

УДК 539.21-022.513.2:546.65:57.086.13:615.832.9

А.М. Гольцев*, М.О. Бондарович, Н.М. Бабенко,
Ю.О. Гаєвська, Т.Г. Дубрава, М.В. Останков

Використання наноматеріалів у кріобіології та кріомедицині

UDC 539.21-022.513.2:546.65:57.086.13:615.832.9

A.M. Goltsev*, M.O. Bondarovich, N.M. Babenko,
Yu.O. Gaevska, T.G. Dubrava, M.V. Ostantkov

Use of Nanomaterials in Cryobiology and Cryomedicine

Реферат: У огляді розглядається можливість використання сучасних нанотехнологічних розробок з метою досягнення альтернативних кріобіологічних цілей. З одного боку, застосування наноматеріалів дозволить підвищити функціональну повноцінність деконсервованих клітин завдяки таким унікальним характеристикам наночастинок, як розмір, форма, поверхневий заряд, хімічний склад тощо. Наноматеріали можуть використовуватися у якості наноконтейнерів для непроникальних кріопротекторів та викликати суттєві зміни кристалоутворення, теплопровідності та інших властивостей клітин, тканин і органів, що підвищує ефективність їх кріоконсервування. З іншого боку, поєднане застосування наноматеріалів і факторів низькотемпературного заморожування вважається перспективним методом деструкції патологічно змінених клітин і тканин, оскільки мінімізує ризик виникнення рецидивів онкопатології після недостатнього проморожування пухлинного сайту.

Ключові слова: кріобіологія, нанотехнології, наночастинки, нановідігрів, кріоабляція.

Abstract: The review considers the possibility of using modern nanotechnological developments aimed to achieve alternative cryobiological goals. On the one hand, the use of nanomaterials will increase the functional value of thawed cells due to such unique characteristics of nanoparticles as size, shape, surface charge, chemical composition, etc. Nanomaterials can be used as nanocapsules for impermeable cryoprotective agents (CPAs) and cause significant changes in crystal formation, thermal conductivity and other properties of cells, tissues and organs, that increases the efficiency of their cryopreservation. On the other hand, the combined use of nanomaterials and low-temperature freezing factors is considered a promising method of destruction of pathologically altered cells and tissues, as it minimizes the risk of recurrence of oncopathology after insufficient freezing-out of the tumor site.

Key words: cryobiology, nanotechnologies, nanoparticles, nanowarming, cryoablation.

Розвиток нанотехнологій і подальше вдосконалення синтезованих наноматеріалів – пріоритетні завдання науки і техніки XXI сторіччя. На сьогоднішній день єдиного визначення поняття «нанотехнології» не існує. Наразі цей термін включає «дослідження, вимірювання та маніпуляції з об'єктами на рівні атомів і молекул розміром не більше 100 нанометрів (тобто 10^{-7} м) і використання нових властивостей цих об'єктів» [8]. Першим вченим, який запропонував нанометр як одиницю виміру, був Альберт Ейнштейн. У 1905 р. він теоретично довів, що розмір молекули цукру дорівнює одному нанометру.

У 1959 р. професор Каліфорнійського технологічного інституту Річард Фейнман, лауреат Нобелівської премії (1965 р.), у лекції «Як багато місця там, унизу» висловив припущення щодо синтезу нових матеріалів шляхом атомного збирання. Цей виступ вченого вважається початком нанотехнологічної революції в науці та техніці.

Development of nanotechnologies and further improvement of synthesized nanomaterials are priority tasks of science and technology of the XXI century. To date, there is no clear definition of 'nanotechnology'. Currently, this term includes 'research, measurement and manipulation of objects at the level of atoms and molecules no larger than 100 nanometers (*i. e.* 10^{-7} m) and the use of new properties of these objects' [3]. The first scientist who proposed a nanometer as a unit of measurement was Albert Einstein. In 1905, he theoretically proved that the size of a sugar molecule is equal to one nanometer.

In 1959, Richard Feynman, a Nobel Laureate, professor at the California Institute of Technology (1965), suggested the synthesis of new materials by means of atomic-scale assembly in a lecture entitled 'There's plenty of room at the bottom'. This speech of the scientist is considered to be the beginning of the nanotechnological revolution in science

Відділ кріопатофізіології та імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryopathophysiology and Immunology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: cryopato@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 27.12.2019
Прийнята до друку 09.11.2020

Received December, 27.2019
Accepted November, 09, 2020

© 2020 A.N. Goltsev, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Однак термін «нанотехнології» вперше був запропонований у 1974 р. японським вченим Норі Танігуті для опису процесу побудови нових об'єктів і матеріалів за допомогою маніпуляції з окремими атомами.

Синтезовані наноматеріали володіють якісно новими фізико-хімічними, біологічними, фармакологічними властивостями, які суттєво відрізняються від властивостей тих самих речовин у масивному стані. Сфера застосування наноматеріалів у сучасній біології та медицині достатньо широка: від використання у якості контрастних агентів із метою діагностичної візуалізації патологічних процесів [46] до розробки систем адресної доставки лікарських засобів безпосередньо в зону уражень [61].

