобразования ксенона в окружающем мембрану растворе на фазовые переходы в липидном бислое (см. табл. 5). Можно заметить, что при образовании газогидратов в окружающем растворе влияние ксенона на фазовый переход значительно снижается. Это может означать только то, что при образовании твердых клатратов в растворе ксенон выходит из мембраны и переходит в кристаллы газогидрата. В то же время некоторое количество

ксенона все же остается в мембранах, так как возврата к значениям, характерным для мембран в отсутствие ксенона, не происходит. Миграцию ксенона из липидного окружения в кристаллы газогидратов в момент их образования обязательно нужно учитывать при моделировании режимов криоконсервации в присутствии клатратных газов. Тем более что такая миграция может осуществляться не только с ксеноном, сосредоточенным в мембранах, но и с ксеноном, связанным в гидрофобных карманах белков.

В целом можно предположить существенное влияние ксенона на поведение биологических мембран при криоконсервации по крайней мере при давлениях три и более атмосфер. На состоянии мембран при охлаждении и замораживании может сказываться не только изменение характеристик фазовых переходов. Изменение толщины и площади липидного бислоя мембраны также может способствовать сохранению целостности мембран в процессе охлаждения, предотвращая или минимизируя образование микротрещин, образующихся вследствие уплотнения упаковки липидов при фазовом переходе. Экспериментальных подтверждений данного предположения в доступной литературе не найдено.

#### ВЛИЯНИЕ ГАЗОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ

Воздействие холода на биологический материал в процессе криоконсервации проявляется значительно раньше процессов кристаллизации воды. Прежде чем материал будет заморожен, он должен преодолеть гипотермическую стадию охлаждения, которая также является повреждающим фактором. Многие газы способны модулировать жизнеспособность животных клеток в гипотермических условиях. Обычно это происходит за счет торможения метаболизма, которое способствует выживаемости клеток в неблагоприятных условиях, в том числе при холодом и осмотическом стрессах [83].

**Аргон, криптон, ксенон.** Все инертные газы относятся к нетоксичным веществам, поскольку практически не вступают в химические реакции. Однако они не являются абсолютно нейтральными, проявляя определенное воздействие на биологические объекты.

Ксенон известен как один из наиболее перспективных современных анестетиков [56–60]. Ксеноновый наркоз практически не оказывает на организм человека токсического или побоч-

ного действия. Ксеноновая анестезия, в отличие от анестезии закисью азота, не имеет тератогенного потенциала [61]. Для обеспечения надежной общей анестезии применяют газовые смеси с 63–70 об.% ксенона. Вдыхание ксенона обеспечивает быстрое введение пациента в наркотическое состояние и быстрый выход из него после прекращения подачи газа [62].

Аргон и криптон не проявляют свойств анестетиков при нормальном атмосферном давлении, однако сочетание ингаляции газом с гипербарией способно вызвать анестезию. Аргон способен вызвать наркотическое состояние при давлении более 0,2 МПа ( $\approx 2$  атм). Газовая смесь аргона с кислородом обеспечивает устойчивую анестезию под давлением 0,4–0,8 МПа [63,64]. Наркотические свойства криптона выше, чем у аргона, и заметно ниже по сравнению с ксеноном [65]. Криптон, по-видимому, может обеспечить хирургическую стадию анестезии под давлением около 0,3 МПа [66].

Анестезия тяжелыми инертными газами не только обеспечивает введение пациентов в наркотическое состояние, но и частично может способствовать функционированию организма в стрессовых условиях. При ксеноновой анестезии хорошо поддерживается сопротивление сосудов и артериальное давление. Считается, что ингаляция ксеноном может способствовать поддержанию этих показателей при воздействии посторонних неблагоприятных факторов [56].

Воздействие ксенона на изолированное сердце не меняет его физиологических характеристик, не оказывает воздействия на частоту сокращений и не изменяет ответ на воздействие инотропных агентов [67,68]. Электрофизиологические исследования показали отсутствие влияния ксенона на функционирование ионных каналов кардиомиоцитов в культуре [67,69].

Ксенон способен влиять на иммунную систему млекопитающих. Он активизирует продукцию цитокинов моноцитами и поддерживает анитибактериальные свойства нейтрофилов и моноцитов [70,71].

С точки зрения криобиологии наибольший интерес представляет наличие у инертных газов органопротекторного действия. Существует большое количество свидетельств кардиопротекторного действия ксенона на ишемизированное сердце *in vivo*, а также нейропротекторного действия ксенона при локальной и общей ишемии, травматических повреждениях мозга (см. обзоры [59,72]). При этом органопротекторный эффект наблюдается не только при парциальном давлении ксенона, соответствующем ане-

стезирующему воздействию, но и при более низких концентрациях.

Особый интерес представляет тот факт, что нейропротекторное действие ксенона усиливается, если применять его в сочетании с гипотермией. Данный эффект был продемонстрирован в исследованиях с модельным гипоксическим повреждением недельных крысят [73]. Авторами показано значительное снижение гипоксических повреждений в гипотермических условиях в присутствии ксенона. При этом показано, что нейропротекторные свойства ксенона связаны с подавлением апоптоза клеток, вызванных гипоксией. Между тем известно, что явления апоптоза играют существенную роль в снижении продолжительности жизни клеток после замораживания-оттаивания [74–76]. Можно предположить, что криоконсервация в присутствии ксенона снизит явления апоптоза в размороженных клетках.

Аргон, аналогично ксенону, способен повышать жизнеспособность животных клеток в условиях гипоксии [77] и демонстрирует нейропротекторный эффект при моделировании повреждений нервной ткани *in vitro* [78] и *in vivo* [79].

Физиологическое действие криптона исследовано не так широко, как ксенона. Показано, что инкубирование яиц японского перепела в атмосфере криптона с кислородом под давлением 3 кгс/см<sup>2</sup> не нарушает развитие эмбрионов [80]. Насыщение воды криптоном повышает скорость регенерации планарий и снижает токсическое действие аммиака на этих животных [81].

Особенно интересен опыт гипотермического хранения изолированной почки в среде, насыщенной аргоном и криптоном, с последующей трансплантацией. В работе [82] сохраняли почку крысы в течение 6 ч при 4°C в растворе для хранения органов «Celsog», насыщенном аргоном либо ксеноном. Затем почку пересаживали реципиенту. Для контроля были использованы почки, сохранявшиеся в обычном режиме или в растворе, насыщенном азотом. Среди крыс, получивших почку после хранения в инертных газах, смертность в течение двух недель наблюдения была ниже, по сравнению с контролем. Клиренс креатинина через 7 и 14 сут после пересадки был достоверно выше, а уровень альбумина в моче достоверно ниже в экспериментальных группах. При этом особенно способствовал сохранению функциональности почек аргон. Показатели пересаженных почек, сохранявшихся в растворе, насыщенном ксеноном, были значительно лучше, чем в контроле, но уступали трансплантатам, сохранявшимся в

аргоне. Гистологический анализ почек не противоречил физиологическим показателям.

Таким образом, тяжелые инертные газы имеют ряд биологических свойств, благоприятствующих сохранению органов. Можно предположить, что при применении этих газов в качестве криопротекторов, они не будут оказывать токсического воздействия на клетки, ткани и органы. Более того, на первом этапе криоконсервации – подготовке органов к замораживанию – инертные газы способны оказывать протективное действие, защищая биологический объект от гипоксии. Также можно надеяться на частичную блокировку апоптоза, инициированного холодом воздействием.

**Азот.** Длительная эволюция жизни на земле выработала механизмы выживания живых существ в самых разных условиях, в том числе и при воздействии различных неблагоприятных факторов. Одним из природных неблагоприятных факторов для аэробных организмов являются условия пониженной концентрации кислорода – гипоксии. Существует широкий спектр физиологических и поведенческих ответов организма на пониженную концентрацию кислорода. На клеточном уровне такой реакцией может быть активация бескислородных или энергосберегающих метаболических путей, или снижение уровня метаболизма. Последний вариант физиологического ответа на гипоксию является широко распространенным явлением [84–88].

В искусственных условиях гипоксию обычно моделируют созданием азотной атмосферы с добавлением заданной концентрации кислорода. Азот, в отличие от углекислого газа, не изменяет кислотно-щелочной баланс и не имеет способности блокировать сайты связывания кислорода, подобно угарному газу или сероводороду. Гипоксию на фоне атмосферы азота иногда называют азотной гипоксией для того, чтобы отличить ее от гипоксии на фоне других газов. Для использования азотной гипоксии как фактора подавления метаболизма нужно учитывать, что снижение концентрации кислорода разного уровня может вызывать совершенно различные реакции организма. Например, эмбрионы нематоды *Caenorhabditis elegans*, одного из традиционных объектов исследования физиологии гипоксии, легко переносят практически полное отсутствие кислорода (< 0,001 кПа кислорода) и умеренную гипоксию (0,25–1,00 кПа O<sub>2</sub>), но при этом гибнут при уровне кислорода в пределах 0,01–0,10 кПа. Причина в том, что при разном уровне гипоксии срабатывают разные триггеры защитных реакций, при этом диапазон 0,01–0,10 кПа O<sub>2</sub> находится

за пределами зоны их активации. Добавление другого агента, способного самостоятельно вызвать гипоксию, – угарного газа – кардинально повышает выживаемость эмбрионов в условиях гипоксии 0,01–0,1 кПа  $O_2$ , так как инициирует активацию защитных механизмов [89].

Замещение растворенных атмосферных газов азотом применяют в практике гипотермического хранения биообъектов, например при хранении спермы сельскохозяйственных животных при температуре 5°C [90,91].

**Углекислый газ.** Факт торможения метаболизма клеток в атмосфере с повышенной концентрацией углекислого газа хорошо известен. При этом торможение метаболизма может наблюдаться как при пониженном уровне кислорода, так и при его физиологической концентрации. Интересно, что двуокись углерода эффективно снижает активность сперматозоидов млекопитающих, несмотря на то, что эти клетки способны к поддержанию активного метаболизма и движения в анаэробных условиях за счет гликолиза. Это свойство используется в практике хранения спермы сельскохозяйственных животных [92–94]. Барботаж углекислым газом суспензии сперматозоидов непосредственно перед замораживанием повышает подвижность криоконсервированной спермы быка и жеребца на 5–10% [95,96]. В практике криобиологии благоприятное воздействие углекислого газа при охлаждении биообъектов объясняют исключительно влиянием на метаболизм, однако сравнение некоторых характеристик углекислого газа и ксенона наводит на мысль, что возможны и другие механизмы воздействия  $CO_2$  на выживаемость клеток при криоконсервации. Например, если сопоставить коэффициенты растворимости углекислого газа и ксенона в жирах (1,27 для углекислого газа и 1,7 для ксенона [9]), можно предположить, что углекислый газ при повышенных концентрациях, аналогично ксенону (см. раздел «Влияние клатратобразующих газов на липидную фазу клеточных мембран»), может концентрироваться в клеточных мембранах и оказывать влияние на фазовые переходы в липидном бислое в процессе замораживания-оттаивания биологического материала.

**Угарный газ.** Монооксид углерода обладает свойством связываться с гемоглобином крови и миоглобином, а также угнетает клеточное дыхание. Обнаружено, что при гипоксии некоторые организмы вырабатывают эндогенный монооксид углерода, который активирует каскад событий, подавляющих апоптоз и смягчающих повреждающее действие гипоксии [97]. Это свойство можно использовать для снижения

ишемических повреждений тканей, предназначенных для трансплантации [98,99]. В доступной литературе не найдено данных о попытках использовать монооксид углерода для повышения выживаемости тканей или клеточных суспензий при криоконсервации, однако такое использование данного гипометаболита кажется вполне возможным.

**Сероводород.** Сероводород способен обратимо подавлять метаболизм клетки посредством ингибирования цитохром *c*-оксидазы. Под воздействием  $H_2S$  (80 ppm) у мышей снижается потребление кислорода и снижается температура тела. При этом воздействие  $H_2S$  в течение 6 ч не приводит к необратимым последствиям, экспозиция животных в нормальной атмосфере приводит в норму физиологические показатели в течение часа [100]. Для нас особый интерес представляет факт, что сероводород способен образовывать газогидраты при атмосферном давлении и околонулевых температурах, т.е. в этом отношении он близок по свойствам к ксенону [26]. Несмотря на то что в больших дозах сероводород крайне токсичен, можно рассматривать вопрос о включении его в клатратобразующие газовые смеси в небольших концентрациях.

**Гексафторид серы.** Гексафторид серы или элегаз имеет формулу  $SF_6$  и является химически инертным газом. Он образует устойчивые газогидраты в условиях, близких к ксенону. При этом в отличие от ксенона элегаз не имеет анестезирующих свойств. В работе [101] гексафторид серы был использован для иммобилизации планарий. Планарий помещали в атмосферу элегаза под давлением 7 атм. При этом планария теряла подвижность, а ее тело покрывалось белым налетом, что авторы интерпретировали как образование клатратов. После постепенного снижения давления и возвращения в нормальную атмосферу к планариям возвращалась подвижность. Планарий после эксперимента наблюдали в течение суток, никаких отклонений в жизнедеятельности зафиксировано не было. Гексафторид серы можно рассматривать как один из возможных кандидатов на применение в клатратной криоконсервации.

#### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛАТРАТНЫХ ГАЗОВ

В литературе описано несколько попыток использовать инертные газы для повышения выживаемости клеток, тканей и органов в процессе замораживания до отрицательных температур.



**Криоконсервация клеточных суспензий.** В работе [102] было исследовано влияние ксенона на жизнеспособность клеток и окислительно-восстановительный баланс клеточной культуры тимоцитов крыс линии Wistar при 24-часовом хранении в гипотермических условиях. Авторы проверяли не только воздействие низких положительных температур, но и замораживание суспензии клеток до  $-34^{\circ}\text{C}$ . Насыщение клеточной суспензии ксеноном проводили при давлении 0,25 атм (здесь и далее имеется в виду избыточное давление, если особо не указано иное). Ксенон статистически значимо повышал выживаемость клеток как при гипотермическом хранении, так и при замораживании до  $-35^{\circ}\text{C}$ . Особенно существенным было повышение выживаемости клеток при замораживании в отсутствие классических криопротекторов: 35% жизнеспособных клеток в культуре, обработанной ксеноном, против 11% выживших клеток в контроле. В работе также исследовали антиоксидантное и прооксидантное воздействие ксенона. Авторы полагают, что повышение выживаемости клеток при гипотермическом хранении может быть связано с модуляцией ксеноном функционирования собственных антиоксидантных и прооксидантных систем тимоцитов.

Защитное воздействие ксенона выявлено в экспериментах по замораживанию лейкоцитов до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  [7,103,104]. Лейкоцитарный концентрат насыщали ксеноном под давлением 0,6 атм в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем давление плавно сбрасывали и замораживали материал в два этапа; 15 мин выдерживали при  $-28^{\circ}\text{C}$ , затем помещали в морозильную камеру с температурой  $-80^{\circ}\text{C}$ , где и оставляли на хранение на одни сутки. Оценка целостности плазматической мембраны лейкоцитов с витальным красителем трипановым синим показала, что после деконсервирования целостность клеток составила  $64,5 \pm 14,4\%$  от исходной. Уровень среднего цитохимического коэффициента после отогревания лейкоцитов не имел достоверных отличий от показателя до замораживания. Это указывает на сохранность мембран лизосом, чувствительных к стресс-воздействию. Несмотря на то что уровень сохранности лейкоцитов при криоконсервации с ксеноном существенно уступает традиционному методу, такие показатели выживаемости свидетельствуют о наличии криозащитного эффекта ксенона. Однако механизм криозащиты неясен. Количество газа, поглощенного при такой обработке материала, недостаточно для того, чтобы газогидраты связали существенное количество воды. По свидетельству авторов, увеличение давления до 0,9 атм приво-

дило к сильному вспениванию в момент декомпрессии и снижению выживаемости клеток [7].