Для біомедичного застосування найбільш оптимальними є наночастинки (НЧ) розміром від 5 до 60 нм [28]. Вважається, що кон'югати лікарських засобів із НЧ таких розмірів здатні накопичуватися переважно в уражених тканинах (зокрема, у трансформованих) завдяки ефекту «посилення проникності та утримування (ЕПУ)» [10, 16]. Загальне пояснення даного явища полягає в тому, що активна проліферація пухлинних клітин стимулює посилений ангиогенез новоутворення за рахунок підвищення продукції фактора росту ендотелію судин та інших чинників росту. Новостворені пухлинні судини зазвичай є абнормальними за формою та архітектурою, що порушує фізіологічний механізм проникнення молекул і рідин, дозволяючи НЧ або наноконтейнерам із лікарськими засобами вибірково проникати і накопичуватися всередині пухлинного сайту.

Ефективність виконання альтернативних кріобіологічних і кріомедичних завдань не можливе без використання останніх досягнень фундаментальної науки і нових інженерних підходів до реалізації процесу заморожування-відігріву, впровадження сучасних нанотехнологій. З одного боку, використання наноматеріалів може сприяти збереженню життєздатних і функціонально повноцінних біооб'єктів при наднизьких температурах, а з іншого, – попередня обробка пухлинного сайту наноматеріалами перед проведенням кріоабляції забезпечить ефективне руйнування патологічно змінених клітин і тканин.

Однією з загальних проблем кріобіології є пошук нових біосумісних і нетоксичних кріопротекторів, ефективність яких не поступається традиційним кріозахисним речовинам – диметилсульфоксиду (ДМСО) та гліцерину, але вони не мають системного токсичного впливу на організм реципієнта [17, 55]. Перспективним у цьому відношенні є використання трегалози – дисахариду

and technology. However, the term 'nanotechnology' was first proposed in 1974 by Japanese scientist Nori Taniguti to describe the process of building new objects and materials by manipulating individual atoms.

The synthesized nanomaterials have qualitatively new physicochemical, biological, pharmacological properties, which differ significantly from the ones of the same substances in a massive state. The scope of nanomaterials in modern biology and medicine is quite wide: from the use as contrast agents for diagnostic visualization of pathologies [45] to the development of the targeted drug delivery directly to the affected area [61].

Nanoparticles (NPs) with a size of 5 to 60 nm are the most optimal for biomedical application [26]. It is believed that conjugates of drugs with NPs of this size are able to be mainly accumulated in the affected tissues (in particular, in transformed ones) due to the effect of enhanced permeability and retention (EPR) [5, 11]. The general explanation for this phenomenon is that the active proliferation of tumor cells stimulates an enhanced angiogenesis of tumor by increasing the production of vascular endothelial growth factor and other growth factors. Newly formed tumor vessels are usually abnormal in shape and architecture, that disrupts the physiological mechanism of penetration of molecules and fluids, allowing NPs or nanocontainers for drugs to selectively penetrate and accumulate within the tumor site.

The efficiency of alternative cryobiological and cryomedical tasks is not possible without the involvement of the latest achievements of basic science and new engineering approaches to the implementation of freezing-thawing, the introduction of modern nanotechnologies. On the one hand, the use of nanomaterials can help to preserve viable and functionally complete bioobjects at ultra-low temperatures, and on the other hand, pre-treatment of the tumor site with nanomaterials prior to cryoablation will ensure effective destruction of pathologically altered cells and tissues.

One of the common problems of cryobiology is the search for new biocompatible and non-toxic CPAs, the effectiveness of which is not inferior to traditional cryoprotective substances, *i. e.* dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol, but which do not have systemic toxic effects on a recipient [12, 55]. Promising in this regard is the use of trehalose, that is glucose disaccharide, which has high cryoprotective properties, but is not able to penetrate via cell membrane. Since the mammalian cells are not capable of endogenous trehalose synthesis, a variety of biotechnological approaches have been de-



глюкози, яка володіє високими кріопротекторними властивостями, але не здатна до проникнення крізь клітинну мембрану. Оскільки клітини ссавців не спроможні до ендogenous синтезу трегалози, було розроблено різноманітні біотехнологічні підходи для доставки трегалози всередину клітини: мікроін'єкція [14], електропорація [72], ріднофазний ендодитоз [47]. Слід зазначити, що вказані підходи мають істотні обмеження і недоліки, тому використання полімерних НЧ для інкапсуляції та доставки трегалози всередину клітини є досить перспективним. Rao W. та співавт. [50, 70] розробили термочутливу полімерну нанокapsулу Pluronic F127-PEI, що складається з амфіфільного трьохблочного сополімеру поліоксиетилену, блок-поліоксипропілену і блок-поліоксиетилену (PEOx-PPOy-PEOz), а також поліетиленіміну (PEI), в яку були вміщені молекули трегалози. Нанокapsули при 37°C були стабільні, мали невеликий розмір (95 нм), завдяки чому вони легко проникали всередину фібробластів (лінія NIH 3T3) шляхом ендодитозу, їх полімерна оболонка мала низьку проникність для трегалози. Позитивний заряд нанокapsул забезпечував їх високу афінність до негативно зарядженої клітинної мембрани внаслідок електростатичної взаємодії. Зниження температури до 22°C викликало швидке вивільнення трегалози через механічне руйнування оболонки нанокapsул, що сприяло підвищенню її внутрішньоклітинної концентрації до 0,3 М. Таким чином, внутрішньоклітинна концентрація трегалози досягла приблизно 0,1–0,3 М, що достатньо для захисту клітин ссавців від холодового стресу під час кріоконсервування і/або ліофілізації.