Высокая выживаемость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток показана в работах группы екатеринбургских исследователей [47,105]. Суспензию клеток насыщали ксеноном при нормальном атмосферном давлении и замораживали медленным методом по стандартной для клеточных культур методике. Материал хранили в парах жидкого азота при температуре  $-150^{\circ}\text{C}$  до шести месяцев. Выживаемость клеток, оцененная окрашиванием витальными красителями и тестированием клоногенной активности, превосходила результаты, получаемые традиционным методом с применением диметилсульфоксида. При этом авторы особо отмечают, что обработка ксеноном, в отличие от диметилсульфоксида, не приводит к ограничению дифференцировочных потенциалов стволовых клеток. Авторы исследования полагают, что ксенон способствует витрификации суспензии. Нам представляется сомнительным, что при таких низких скоростях охлаждения могла произойти витрификация раствора. В то же время нельзя исключить, что к витрификации приводило сочетание ксенона с каким-либо агентом, содержащимся в культуральной среде, либо продуцируемого клетками.

В работе [106] описаны эксперименты по замораживанию под давлением ксенона суспензий перевиваемых клеточных культур СНО-К1 (клетки яичника китайского хомячка) и NIH-3T3 (фибробласты мыши). В данной работе клетки замораживали после насыщения ксеноном под давлением до 7 атм. Замораживание проводили по медленному и быстрому протоколу. Высокое давление насыщения ксеноном потребовало разработки специального режима декомпрессии. Тем не менее, несмотря на применение декомпрессии, криоконсервация с ксеноном без добавления классических криопротекторов по медленному протоколу приводила к полной гибели клеток, а криоконсервация с добавлением диметилсульфоксида не показала разницы в выживаемости культур в присутствии и отсутствии ксенона. При применении быстрого замораживания ксенон показал некоторое положительное воздействие на выживаемость культур клеток. Криоконсервация с ксеноном без классических криопротекторов по быстрому методу (прямое погружение барокамеры с клеточной суспензией в жидкий азот) позволила получить до 20% жизнеспособных клеток после оттаивания (оценка путем окрашивания трипановым синим). Замораживание в контрольном эксперименте без ксенона приводило к гибели клеточной суспензии.

Тот же коллектив авторов проводил эксперименты по криоконсервации дрожжей (*Saccharomyces cerevisidae*) с ксененом под давлением от 3 до 7 атм [107]. Замораживание проводили в два этапа – сначала медленно до  $-20^{\circ}\text{C}$ , после часовой выдержки при этой температуре барокамеру с клеточной суспензией погружали в жидкий азот. Дрожжевые клетки достаточно устойчивы к замораживанию и позволяют получить около 35% живых клеток без каких-либо криопротекторов. Воздействие ксенона во всех испытанных режимах увеличивало количество выживших клеток в два раза. Достоверно значимое повышение выживаемости под воздействием ксенона наблюдали как без добавления классических криопротекторов, так и на фоне добавления 10% глицерина.

**Криоконсервация тканей и органов.** Помимо криоконсервации клеточных суспензий предпринимались попытки «газовой» криоконсервации тканей и органов.

Группой авторов подана заявка на патент по криоконсервации яичниковой ткани с использованием ксенона [108]. Лоскут яичниковой ткани помещали в контейнер и подавали ксенон под давлением 1,5 атм. Далее контейнер без сброса давления ксенона выдерживали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , после чего погружали его в жидкий азот. Отогревание проводили при комнатной температуре в течение 5–15 мин, после чего контейнер вскрывали, сбрасывая давление ксенона. К настоящему моменту патентная заявка отозвана (дата 09.09.2013 г.).

Одна из наиболее резонансных работ в области криоконсервации биообъектов описана в российском патенте «Способ криоконсервации органов и тканей *in situ*» [109]. Авторы описывают криоконсервацию целой крысы в смешанной атмосфере ксенона, криптона и аргона. Несмотря на замораживание целого животного, целью работы являлось получение после оттаивания жизнеспособного сердца. Животное помещали в барокамеру в атмосферу ксенона, криптона, аргона в соотношении 2,5:47,5:50 об.% под давлением 1,5 атм, одновременно обеспечивали вентиляцию легких смесью воздуха и вышеозначенной смеси в соотношении 1:1. Конструкция барокамеры позволяла охлаждать животное проточной водой до температуры  $0^{\circ}\text{C}$ . После охлаждения крысы до  $0^{\circ}\text{C}$  (ректальная температура) воду вытесняли смесью инертных газов (без воздуха), прекращали принудительное дыхание и одновременно охлаждали камеру до  $-43^{\circ}\text{C}$ . После достижения данной температуры избыточное давление в барокамере снимали и погружали камеру в жидкий азот. Согревание крысы, находящейся внут-

ри барокамеры, до  $0^{\circ}\text{C}$  осуществляли через окружающую животное газовую среду при нагревании всей поверхности барокамеры теплым воздухом. По окончании согревания у крысы-донора производили забор сердца. Выделенный трансплантат отмывали физиологическим раствором через аорту и выполняли пересадку сердца на брюшные сосуды крысы-реципиента. Всего было поставлено 10 опытов. Донор – белая крыса линии Wistar, самец массой 300 г. Через 3,5 мин после начала коронарной перфузии консервированное сердце полностью восстанавливало сократительную активность с пульсом 180 ударов в минуту. От начала полной остановки сердца, вызванной холодовой кардиоплегией, и до восстановления сократительной активности у пересаженного органа временной интервал был в пределах шести часов. За пересаженным сердцем наблюдали три часа, после чего крысу-реципиента выводили из эксперимента.

Описанный эксперимент, который можно в полном смысле назвать революционным, вызывает ряд вопросов. Авторы полагают, что органы, консервированные таким способом, можно хранить в жидком азоте неограниченно долго. Однако интервал времени от остановки сердца до восстановления сердечбиений в эксперименте составлял 6 ч. В этот интервал времени входила не только процедура охлаждения и замораживания от  $0^{\circ}\text{C}$  до температуры жидкого азота, но и процедура разогрева, выделения и отмывки изолированного органа, подсадка органа реципиенту. Между тем описанная методика должна обеспечивать очень медленные скорости замораживания и оттаивания, что вызывает вопрос, до какой именно температуры происходило охлаждение сердца. В то же время температура органа в нижней точке охлаждения явно находилась значительно ниже  $0^{\circ}\text{C}$ , что в любом случае является важным шагом на пути консервации органов. Следует также отметить, что выживание сердца в зоне отрицательных температур получено без использования традиционных криопротекторов. В отличие от большинства работ в качестве клатратобразующего газа использовали смесь с преобладанием аргона и криптона, а не чистый ксенон, как в других работах. Результаты согласуются с данными работы [82], в которой было показано, что аргон в большей степени, чем ксенон, способствует сохранению изолированной почки кролика в условиях гипотермии.

Криоконсервации сердечных тканей были посвящены работы [5,101(EXAMPLE 1)]. Исеченное сердце мыши в небольшом количестве физиологического раствора Кребса-Хенселита

помещали в металлическую барокамеру, насыщали смесью ксенона и кислорода (9:1) под давлением около 7 атм (100 psi), охлаждали в парах азота 15 мин, затем погружали в жидкий азот. Классических криопротекторов не использовали. В жидком азоте камеру оставляли в течение 15 мин, после чего ее разогревали при комнатной температуре и исследовали состояние тканей визуальным и с помощью электронной микроскопии. Сохранность тканей, замороженных под давлением ксенона, оценивали выше по сравнению с тканями, замороженными аналогичным образом без ксенона. В митохондриях опытных образцов отсутствовали вздутия, разрывы внутренней и наружной мембран и утечки внутреннего матрикса, в то время как в контрольных образцах перечисленные имелись в наличии. Авторы сделали вывод о том, что ксенон способен защищать внутренние структуры клеток в процессе замораживания.

Та же группа авторов сообщила о возможности криоконсервации с ксеноном или гексафторидом серы целых планарий, однако результатов эксперимента приведено не было [101(EXAMPLE 6)].

Сводная информация о режимах и результатах криоконсервации биообъектов с клатратобразующими газами дана в табл. 6.

**Хранение биоматериала при околонулевой температуре с образованием газогидратов.** Отдельно необходимо отметить исследования, которые формально относятся не к криоконсервации (хранению биообъектов в замороженном состоянии), а к гипотермическому хранению (хранение биообъектов при низких положительных температурах), но которые мы считаем нужным рассмотреть именно в этом разделе. Воздействие ксенона на биообъекты при околонулевой гипотермии позволяет получать газогидраты. В таких условиях сочетается гипотермия и частичный переход воды в твердое состояние (в составе газогидратов), что по сути приближает подобные методы к криоконсервации.

А.И. Пономарев с соавторами [110,111] исследовали сохранность лоскутов кожи человека в присутствии ксенона в гипотермических условиях. Исследуемые лоскуты помещали в специально сконструированную камеру, позволяющую проводить визуальные наблюдения за объектом, подавали ксенон под давлением 3 атм, охлаждали до 2°C и хранили при этой температуре, не снимая давления четверо суток. Как упоминалось выше, после охлаждения кожа приобретала твердую консистенцию, не поддавалась деформации и напоминала ткань, покрытую снегом. После отогрева проводили гис-

тологические исследования и культивирование кожных лоскутов, направленное на экспансию фибробластов. Исследованные срезы консервированных лоскутов морфологически не отличались от интактных, за исключением некоторой вакуолизации цитоплазмы кератиноцитов. Авторы связывают вакуолизацию с декомпрессией образцов после хранения под давлением. Данные по экспансии кератиноцитов подтверждают достаточно высокую сохранность лоскутов кожи. К сожалению, в работе нет сравнительных данных о хранении кожных лоскутов при аналогичном режиме без ксенона, поэтому оценить защитный эффект ксенона в условиях гипотермии достаточно сложно, хотя авторы и делают вывод о его наличии. Авторами подтверждается отсутствие повреждающего эффекта, связанного с образованием гидратов ксенона. В то же время неясно, какое количество воды подвергалось связыванию в процессе консервации. Для понимания механизма выживания биологических объектов в таких условиях необходимо знать количество связанной воды, происходила ли клатратизация в поверхностных слоях или в объеме объекта.

Тот же вопрос возникает при анализе эксперимента по образованию клатратов ксенона и гексафторида серы в теле планарий [101(EXAMPLE 3&4)]. Планарий помещали в атмосферу с ксеноном или гексафторидом (90% клатратобразующего газа, 8% азота, 2% кислорода) под давлением 3,5 атм для ксенона и 7 атм для гексафторида серы, охлаждали камеру до температуры 0 ÷ -5°C. Планарии под воздействием газов теряли подвижность, тело животных приобретало белый цвет и «ватную» консистенцию. После возвращения к нормальной атмосфере и давлению планарии приобретали обычный вид и восстанавливали подвижность. В течение последующих суток гибель планарий не наблюдали.

В отличие от экспериментов с планариями, личинки *Chironomus plumosus* (мотыль) не выживали при образовании клатратов ксенона [106]. Для образования клатратов мотыль выдерживали в атмосфере ксенона под давлением (точное значение не указано), затем, не снижая давления, охлаждали до околонулевых температур, но не допуская кристаллизации воды. При этом наблюдали образование кристаллов газогидратов. При отогреве в теле личинок появлялось большое количество крупных пузырей, сливающихся между собой в «цистерны» внутри хитиновых сегментов, личинки теряли гемолимфу и гибли. Можно предположить, что гибель личинок происходила на стадии диссоциации газогидратов. При этом определить,

**Таблица 6.** Сравнительная характеристика работ по замораживанию биообъектов в присутствии инертных газов

Объект	Применяемая газовая смесь	Давление	Режим охлаждения	Нижняя граница охлаждения, длительность хранения	Условия оттаивания	Результат	Ссылка
Иссеченное сердце крысы	He – 90%, O <sub>2</sub> – 10%	6,5–7 атм	Барокамеру выдерживали 15 мин в парах жидкого азота, затем переносили в жидкий азот; * ≈ 5–15°C/мин.	–196°C, хранение 15 мин	При комнатной температуре, не извлекаемая из барокамеры	Визуально ткани выглядят лучше, по сравнению с контролем. Электронная микроскопия показывает более высокую сохранность митохондрий	[5, 101]
Целая крыса, анализировали только сердце	He:Kr:Ar 2,5:47,5:50 об.%	1,5 атм	До 0°C водяное охлаждение, далее барокамеру помещали в пары жидкого азота, при достижении –43°C переносили в жидкий азот; * ≈ 0,2–2°C/Мин	–196°C, хранение 6 ч	В воздушной среде при комнатной температуре	Восстановление сердцебиений изолированного сердца при пересадке в гетеротопическую позицию	[109]
Яичниковая ткань	He	1,5 атм	До –20°C выдержка 1 ч, далее погружение в жидкий азот; * ≈ 1–3°C/мин. до –20°C, далее 20–40°C/мин	–196°C, время хранения не указано	При комнатной температуре	Нет данных	[108]
Планария	He – 90%, O <sub>2</sub> – 10%	3,5 атм	Барокамеру выдерживали 15 мин в парах жидкого азота, затем в жидком азоте; * ≈ 5–15°C/мин	–196°C, время хранения не указано	Нет данных	Нет данных	[101]
Лейкоциты, гранулоциты	He	0,3 атм	Выдерживали в спиртовой бане –28°C, затем помещали в холодильную камеру –80°C; * ≈ 4–5°C/мин	–80°C, хранение 1 сут	Водяная баня 38°C	Лейкоциты – 95% морфологически целых, 50% живых по окраске трипановым синим; гранулоциты – 51% морфологически целых	[104]
Лейкоциты, гранулоциты	He	Насыщение 0,6 атм; замораживание при нормобарии	Выдерживали в спиртовой бане –40°C, затем помещали в холодильную камеру –80°C; * ≈ 5–10°C/мин	–80°C, хранение 1 сут	Водяная баня 38°C	Лейкоциты – 97% морфологически целых, 65% живых по окраске трипановым синим; гранулоциты – 86% морфологически целых	[104, 7]

Продолжение

Объект	Применяемая газовая смесь	Давление	Режим охлаждения	Нижняя граница охлаждения, длительность хранения	Условия оттаивания	Результат	Ссылка
Лейкоциты, гранулоциты	He	Насыщение 0,6 атм; замораживание при нормобарии	Выдерживали в спиртовой бане -40°C, затем помещали в холодильную камеру -80°C; * ≈ 5-10°C/мин	-80°C, хранение 1 сут	Водяная баня 38°C	Лейкоциты – 54,3% живых по окраске трипановым синим; гранулоциты – 73,5% морфологически целых	[103]
Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки	He	Атмосферное давление	1°/мин до -70°C. Затем погружение в низкотемпературные пары жидкого азота -150°C	-150°C, в парах жидкого азота	Водяная баня 38°C	97% живых по окраске трипановым синим, что на 4% превосходит контроль с применением диметилсульфоксида; способность к дифференцировке не нарушена	[105, 47]
Тимоциты крысы	He	Атмосферное давление	Охлаждали от комнатной температуры до -35°C в течение часа; *не более 1°C/мин	-35°C, 24 ч	Водяная баня 40°C	С ксеноном – 35% выживших клеток, с ксеноном и диметилсульфоксидом – 60%, с диметилсульфоксидом – 53%, без ксенона и криопротекторов –11%	[102]
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisidae</i>	He	2,5-11 атм	Барокамеру выдерживали на спиртовой бане -20°C 1 ч, затем погружали в жидкий азот; * ≈ 2°C/мин до -20°C, затем ≈ 25°C/мин	-196°C	Водяная баня 38°C	Наблюдали положительный эффект ксенона на выживаемость клеток во всех режимах замораживания (на фоне криопротекторов и без их применения)	[107]