Надалі автори вдосконалили дану наноконструкцію шляхом використання хітозану як агента, що зшиває оболонки нанокapsул [69]. Обґрунтуванням такої модифікації є її відмінна біосумісність, завдяки природі двох складових нанокapsул полімерів: Pluronic F127, який був схвалений FDA (Food and Drug Administration) для використання в якості харчової домішки і фармацевтичного інгредієнта, та хітозану – полісахариду природного походження, що зазвичай міститься у морепродуктах. Продовжуючи дослідження в даному напрямку, W. Rao та співавт. [50] застосували геніпін – природний агент рослинного походження для зшивання хітозану в складі нанокapsул Pluronic F127-хітозан і надали до цієї конструкції систему контрольованого вивільнення трегалози при зміні рН середовища. Одержані результати свідчать про можливість успішного кріоконсервування людських стовбурових клітин жирового походження (human adipose tissue-derived stem cell – hADSC) з вико-

veloped to deliver trehalose to the cell: microinjection [19], electroporation [72], and liquid-phase endocytosis [46]. It should be noted that these approaches have significant limitations and disadvantages, so the use of polymeric NPs for encapsulation and delivery of trehalose into a cell is quite encouraging. W. Rao *et al.* [49, 70] developed a heat-sensitive polymer Pluronic F127-PEI nanocapsule, consisting of an amphiphilic three-block copolymer of polyoxyethylene, block polyoxypropylene and block polyoxyethylene (PEOx-PPOy-PEOz), as well as polyethylenimine (PEI), wherein the trehalose molecules were placed. Nanocapsules at 37°C were stable, small in size (95 nm), so they easily penetrated into the fibroblasts (NIH 3T3) by endocytosis, and their polymer shell had low permeability to trehalose. The positive charge of the nanocapsules ensured their high affinity for the negatively charged cell membrane due to electrostatic interaction. The decrease in temperature to 22°C caused the rapid release of trehalose due to mechanical destruction of the shell of nanocapsules, which increased its intracellular concentration up to 0.3 M. Thus, the intracellular concentration of trehalose reached approximately 0.1–0.3 M, which was sufficient to protect the mammalian cells against a cold stress during cryopreservation and / or lyophilization.

The authors further improved this nanostructure by using chitosan as a crosslinking agent for nanocapsules [69]. The rationale for this modification is its excellent biocompatibility, due to the nature of the two constituent nanocapsules of polymers: Pluronic F127, which was approved by the FDA (Food and Drug Administration) to be used as a food impurity and pharmaceutical ingredient, and chitosan being a polysaccharide of natural origin, usually contained in the seafood. Continuing research in this direction, W. Rao *et al.* [49] used genipin, a natural agent of plant origin for crosslinking chitosan in the Pluronic F127-chitosan nanocapsules and provided this design a system of controlled release of trehalose when changing the pH of the medium. The obtained results indicate the possibility of successful cryopreservation of human adipose tissue-derived stem cells (hADSC) with the use of nanotrehalose. For this purpose, hADSC were incubated with pH-sensitive nanocapsules before cryopreservation. Cumulative release of trehalose from these nanocapsules after their accumulation in late endosomes was revealed. This process was initiated by low pH values of endosomes and cell lysosomes (pH = 5), which provided rapid intracellular accumulation of trehalose after the natural disintegration of endosomes [49].



ристанням нанотрегалози. З цією метою hADSC інкубували з рН-чутливими нанокапсулами перед кріоконсервуванням. Виявлено кумулятивне вивільнення трегалози з даних нанокапсул після накопичення у пізніх ендосомах. Цей процес був ініційований низькими значеннями рН ендосом і лізосом клітин (рН = 5), що забезпечувало швидке внутрішньоклітинне накопичення трегалози після природного розпаду ендосом [50].

На думку розробників, даний підхід може повністю виключити використання високотоксичних кріопротекторів типу ДМСО під час заморожування hADSC завдяки досягненню високих внутрішньоклітинних концентрацій трегалози, тобто виконувати функцію однокомпонентного ефективного внутрішньоклітинного кріопротектора. Відсутність токсичної дії нанокапсул на hADSC підтверджують показники їх проліферації, навіть після 3-денної інкубації [50]. Після кріоконсервування життєздатність hADSC, навантажених нанотрегалозою, не відрізнялася від аналогічного показника стандартно заморожених клітин із ДМСО ((91,2 ± 3,4) і (88,2 ± 2,2)% відповідно). Крім того, після деконсервування такі клітини зберігали мультилінійний диференційний потенціал. Суттєвої різниці за ступенем експресії чотирьох «стовбурових» генів, включаючи *Nanog*, *Sox2*, *Klf4* і *Oct4*, між консервованими з нанотрегалозою і нативними hADSC не було виявлено.