Объект	Применяемая газовая смесь	Давление	Режим охлаждения	Нижняя граница охлаждения, длительность хранения	Условия оттаивания	Результат	Ссылка
Перевиваемая культура клеток СНО-К1 и НИН-3Т3	Хе	7 атм	Прямое погружение барокамеры в жидкий азот; * $\approx 25^\circ\text{C}/\text{мин}$	$-196^\circ\text{C}$	В водяной бане $37^\circ\text{C}$ , до $+4^\circ\text{C}$ . Дальнейший отогрев на воздухе $20^\circ\text{C}$ . Декомпрессия в атмосфере гелия	10,5% для культуры СНО-К1 и 22,5% для НИН-3Т3 (по окраске трипановым синим). В контроле гибель клеток	[106]
Перевиваемая культура клеток СНО-К1 и НИН-3Т3	Хе	7 атм; декомпрессия после отогрева в атмосфере гелия	$1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до $-70^\circ\text{C}$ , затем погружение в жидкий азот	$-196^\circ\text{C}$	В водяной бане $37^\circ\text{C}$ , до $+4^\circ\text{C}$ . Дальнейший отогрев на воздухе $20^\circ\text{C}$ . Декомпрессия в атмосфере гелия	Нет выживших (по окраске трипановым синим)	[106]

Примечание. \* – Прямое указание на скорость охлаждения в источнике отсутствует; приведена примерная оценка скорости охлаждения на основе описываемых протоколов.

повреждались ли в первую очередь клетки или межклеточные структуры, невозможно.

Таким образом, некоторыми авторами показано, что применение клатратобразующих газов в процессе криоконсервации приводит к повышению жизнеспособности биологического материала. Тем не менее анализ этих работ порождает ряд вопросов. Во-первых, на основании имеющихся исследований нельзя сделать каких-либо выводов о механизме воздействия ксенона. Нет возможности оценить объем воды, связанной газогидратами, и связать это с выживаемостью материала. В ряде случаев возникает сомнение в образовании кристаллических газогидратов в тканях в процессе криоконсервации (например, в экспериментах, описанных в работе [109]). В проанализированных работах отсутствуют убедительные подтверждения того, что кристаллы гидрата ксенона (или другого газа) повреждают клетки и ткани меньше, чем кристаллы льда.

Одновременно нет доказательств, что при криоконсервации в присутствии клатратобра-

зующих газов задействованы другие механизмы. Предположение о том, что ксенон может способствовать витрификации растворов, имеет ряд обоснований, но требует подтверждения. Описанное в работах [47,105] наблюдение о витрификации насыщенной ксеноном суспензии мезенхимальных клеток вызывает вопросы с методической точки зрения. Авторами не описан метод получения представленных фотографий, при этом внешне фотографии похожи на препарат, замороженный непосредственно между предметным и покровным стеклом. По нашим наблюдениям, в таких условиях препараты клеточных суспензий могут витрифицироваться за счет капиллярных явлений.

Обращает на себя внимание, что наиболее обнадеживающие результаты получены при небольших (до 1 атм) давлениях насыщения ксеноном [7,47,102]; при более высоких давлениях насыщения заметное увеличение выживаемости клеток при криоконсервации отмечено только на культуре дрожжей [107]. Это может быть связано со сложностью декомпрессии клеток,

однако нельзя исключить, что оптимальный криозащитный эффект дают именно небольшие концентрации ксенона, поступающие в клеточные суспензии или ткани при низком давлении.

### ПРОГНОЗ ВОЗМОЖНОСТЕЙ, ПРЕИМУЩЕСТВ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛАТРАТНЫХ ГАЗОВ В ТЕХНОЛОГИЯХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Гипотеза о целесообразности разработки методов криоконсервации с использованием клатратных газов имеет под собой достаточно веские основания. Теория предсказывает несколько возможных механизмов криозащитного действия клатратобразующих газов, в первую очередь ксенона – замену кристаллов воды на более рыхлые и менее травмирующие газогидратные структуры, влияние на процессы витрификации, протекция липидного бислоя мембран в процессе фазовых переходов, а также воздействие на метаболизм живых структур, увеличивающее резистентность в условиях холодной ишемии. Наличие криозащитного эффекта ксенона и других тяжелых инертных газов было продемонстрировано экспериментально. При этом экспериментальные исследования проводили разные группы исследователей, что не дает возможности заподозрить в положительных результатах ошибку эксперимента, несмотря на определенные вопросы к методической организации отдельных экспериментов. В то же время отсутствие бурного развития такого, казалось бы, перспективного направления позволяет сделать заключение, что обнаруженные эффекты трудновоспроизводимы. Кроме того, анализ известных экспериментов по применению ксенона и других инертных газов в криоконсервации не дает возможности сделать заключение, какой именно механизм криозащиты играет основополагающую роль и, соответственно, какое направление исследований в данной области наиболее перспективно.

Наиболее сложным моментом в постановке экспериментов по применению клатратобразующих газов в криоконсервации являются различия в протекании физических процессов при воспроизведении одних и тех же режимов замораживания/оттаивания. Процессы нуклеации водных кристаллов и газогидратов относятся к случайным процессам. Это означает, что реальная динамика «вымораживания» воды газогидратами может кардинально различаться при, казалось бы, однотипных экспериментах. Помимо этого, процесс образования клатратных газогидратов находится под влиянием большего

количества факторов, по сравнению с льдообразованием (см. раздел «Кристаллизация воды и газогидратов»). Незначительные колебания давления в процессе охлаждения, длительности и условий экспозиции биологического материала в атмосфере инертных газов, концентрации клеток в суспензии или характеристик биологического материала (например, содержание жиров в тканях или липопротеинов в сыворотке) могут существенно изменять динамику образования газогидратов. Возможно, именно этим обстоятельством объясняется низкая воспроизводимость обнаруженных эффектов.

Однако влияние большого количества факторов на образование газогидратов можно превратить из недостатка в достоинство разрабатываемого метода. Большое количество параметров, влияющих на образование газогидратов, предполагает более широкие возможности по управлению процессом. Например, количество связанной в кристаллической фазе воды можно регулировать количеством газа, инициацию нуклеации временным дополнительным повышением давления и т.д. Реализации такого управления процессом препятствует практически полное отсутствие знаний о реальных параметрах нуклеации газогидратов в биологических структурах. Прежде чем перейти к моделированию режимов криоконсервации с использованием клатратобразующих газов, необходимо провести серию экспериментов по определению параметров динамики насыщения биологических суспензий и тканей газами, определению равновесных точек гидратобразования в биологическом материале в присутствии криопротекторов и без них, скорости роста кристаллов в разных условиях, исследованию взаимодействия газогидратов с нуклеаторами и блокаторами нуклеации. Только имея достаточную базу данных, можно будет моделировать режимы замораживания, результаты которых окажутся воспроизводимыми. Можно выделить несколько перспективных направлений поиска способов применения клатратных газов в криоконсервации.

**Классическая криоконсервация.** Технологии классической или программной криоконсервации биологических объектов можно воспроизвести, заменяя кристаллы льда на газогидраты, менее повреждающие и более стабильные с точки зрения перекристаллизации. Такие технологии предполагают, что в виде кристаллической фазы будет связываться большое количество воды (более 50%). Так как динамика образования газогидратов отличается от динамики образования кристаллов воды, требуется пересмотр режимов охлаждения/замораживания на

основе предварительных биофизических экспериментов и наработанного опыта классической криоконсервации. Наиболее сложная задача в этой области – разработка безопасного для биологического материала режима диссоциации газогидратов.

**Витрификация.** Как полагают некоторые ведущие криобиологи, именно технологии витрификации наиболее перспективны для решения проблемы криоконсервации крупных объектов – тканей, органов и в перспективе целых организмов.

Имеющиеся к настоящему моменту данные позволяют предположить, что тяжелые инертные газы можно использовать в качестве агентов, способствующих витрификации растворов (см. раздел «Клатратообразующие газы и стеклование растворов»). Для использования газов в этом качестве необходимо полное подавление образования кристаллических газогидратов. Кроме того, именно в таком режиме использования можно ожидать значительного протекторного воздействия газов на мембранные структуры, так как концентрация газов в липидном бислое мембраны в процессе замораживания будет оставаться максимальной (см. раздел «Влияние клатратообразующих газов на липидную фазу клеточных мембран»).

Другая возможность, которую предоставляют клатратообразующие газы в области витрификации, – гибридные технологии, т.е. контролируемое связывание газогидратами небольшого количества воды с последующим стеклованием остального раствора.

Классическое медленное замораживание фактически также можно рассматривать как гибридную технологию, так как в процессе криоконсервации часть воды кристаллизуется, а часть стеклется в составе высокоосмотического концентрированного раствора. Клетки в клеточных суспензиях вытесняются в концентрированный раствор и, таким образом, избегают повреждения кристаллами льда. Количество воды, вымораживающейся в виде кристаллов льда, как правило, значительно превышает 50%, и ограничить это количество в рамках существующих технологий криоконсервации крайне сложно [112]. Для криоконсервации крупных биологических объектов – органов или больших фрагментов тканей – образование крупных массивов кристаллического льда губительно, но небольшой объем кристаллов воды (около 5–10% от массы ткани) вполне допустим. В отличие от кристаллов льда объем кристаллов газогидрата можно регулировать количеством доступного для клатратообразования газа. С другой стороны, в витрификации существует

проблема насыщения органов высокими концентрациями криопротекторов. Имеется зависимость токсичности криопротекторов от температуры: чем ниже температура, тем ниже токсичность криопротекторов. Поэтому насыщение органов криопротекторами происходит поэтапно, при постепенном понижении температуры. Последнее повышение концентрации криопротекторов часто происходит в зоне отрицательных температур – порядка  $-20^{\circ}\text{C}$  [113]. Но при понижении температуры и увеличении концентрации криопротекторов происходит увеличение вязкости растворов, что крайне затрудняет проникновение раствора в глубинные слои органов. Данное противоречие трудно разрешимо. Ограниченное регулируемое гидратобразование может заменить последний низкотемпературный этап повышения концентрации криопротекторов. Предварительным растворением контролируемого количества газов и инициацией образования газогидратов в нужном температурном диапазоне можно связать заданное количество воды равномерно в объеме ткани и, таким образом, провести повышение концентрации криопротекторов в оставшемся свободном объеме раствора.

**Вспомогательные функции.** Любые режимы криоконсервации включают предварительный гипотермический этап. Как правило, охлаждение от физиологической температуры до околонулевой происходит медленно, чтобы избежать холодового шока. Именно на этом этапе происходит насыщение живых тканей криопротекторами. При этом гипотермическая стадия вносит свой вклад в повреждающее воздействие криоконсервации, так как живые ткани подвергаются негативному влиянию ишемии и низкой температуры. Как показано в разделе «Влияние газов на жизнеспособность биологических объектов в условиях гипотермии», инертные и некоторые другие газы способны повысить жизнеспособность биологического материала на стадии хранения в гипотермических условиях, что скажется на результативности полного цикла криоконсервации.

Кроме того, достаточно обширный спектр органопротекторного действия ксенона и аргона позволяет предположить, что тяжелые инертные газы могут снижать токсическое действие криопротекторов.

Органопротекторное свойство инертных газов можно использовать самостоятельно в классических схемах криоконсервации, насыщая биологический материал перед охлаждением, и в новых разрабатываемых технологиях газогидратной криоконсервации.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время технологии криоконсервации широко применяются в науке, медицине, сельском хозяйстве и биотехнологических производствах. Наряду с успехами в этой области, до сих пор остается нерешенным вопрос криоконсервации крупных объектов – объемных тканей и органов. Хранение такого материала является высокоактуальной проблемой в связи с развитием методов трансплантации тканей и органов и, соответственно, необходимостью создания запаса трансплантатов в криобанках.

Одним из перспективных направлений развития технологий криоконсервации является применение газовых гидратов инертных газов для криоконсервации биообъектов. Молекулы инертных газов свободно проникают через мембраны клеток и не подвергаются биотрансформации, поскольку не вступают в химические реакции. Таким образом, теоретически решаются основные проблемы криоконсервации крупных объектов: 1) вместо кристаллов льда происходит формирование кристаллов гидратов; 2) инертные газы заполняют весь объем органа; 3) инертные газы не токсичны.

По результатам обзора современной литературы можно сделать следующие выводы:

1. Современный уровень знаний в области физики газогидратов не противоречит сформулированному в 1969 г. теоретическому обоснованию использования инертных газов в качестве криопротекторов [4]. Газогидраты перспективны с точки зрения решения проблемы остановки метаболизма живых клеток, в том числе при глубоком замораживании. Кубическая форма кристаллов газогидратов выгодно отличается от гексагональной формы кристаллов льда по повреждающему действию на клетки. Стабильность газогидратов в процессе охлаждения-отогрева выше стабильности кристаллов льда, подверженных перекристаллизации. Однако при использовании газогидратов остро стоит проблема повреждения биологических структур в момент распада газогидратов за счет бурного выделения газа, что требует особого решения.

2. При сравнении закономерностей нуклеации и роста водных кристаллов и газогидратов можно сделать вывод о более сложной зависимости динамики этого процесса от внешних условий в случае газогидратов. При этом современная база знаний не предоставляет информации о конкретных параметрах этих процессов применительно к биологическим системам (хотя бы модельным). Для осознанного проектирования оптимальных режимов замораживания-оттаивания биообъектов с газами не-

обходима разработка базы знаний о параметрах нуклеации и распада газогидратов в растворах и биологических тканях. При отсутствии такой базы, эксперименты по криоконсервации с применением газов скорее всего будут неэффективны и с большой вероятностью плохо воспроизводимы.

3. Существуют теоретические и экспериментальные предпосылки использования инертных газов в витрифицирующих технологиях криоконсервации за счет влияния на структуру воды и клеточных мембран без образования кристаллических газогидратов.

4. Свойства газогидратов могут предоставить возможность разработки гибридных технологий соединяющих черты классической криоконсервации и витрификации. В рамках такой технологии должно быть обеспечено контролируемое связывание газогидратами небольшого количества воды с последующим стеклованием остального раствора.

5. Биологические свойства инертных газов позволяют использовать их в качестве вспомогательных агентов на предварительных стадиях криоконсервации.

6. Наличие криозащитного эффекта ксенона и других тяжелых инертных газов было продемонстрировано восемью независимыми группами исследователей (преимущественно российскими), что не дает возможности заподозрить в положительных результатах ошибку эксперимента. При этом часть публикаций порождает определенные вопросы к методической организации экспериментов. На основании анализа данных работ невозможно сделать вывод о вероятном механизме криозащиты используемых инертных газов.

В целом можно заключить, что криоконсервация с использованием газов является перспективным направлением. Разработка технологии газогидратной консервации требует значительного объема физических экспериментов для определения закономерностей, которые позволят осознанно конструировать режимы замораживания с заданными параметрами температурной точки нуклеации кристаллов, скорости их роста, количества связанной воды, соотношения газогидрат/стеклюющийся раствор.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. И. Соколовская, Докл. ВАСХНИЛ, № 6, 21 (1947).
2. И. В. Смирнов, Советская зоотехния, № 4, 93 (1949).
3. C. Polge, F. Smith, and A. Parkes, Nature **164**, 666 (1949).