Таким чином, доставлення трегалози всередину клітин за допомогою полімерних НЧ – перспективний і ефективний підхід до кріоконсервування МСК, який не потребує відмивання клітин від кріопротектора.

Можливими обмеженнями використання даного методу може бути час інкубації, необхідний для створення достатньої внутрішньоклітинної концентрації трегалози. У дослідженні W. Rao та співавт. [50] hADSC інкубували з нанотрегалозою протягом 24 годин до кріоконсервування. Використання НЧ апатиту як системи адресної доставки трегалози дозволило скоротити час інкубації *in vitro* до 6 годин при 37°C [56]. На клітинах гладких м'язів судин *in vitro* було показано, що використання НЧ апатиту забезпечує внутрішньоклітинне накопичення великих концентрацій трегалози ((до 237 ± 8,5) мМ) протягом короткого часу. Відомо, що бішар мембрани клітин для НЧ апатиту є непроникним, однак вони здатні змінювати мембранний потенціал клітин, сприяючи формуванню пор, що дозволяє трегалозі проникати всередину клітини [54]. Додавання НЧ апатиту до трегалози перед кріоконсервуванням аортальних гладком'язових клітин на 30% збільшило показник їх життєздатності після відігріву

The developers believe this approach can completely eliminate the use of highly toxic CPAs such as DMSO during hADSC freezing by achieving high intracellular concentrations of trehalose, *i. e.* to perform the function of a one-component effective intracellular CPA. The absence of toxic effects of nanocapsules on hADSC is confirmed by their proliferation indices even after 3-day incubation [49]. After cryopreservation, the viability of hADSCs loaded with nanotrehalose did not differ from that for the cells traditionally frozen with DMSO (91.2 ± 3.4) and (88.2 ± 2.2)%, respectively). In addition, after thawing such cells retained a multilinear differential potential. There was no significant difference in the expression rate of the four 'stem' genes, including *Nanog*, *Sox2*, *Klf4* and *Oct4*, between preserved with nanotrehalose and native hADSC.

Thus, the delivery of trehalose into cells by means of polymeric NPs is a promising and effective approach to cryopreservation of MSCs, which does not require washing the cells from the CPA.

Possible limitations of the use of this method may be the incubation time required to create a sufficient intracellular concentration of trehalose. W. Rao *et al.* [49] incubated hADSC with nanotrehalose for 24 hours before cryopreservation. The use of apatite NPs as a targeted delivery system of trehalose reduced the incubation time *in vitro* to 6 hours at 37°C [56]. *In vitro* vascular smooth muscle cells have been shown to use apatite NPs to provide intracellular accumulation of high concentrations of trehalose (up to 237 ± 8.5) mM) over a short period of time. It is known that the bilayer of cell membranes for apatite NPs is impermeable, but they are able to change the membrane potential of cells, promoting the formation of pores, which allows trehalose to penetrate into the cell [54]. The addition of apatite NPs to trehalose prior to cryopreservation of aortic smooth muscle cells increased their viability after heating by 30% if compared to the non-NPs group. Moreover, the viability of the thawed cells when using NP with trehalose did not significantly differ from the same index when using DMSO [56]. The advantage of apatite NPs is their slight cytotoxicity. The above allows us to consider the use of NPs as a perspective way to improve the cryopreservation efficiency for aortic cells.

Thus, currently the experiments on nanoencapsulation of trehalose are at the initial stages of the study and its effectiveness is being tested for different cell types. However, the results allow us to recommend this approach for wider application in cryobiological practice.



порівнянню з групою без використання НЧ. Більш того, життєздатність деконсервованих клітин при використанні НЧ разом із трегалозою не мала статистично значущих відмінностей від аналогічного показника при використанні ДМСО [56]. Враховуючи вищенаведені результати та незначну цитотоксичність НЧ апатиту існує можливість більш широкого їх використання для підвищення ефективності кріоконсервування аортальних клітин.

Таким чином, на даний час експерименти з нанокапсулювання трегалози для застосування в кріобіологічній практиці знаходяться на початкових етапах дослідження, а ефективність цього підходу перевіряється для різних типів клітин.

Життєздатність кріоконсервованих клітин багато в чому залежить від швидкості кристалоутворення та типу кристалів льоду, які формуються.

Високі значення теплопровідності ряду металевих, неметалевих і полімерних НЧ обумовлюють суттєві зміни кристалоутворення у клітинах, до складу яких вони потрапляють [58]. Вперше посилення теплопровідності рідин шляхом додавання колоїдних частинок із високою теплопровідністю була теоретично запропонована у 1881 р. Дж. С. Максвеллом [45]. Передбачалося, що теплопровідність суспензій, які містять сферичні частинки, підвищується на тлі збільшення об'ємної частки твердих частинок. Однак проблеми, обумовлені відносно великими розмірами колоїдних частинок (осадження, засмічення і стирання), перешкоджали реалізації цієї концепції на практиці. Для вирішення вказаних проблем S. Choi та співавт. [11] вперше використали додавання до різних рідин нанорозмірних металевих частинок із високою теплопровідністю. Суспензії, до складу яких входили наноструктуровані матеріали, отримали назву «нанорідини».

Теплопровідність у розчинах після додавання НЧ підвищується за наступних умов:

- прямому переносі тепла від однієї частинки до іншої при броунівському русі [34];
- переносі тепла від твердої речовини до рідини під час її розшарування на межі розділу рідини/частинка [62];
- виникненні більш низького теплового опору і значного підвищення теплопровідності при кластеризації НЧ [34].

Результати експериментальних досліджень підтвердили зміну теплопровідності води або водного розчину кріопротектора після додавання різного типу НЧ. Так, додавання 0,3% за об'ємом НЧ міді збільшувало теплопровідність води до 80% [30], а додавання 0,005% НЧ золота – на 10% [48]. S. Jana та співавт. [30] повідомляють про підвищення теплопровідності води на 35% після до-

The viability of cryopreserved cells mostly depends on crystal formation rate and types of formed ice crystals.

The high values of thermal conductivity of a number of metallic, non-metallic and polymeric NPs cause significant changes in crystal formation in the cells to which they fall [58]. The first increase in the thermal conductivity of liquids by adding colloidal particles with high thermal conductivity, was theoretically proposed in 1881 by J.S. Maxwell [44]. It was assumed that the thermal conductivity of suspensions containing spherical particles increased with a rise in the volume share of solid particles. However, problems due to the relatively large size of colloidal particles (deposition, clogging and abrasion) prevented the implementation of this concept in practice. To solve these problems, S. Choi *et al.* [6] was the first who added the nanosized metal particles with high thermal conductivity to various liquids. Such suspensions, which included nanostructured materials, were called 'nanofluids'.

Thermal conductivity in solutions after the addition of NPs increases under the following conditions:

- direct heat transfer from one particle to another during Brownian motion [33];
- heat transfer from the solid to the liquid during its stratification at the liquid / particle interface [62];
- emergence of lower thermal resistance and a significant increase in thermal conductivity during the NPs clustering [33].

The results of experimental studies confirmed the change in thermal conductivity of water or aqueous solution of CPA after the addition of different types of NPs. Thus, the addition of 0.3% (v/v) copper NPs increased the thermal conductivity of water to 80% [29], and the addition of 0.005% NPs of gold did by 10% [47]. S. Jana *et al.* [29] reported an increase in water thermal conductivity of 35% after the addition of 0.8% (v/v) carbon nanotubes. The addition of a 1% solution of diamond NPs to ethylene glycol allowed the enhancement of its thermal conductivity up to 70% by increasing the heat transfer coefficient [32].

In addition, when comparing the thermal properties of nanofluids with the addition of NPs of identical nature, it is necessary to take into account such factors as the size and shape of the NPs, which affect the Brownian motion and interfacial properties of the dispersion. The measurement results of P. Warriar *et al.* [60] the thermal conductivity of nanofluids containing 0.3% silver NPs of three sizes (20, 40 and 80 nm) dispersed in an



давання 0,8% за об'ємом вуглецевих нанотрубок. Додавання 1% розчину НЧ алмазу в етиленгліколь дозволило посилити його теплопровідність до 70% за рахунок збільшення коефіцієнта теплопередачі [33].

Крім того, при порівнянні термічних властивостей нанорідин із додаванням НЧ ідентичної природи необхідно враховувати такі фактори, як розмір і форма НЧ, що впливають на броунівський рух і міжфазні властивості дисперсії. Результати вимірювання P. Wartier та співавт. [60] теплопровідності нанорідин, що містять 0,3% НЧ срібла трьох розмірів (20, 40 і 80 нм), диспергованих у водному розчині полівінілпіролідону, підтверджують її зниження зі зменшенням розміру частинок. У роботі M.S. Liu та співавт. [41] показана залежність теплопровідності нанорідин мідь-вода від форми і розміру НЧ. Показано, що максимальне підвищення теплопровідності цієї системи (23,8%) відбувалося при використанні сферичних НЧ міді (50–100 нм) у об'ємній частці 0,1%. Зміна форми НЧ міді від сферичної до голчастої (250 нм) знижувала на 11% теплопровідність нанорідин.

Більшість досліджень із вивчення теплопровідності нанорідин проводилися при кімнатній температурі. Роботи, які присвячені визначенню теплових параметрів нанорідин нижче температури їхнього фазового переходу, нечисленні [23, 26, 27]. Показано, що перспективним у цьому плані є використання НЧ алмазу і кремнію, які завдяки високій гідрофільності та невеликим розмірам, мають великий потенціал для посилення нуклеації в криопротекторних розчинах [26]. Наночастинки золота мають комплексний вплив на температуру нуклеації та фазового переходу розчину ДМСО [23]. Доведена ефективність використання НЧ гідроксіапатиту з метою зниження температури склування, температури девітрифікації та питомої теплоємності водних розчинів криопротекторів, що покращує їх теплопровідність [27].