4. R. W. Prehoda, (Chilton Book Company, Philadelphia, 1969).
5. S. Sheleg, H. Nixon, B. L. Cohen, et al., **1**, 440 (2008).
6. И. В. Артюхов, в *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии (Материалы международной заочной научно-практической конференции)* (Информационно-издательский отдел Института физиологии Коми Н.Ц. УрО РАН, Сыктывкар, 2014), сс. 88–94.
7. Д. С. Лаптев, Т. В. Полежаева, О. О. Зайцева и др., *Физиология человека* **41** (2), 109 (2015).
8. В. И. Тельпухов и П. В. Щербаков, *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии* **15** (3), 77 (2012).
9. В. В. Довгуша, *Дискуссионные вопросы действия индифферентных газов на организм* (ООО «Пресс-Сервис», Санкт-Петербург, 2011).
10. А. В. Потапов, Автореферат дис. ... канд. тех. наук. (Моск. гос. техн. ун-т им. Н. Э. Баумана, М., 2011).
11. K. Kitani, *Scand J. Clin. Lab. Invest.* **29** (2), 167 (1972).
12. S.-Y. Yeh and R. E. Peterson, *J. Applied Physiology* **20** (5), 1041 (1965).
13. K. Kitani, and K. Winkler, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **29** (2), 173 (1972).
14. J. R. Trudell, D. D. Koblin, and E. I. Eger, *Anesth. Analg.* **87**, 411 (1998).
15. T. Prange, M. Schiltz, L. Pernot, et al., *Proteins* **30**, 61 (1998).
16. А. В. Потапов и И. А. Архаров, *Вестн. МГТУ им. Н.Э.Баумана. Сер. Машиностроение*, № 3, 96 (2009).
17. А. В. Потапов и И. А. Архаров, *Химическое и нефтегазовое машиностроение*, № 8, 27 (2010).
18. Н. С. Кокин. Дис. ... канд. хим. наук (Ивановский ордена Трудового красного знамени химико-технологический ин-т МВиСО РСФСР, Иваново, 1984).
19. Ю. В. Чистяков, И. В. Еголора, Г. А. Крестов и др., *Журн. структур. химии* **21** (5), 85 (1980).
20. Г. А. Крестов, В. И. Виноградов и Т. В. Кононенко, *Изв. вузов, Химия и химическая технология* **25** (9), 1081 (1982).
21. Г. А. Крестов, В. Н. Пророков, В. В. Долотов и Н. А. Завьялов, *Изв. вузов, Химия и химическая технология* **24** (8), 1047 (1981).
22. Г. А. Крестов, М. Вольдан, В. И. Виноградов и др., *Изв. вузов, Химия и химическая технология* **23** (9), 1101 (1980).
23. А. Н. Нестеров. Дис. ... д-ра хим. наук (Институт криосферы Земли Сибирского отделения РАН, Тюмень, 2006).
24. T. Koop, B. Luo, A. Tsias, and T. Peter, *Nature* **406** (10), 611 (2000).
25. T. Koop and B. Zobrist, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 10839 (2009).
26. Ю. Ф. Макогон и В. И. Фомина, *Газовые гидраты* (Химия, М., 1980).
27. Ю. Ф. Макогон и Д. В. Дэвидсон, *Газовая промышленность*, №4, 37 (1983).
28. Y. Handa, *J. Phys. Chem.* **94**, 2652 (1990).
29. Z. Huo, K. Hester, and E. D. Sloan, *AIChE J.* **49**, 1300 (2003).
30. В. А. Истомин и В. Г. Квон, *Предупреждение и ликвидация газовых гидратов в системах добычи газа*. (ООО «ИРЦГазпром», М., 2004).
31. U. Karaaslan and M. Parlaktuna, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **912**, 735 (2000).
32. U. Karaaslan, E. Uluneye, and M. Parlaktuna, *J. Petrol. Sci. Eng.* **35**, 49 (2002).
33. В. В. Родин, В. Я. Волков и Ф. Ш. Исангагин, *Биофизика* **31** (2), 274 (1986).
34. В. В. Родин, Дис. ... д-ра хим. наук (МГУ им. М.В. Ломоносова, М., 1997).
35. G. J. Morris and E. Acton, *Cryobiology* **66** (2), 85 (2013).
36. B. Work, E. Leidl, M. Rasch, et al., *Cryobiology* **40**, 228 (2000).
37. A. Cruz-Torres, A. Romero-Martinez, and A. Galano, *Chem. Phys. Chem.* **9**, 1630 (2008).
38. V. I. Artyukhov, A. Y. Pulver, A. Peregudov, and I. Artyukhov, *J. Chem. Phys.* **141** (3), 034503 (2014).
39. В. А. Истомин и В. С. Якушев, *Газовые гидраты в природных условиях* (Недра, М., 1992).
40. Ю. Ф. Макогон, *Газовое дело*, № 12, 11 (1961).
41. Е. А. Желиговская и Г. Г. Маленков, *Успехи химии* **75** (1), 64 (2006).
42. P. Boutron, P. Mehl, A. Kaufmann, and P. Angibaud, *Cryobiology* **23** (5), 453 (1986).
43. S. Seki and P. Mazur, *Cryobiology* **56** (3), 171 (2008).
44. D. E. Pegg, *Methods Mol. Biol.* **1257**, 3 (2015).
45. В. В. Родин, Ф. Ш. Исангагин и В. Я. Волков, *Криобиология и криомедицина*, № 14, 3 (1984).
46. А. Ю. Пульвер, И. В. Артюхов, В. И. Артюхов, и др., *Биофизика живой клетки* **10**, 152 (2014).
47. О. Г. Макеев, А. И. Пономарев и А. В. Коротков, *Вестн. уральской мед. академ. науки*, № 1, 52 (2010).
48. М. Н. Буслаева и О. Я. Самойлов, *Журн. структур. химии* **4**, 502 (1963).
49. И. В. Радченко и Ф. К. Шестаковский, *Журн. физ. химии* **29** (8), 1455 (1955).
50. G. Duhamel, P. Choquet, J. Leviel, et al., *Life Sci.* **323**, 529 (2000).
51. L. Stimson, I. Vattulainen, T. Rog, and M. Karttunen, *Cell. Mol. Biol. Lett.* **10**, 563 (2005).
52. R. Booke and A. Sum, *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1347 (2013).
53. E. Yamamoto, T. Akimoto, H. Shimizu, et al., *J. Phys. Chem. B* **116**, 8989 (2012).
54. Y. Moskovitz and H. Yang, *Soft Matter* **11** (11), 2125 (2015).
55. E. Moce, E. Blanch, C. Toma, and J. K. Graham, *Reprod. Dom. Anim.* **45** (Suppl. 2), 57 (2010).
56. T. Marx, M. Schmidt, U. Schirmer, and H. Reinelt, *J. Roy. Soc. Med.* **93** (10), 513 (2000).