Вищезазначені роботи створили теоретичну базу для застосування НЧ у кріобіологічній практиці. За допомогою методу скануючої електронної мікроскопії було показано, що НЧ гідроксіапатиту здатні прикріплюватися до мембран клітин Hela як кластери і адсорбовувати молекули води на своїй поверхні, в результаті чого частка вільної води в позаклітинному розчині зменшується, змінюючи його осмолярність [67]. Крім того встановлено, що НЧ гідроксіапатиту роблять розчин більш в'язким, що запобігає зневодненню клітин і сприяє ініціації нуклеації під час кріоконсервування [66].

Інший тип НЧ, які здатні перешкоджати надмірному росту кристалів льоду при заморожуванні, – це наноксиди, основний механізм дії яких полягає у зв'язуванні води і разупорядкуванні її

aqueous solution of polyvinylpyrrolidone, confirm its reduction with decreasing particle size. M.S. Liu *et al.* [40] reported about the dependence of the thermal conductivity of copper-water nanofluids on the NPs shape and size. It has been shown that the maximum increase in the thermal conductivity of this system (23.8%) is observed when the spherical copper NPs (50–100 nm) in a volume share of 0.1% are used. Changing the shape of the copper NPs from spherical to needle (250 nm) reduced the thermal conductivity of nanofluids by 11%.

Thermal conductivity of nanofluids was mostly studied at room temperature. There are few works on determining the thermal parameters of nanofluids below their phase transition temperature [19, 24, 25]. It is shown that optimistic in this regard is the use of diamond and silicon NPs, which due to a high hydrophilicity and small size, have great potential to enhance nucleation in cryoprotective solutions [24]. Gold nanoparticles have a complex effect on the nucleation temperature and phase transition of DMSO solution [19]. The efficiency of using hydroxyapatite NPs to reduce the glass transition temperature, devitrification temperature and specific heat of aqueous solutions of CPAs, which improves their thermal conductivity has been proven [25].

The above works have created a theoretical basis of using the NPs for cryopreservation of cells. Microscopic analysis showed that hydroxyapatite NPs were able to attach to the membranes of Hela cells as clusters and adsorb water molecules on their surface, resulting in a decrease in the proportion of free water in extracellular solution, changing its osmolarity [67]. In addition, hydroxyapatite NPs have been shown to make the solution more viscous, preventing cell dehydration and promoting nucleation initiation during cryopreservation [66].

Another type of NPs that can prevent excessive growth of ice crystals during freezing are nanooxides, the basic principle of which is to bind water and disrupt its structure to prevent the formation of elongated ice crystals at low temperatures [22]. It is advisable to use complex nano-oxides ($\text{Al}_2\text{O}_3 / \text{SiO}_2$ and $\text{TiO}_2 / \text{SiO}_2$) with a maximum specific surface area to enhance disturbances in the structure of the H-bond networks of water molecules, as it is known that the distances between adjacent adsorption centers (OH groups) on the surface of aluminum silicon and titanium oxides (0.31–0.35 nm) exceed the ones between the oxygen atoms of neighboring water molecules (0.27–0.28 nm) in the network of H-bonds. In addition, the orientation of water molecules in clusters, interacting



структури з метою запобігання утворення подовжених кристалів льоду при низьких температурах [3]. Доцільно використовувати складні наноксиди ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ і $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$) з максимальною питомою поверхнею для посилення порушень у структурі сіток Н-зв'язків молекул води, оскільки відомо, що відстані між сусідніми адсорбційними центрами (ОН-групами) на поверхні оксидів алюмінію, кремнію і титану (0,31–0,35 нм) перевищують відстані між атомами кисню сусідніх молекул води (0,27–0,28 нм) у сітці Н-зв'язків. Крім того, орієнтація молекул води в кластерах, які взаємодіють із ОН-групами на поверхні НЧ, відрізняється від орієнтації сусідніх молекул води в льоду. Ці фактори обумовлюють порушення шару води, який пов'язаний з поверхнею оксидів, в порівнянні зі структурою як «вільної» води, так і льоду. При цьому «зв'язана» вода залишається рухомою при $T < 273 \text{ K}$, при якій зазвичай вільна вода замерзає [4, 24].

Припущення, що слідові кількості НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 є потужними індукторами гетерогенного зародкоутворення кристалів льоду, отримало експериментальне підтвердження в дослідженнях А. Kobayashi та співавт. [38]. Так, додавання таких НЧ розміром 50–100 нм у зразки надчистої води практично виключало переохолодження. Цей факт доводить, що магнітні НЧ є ефективними центрами зародкоутворення, які забезпечують гетерогенну кристалізацію льоду і зменшення його об'ємного розширення.

Таким чином, ступінь переохолодження, гідратації та в'язкості водного розчину кріопротектора є основними параметрами, які можуть бути змінені шляхом додавання НЧ за рахунок інгібіції формування і подальшого росту кристалів льоду під час заморожування і рекристалізації при відігріві. Здатність НЧ потенціювати досягнення кріозахисним розчином кристалічного і склоподібного стану під час заморожування клітин дозволяє підвищити показники їх життєздатності після деконсервування.

Альтернативним підходом до реалізації процесу заморожування-відігріву, за якого можуть бути успішно використані сучасні досягнення нанотехнології, є вітрифікація. На сьогоднішній день цей підхід здатний забезпечити успішне кріоконсервування клітин і тканин, оскільки повністю виключає пошкодження, обумовлене фізико-хімічними факторами, які супроводжують фазовий перехід «вода-лід». Незважаючи на багато переваг вітрифікації в порівнянні з використанням повільних швидкостей охолодження, існує низка проблем при її використанні для заморожування біоб'єктів. Однією з них є рекристалізація льоду в вітри-

with OH groups on the NP surface, differs from that of neighboring water molecules in ice. These factors cause the disorder of the water layer, which is associated with the surface of the oxides, in comparison with the structure of both 'free' water and ice. In this case, the 'bound' water remains mobile at $T < 273 \text{ K}$, at which free water usually freezes [20, 21].

The assumption that trace amounts of iron oxide (Fe_3O_4) NPs are the potent inducers of heterogeneous ice-crystal nucleation has been experimentally confirmed in the studies of A. Kobayashi *et al.* [37]. Thus, also adding such NPs with a size of 50–100 nm to the samples of ultrapure water virtually eliminated supercooling. This fact proves that magnetic NPs are effective nucleation centers that provide heterogeneous crystallization of ice and reduction of its volumetric expansion.

Thus, the degree of supercooling, hydration and viscosity of the aqueous CPA solution are the main parameters that can be changed when the NPs are added, by inhibiting the formation and subsequent growth of ice crystals during freezing and recrystallization during heating. The ability of NPs to potentiate the achieving by cryoprotective solution of the crystalline and vitreous state during freezing of cells allows their increased viability after thawing.

An alternative approach to the implementation of the freeze-warming, which can successfully use modern advances in nanotechnology, is vitrification. To date, this approach is able to ensure the successful cryopreservation of cells and tissues, as it completely eliminates the damage caused by physicochemical factors that accompany the 'water-ice' phase transition. Despite the many advantages of vitrification over the use of slow cooling rates, there are numerous problems with its application for freezing of cells. One of them is the recrystallization of ice in vitrified samples during heating, because the crystals formed can mechanically damage the cell. Among the ways to reduce the impact of these negative processes is a very encouraging use of NPs. This approach is called 'nanowarming' [2]. The effectiveness of this process is determined by the CPA nature, concentration and size of the NPs introduced into the solution.

The most significant decrease (by 40%) in the amount of free water during heating was found after adding 0.1% hydroxyapatite NPs sized of 60 nm to glycerol compared to the solution without NPs [41]. This property of hydroxyapatite NPs is the justification for their use to prevent recrystallization and growth of ice crystals



фікованих зразках під час відігріву, оскільки кристали, що утворюються, можуть механічно пошкоджувати клітину. Серед способів зниження впливу цих негативних процесів досить перспективне використання НЧ. Цей підхід отримав назву «нано-відігрів» [7]. Ефективність такого процесу визначається природою криопротектора, концентрацією та розмірами внесених у розчин НЧ.

Найбільш значуще зниження (на 40%) кількості вільної води в процесі відігріву встановлено після додавання до гліцерину 0,1% НЧ гідроксіапатиту розміром 60 нм у порівнянні з розчином без НЧ [42]. Ця властивість НЧ гідроксіапатиту є обґрунтуванням їх застосування для запобігання рекристалізації та росту кристалів льоду під час відтавання при девітрифікації біооб'єктів. X. Zhou та співавт. [71] довели, що НЧ гідроксіапатиту в концентрації 0,05% максимально запобігали рекристалізації розчину після вітрифікації (фосфатний буфер, що містить 15% ДМСО, 15% етиленгліколю і 0,5 М сахарози) під час розморожування ооцитів свині. Показано, що додавання 0,01, 0,02, 0,05 і 0,1% НЧ гідроксіапатиту до розчину для вітрифікації сприяло підвищенню виживаності ооцитів до 25,9–35,4%, що було значно вищим за показники контрольної групи (14,7%). Аналогічні результати були отримані W. Li та співавт. [39]. Було встановлено, що кількість життєздатних ооцитів після вітрифікації в розчині криопротекторів (15% ДМСО + 15% етиленгліколю + 0,5 моль/л сахарози) з додаванням 0,1% НЧ гідроксіапатиту і подальшого культивування (42 години) була в два рази вище, ніж у контролі.

Іншою стратегією для подолання проблем, пов'язаних із девітрифікацією, є електромагнітний відігрів біооб'єктів із використанням магнітних НЧ. Даний метод забезпечує більш високу швидкість і більш рівномірний нагрів, ніж звичайне розморожування на водяній бані за рахунок виділення тепла НЧ при збудженні в радіочастотному полі [59].