57. М. И. Руденко, В. Г. Пасько, Б. М. Таубаев и В. В. Стец, *Клин. анестезиология и реаниматология*, № 3, 58 (2006).
58. S. G. De Hert, B. Preckel, and W. S. Schlack, *Curr. Opin. Anaesth.* **22** (4), 491 (2009).
59. M. Derwall, M. Coburn, S. Rex, et al., *Minerva Anesthesiol.* **75**, 37 (2009).
60. C. Stoppe, A. Rimek, R. Rossaint, et al., *Med. Gas. Res.* **3** (1), 12 (2013).
61. G. A. Lane, M. L. Nahrwold, A. R. Tait, et al., *Science* **210**, 899 (1980).
62. T. Goto, K. Suwa, S. Uezono, et al., *Br. J. Anaesth.*, **80**, 255 (1998).
63. B. Fowler and K. N. Ackles, *Aerosp. Med.* **43**, 1219 (1972).
64. J. Růžička, J. Benes, L. Bolek, and V. Markvartova, *Physiol. Res.* **56** (Suppl. 1), S39 (2007).
65. P. B. Bennett, J. Roby, S. Simon, and D. Youngblood, *Aviat. Space and Environ. Med.* **46** (1), 37 (1975).
66. Н. Б. Павлов и А. Р. Куссмауль, в *Материалы VI конференции молодых ученых и специалистов, аспирантов и студентов, посвященной дню космонавтики* (М., 2007), сс. 33–36.
67. D. F. Stowe, G. C. Rehmert, W. M. Kwok, et al., *Anesthesiology* **92**, 516 (2000).
68. S. C. Schroth, U. Schotten, O. Alkanoglu, et al., *Anesthesiology* **96**, 422 (2002).
69. R. Huneke, E. Jungling, M. Skasa, et al., *Anesthesiology* **95**, 999 (2001).
70. L. W. de Rossi, K. Gott, N. Horn, et al., *Can. J. Anaesth.* **49**, 942 (2002).
71. L. W. de Rossi, M. Brueckmann, S. Rex, et al., *Anesth Analg.* **98**, 1007 (2004).
72. B. Preckel, N. C. Weber, R. D. Sanders, et al., *Anesthesiology* **105**, 187 (2006).
73. D. Ma, M. Hossain, A. Chow, et al., *Ann. Neurol.* **58**, 182 (2005).
74. G. Martin, N. Cagnon, O. Sabido, et al., *Human Reproduction* **22** (2), 380 (2007).
75. T. M. Said, A. Gaglani, and A. Agarwal, *Reprod. Biomed. Online* **21** (4), 456 (2010).
76. J. G. Lim, Y. T. Neo, S. E. Lee, et al., *CryoLetters* **34** (6), 598 (2013).
77. Y. M. Yarin, N. Amarjargal, J. Fuchs, et al., *Hear Res.* **201**, 1 (2005).
78. N. Jawad, M. Rizvi, J. Gu, et al., *Neurosci. Lett.* **460**, 232 (2009).
79. P. D. Loetscher, J. Rossaint, R. Rossaint, et al., *Crit. Care* **13**, 206 (2009).
80. А. Р. Куссмауль, Т. С. Гурьева, О. А. Дадашева, и др., в сб. *Труды XXXI академических чтений по космонавтике «Актуальные проблемы Российской космонавтики»* (Комиссия РАН, Москва, 2007), сс. 483–484.
81. А. Р. Куссмауль, Дис. ... канд. мед. наук (Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, М., 2007).
82. Y. Irani, J. L. Pype, A. R. Martin, et al., *Nephron Extra* **1** (1), 272 (2011).
83. Е. И. Мелехов, *Журн. общей биологии* **44** (3), 386 (1983).
84. P. W. Hochachka and P. L. Lutz, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **130** (4), 435 (2001).
85. P. A. Padilla and M. B. Roth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7331 (2001).
86. P. A. Padilla, T. G. Nystul, R. A. Zager, et al., *Mol. Biol. Cell* **13**, 1473 (2002).
87. T. A. Gorr, M. Gassmann, and P. Wappner, *J. Insect. Physiol.* **52**, 349 (2006).
88. G. L. Semenza, *Exp. Physiol.* **91**, 803 (2006).
89. T. G. Nystul and M. B. Roth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (24), 9133 (2004).
90. P. Shannon, *J. Dairy Sci.* **48**, 1357 (1965).
91. P. Shannon, *N.-Z. Dairy Board.* **47**, 16 (1971).
92. N. L. Van Demark and U. D. Sharma, *J. Dairy Sci.* **40**, 438 (1957).
93. N. L. Van Demark and F. D. Bartlett, *J. Dairy Sci.* **45**, 375 (1962).
94. F. D. Bartlett and N. L. Van Demark, *J. Dairy Sci.* **45**, 360 (1962).
95. В. К. Милованов, *Биология воспроизводства и искусственного осеменения животных* (Сельхозиздат, М., 1962).
96. В. А. Наук, *Структура и функции спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации* (Штиинца, Кишинев, 1991).
97. S. Brouard, L. E. Otterbein, J. Anrather, et al., *J. Exp. Med.* **192** (7), 1015 (2000).
98. F. Amersi, X. D. Shen, D. Anselmo, et al., *Hepatology* **35** (4), 815 (2002).
99. L. E. Otterbein, B. S. Zuckerbraun, M. Haga, et al., *Nat. Med.* **9** (2), 183 (2003).
100. E. Blackstone, M. Morrison, and M. B. Roth, *Science* **308** (5721), 518 (2005).
101. S. V. Sheleg, H. L. Nixon, S. A. Svarovsky, and B. Cohen Patent US 8,124,329 B2 «*Hypothermic preservation of biological tissues and cells*» (2012).
102. И. А. Хлусов, П. Г. Жуков и Г. Т. Сухих, *Клеточные технологии в биологии и медицине*, № 2, 74 (2007).
103. А. Н. Худяков, Т. В. Полежаева, О. О. Зайцев и др., *Биофизика живой клетки* **10**, 209 (2014).
104. D. S. Laptev, T. V. Polezhaeva, O. O. Zaitseva, et al., *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny* **157** (2), 251 (2014).
105. О. Г. Макеев, А. И. Понамарев и А. В. Коротков, Патент РФ 2433173 «*Способ криоконсервации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток*» ((2010).
106. А. Ю. Пульвер, А. В. Целиковский, Н. А. Пульвер и др., в *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии (Материалы Международной заочной научно-практической конференции)* (Информационно-издательский отдел Института физиоло-

- гии Коми НЦ Уральского отд. РАН, Сыктывкар, 2014), сс. 226–232.
107. А. Ю. Пульвер, А. В. Целиковский, Н. А. Пульвер и др., в *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии (Материалы Международной заочной научно-практической конференции)* (Информационно-издательский отдел Института физиологии Коми Н.Ц. Уральского отд. РАН, Сыктывкар, 2014), сс. 220–226.
108. А. Ю. Грязнов, Н. О. Мотовилова, И. В. Миличенко и др., Заявка на патент 2012103061 «Способ криоконсервации яичниковой ткани» (2011).
109. П. В. Щербakov, В. И. Тельпухов, А. В. Николаев и др., Патент RU 2268590 «Способ криоконсервации органов и тканей *in situ*» (2006).
110. А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. И. Зверева и А. В. Коротков, в сб. *Материалы III межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии – практическому здравоохранению»*, под общ. ред. С.Л. Леонтьевой («Астер», Екатеринбург, 2014), сс. 78-83.
111. А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. И. Зверева и А. В. Коротков, Вестн. уральской мед. академ. науки, № 5, 98 (2014).
112. G. J. Morris, E. Acton, B. J. Murray, and F. Fonseca, *Cryobiology* **64**, 71 (2012).
113. G. M. Fahy, B. Wowk, R. Pagotan, et al., *Organogenesis* **5** (3), 167 (2009).

## Prospects for Application of Gases and Gas Hydrates to Cryopreservation

**N.V. Shishova and E.E. Fesenko Jr.**

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

In the present review, we tried to evaluate the known properties of gas hydrates and gases participating in the formation of gas hydrates from the point of view of the mechanisms of cryoinjury and cryoprotection, to consider the papers on freezing biological materials in the presence of inert gases, and to analyze the perspectives for the development of this direction. For the purpose, we searched for the information on the physical properties of gases and gas hydrates, compared processes occurred during the formation of gas hydrates and water ice, analyzed the influence of the formation and growth of gas hydrates on the structure of biological objects. We prepared a short review on the biological effects of xenon, krypton, argon, carbon dioxide, hydrogen sulfide, and carbon monoxide especially on hypothermal conditions and probable application of these properties in cryopreservation technologies. The description of the existing experiments on cryopreservation of biological objects with the use of gases was analyzed. On the basis of the information we found, the most perspective directions of work in the field of cryopreservation of biological objects with the use of gases were outlined. An attempt was made to forecast the potential problems in this field.

*Key words: cryopreservation, freezing, hypothermia, gas hydrates, clathrates, inert gases, xenon, krypton, argon*