За допомогою методу криомікроскопії була продемонстрована здатність суперпарамагнітних НЧ Ferrotec EMG308 діаметром $(10 \pm 2,5)$ нм запобігати як формуванню зародків льоду, так і росту кристалів при відігріві розчину для вітрифікації, який містив 3,1 М ДМСО, 2,2 М пропіленгліколю і 3,1 М формаміду [63]. У інших дослідженнях НЧ Fe_3O_4 були використані для магнітно-індукованої девітрифікації мезенхімальних стовбурових клітин кордової крові людини, консервованих у присутності трегалози. J. Wang та співавт. [57] показали, що такий підхід до відігріву МСК сприяє збереженню ними $\text{CD44}^+\text{CD31}^+$ -фенотипу і здатності до мультилінійного диференціювання на рівні натив-

during thawing in devitrification of cells. X. Zhou *et al.* [71] proved that hydroxyapatite NPs at a concentration of 0.05% maximally prevented the recrystallization of the solution after vitrification (phosphate buffer containing 15% DMSO, 15% ethylene glycol and 0.5 M sucrose) during thawing of pig oocytes. It has been shown that when 0.01, 0.02, 0.05 and 0.1% hydroxyapatite NPs were added into vitrification solution, the survival of oocytes after *in vitro* maturation ranged from 25.9 to 35.4%, that is significantly higher than in the group without hydroxyapatite NPs (14.7 %). Similar results were obtained by W. Li *et al.* [38]. The authors found that the number of viable oocytes after vitrification in a solution of CPAs (15% DMSO + 15% ethylene glycol + 0.5% sucrose) with adding 0.1% hydroxyapatite NPs and subsequent cultivation (42 hours) was twice as high, than in the control.

Another strategy to overcome the problems associated with devitrification is the electromagnetic heating of biological objects using magnetic NPs. This method provides a higher speed and more uniform heating than conventional thawing in a water bath due to the release of NPs heat when excited in a radio frequency field [59].

With cryomicroscopy there was demonstrated the ability of superparamagnetic Ferrotec EMG308 NPs with a diameter of (10 ± 2.5) nm to prevent both the formation of ice nuclei and the growth of crystals when heating the solution for vitrification: 3.1 M DMSO, 2.2 M propylene glycol and 3.1 M formamide [63]. In other studies, Fe_3O_4 NPs were used for magnetically induced devitrification of MSCs of human cord blood preserved with trehalose. J. Wang *et al.* [57] showed that this approach to MSC heating helped to preserve the $\text{CD44}^+\text{CD31}^+$ phenotype and the ability to multilineal differentiation at the level of native control. The authors found that Fe_3O_4 NPs had minimal toxicity to mesenchymal stem cells (MSCs) and themselves (in the absence of an external alternating current magnetic field) did not affect the viability of cells after heating.

In addition, a significant obstacle during the vitrification of large volume tissue samples is their significant heat resistance. The conditions for successful thawing of such samples are the use of the maximum possible heating rates, which avoid the recrystallization of the samples, and these rates are usually an order of magnitude higher than the corresponding cooling rate [10]. In addition, the heating rate should be applied evenly throughout the sample to prevent temperature gradients that cause a thermal stress on tissue, leading to



ного контролю. При цьому автори встановили, що НЧ Fe_3O_4 мають мінімальну токсичність по відношенню до МСК та самі (за відсутності зовнішнього магнітного поля змінного струму) не впливають на життєздатність клітин після їх відігріву.

Крім того, істотна перешкода під час вітрифікації зразків тканини великого об'єму – це їх значна термостійкість. Умовами успішного деконсервування таких зразків є використання максимально можливих швидкостей нагріву, які дозволяють уникнути рекристалізації зразків, і ці швидкості зазвичай на порядок вище, ніж відповідна швидкість охолодження [15]. Крім того, швидкість відігріву повинна реалізовуватися рівномірно по всьому об'єму зразка з метою запобігання виникнення температурних градієнтів, які викликають термонапруження тканини, приводячи до її розтріскування. За допомогою традиційного конвекційного відігріву ці умови можуть бути виконані лише для зразків невеликого об'єму ($1\text{--}3\text{ мм}^3$) [9], але для зразків об'ємом від 1 до 80 мм^3 можливо досягти за рахунок використання відповідних НЧ у певній концентрації. Показано, що відігрів вітрифікованих коронарних артерій і стулок клапана серця аорти свині шляхом радіочастотного збудження НЧ оксиду заліза, вкритих кремнеземною оболонкою, значно покращує їх життєздатність порівняно з конвекційним відігрівом за відсутності значних змін біомеханічних властивостей органів [43].

Використання нанострижнів золота при лазерному відігріві вітрифікованих ембріонів риб *Danio rerio* [36] забезпечило їх високу виживаність за рахунок запобігання внутрішньоклітинної рекристалізації. Водночас застосування традиційного конвекційного відігріву обумовило високі показники загибелі ембріонів. Збільшення швидкості відігріву за умов застосування лазера засновано на здатності нанострижнів золота ефективно генерувати тепло при відповідності довжини хвилі лазера енергії поверхневого плазмонного резонансу НЧ. У сукупності ці результати демонструють можливість НЧ значно підвищувати ефективність вітрифікації клітин і тканин.

Кріозахисна дія НЧ на клітини може бути опосередкована їх впливом не тільки на кристалотворення і теплопровідність кріопротекторів, але й іншими властивостями. А. V. Isaac та співавт. [29] показали зниження рівня пошкодження хроматину в сперміях і зменшення вмісту малонового діальдегіду в еякуляті чоловіків із нормозоспермією після кріоконсервування в кріозахисному середовищі з додаванням НЧ оксиду цинку, ніж у зразках без використання НЧ. Малоновий діальдегід – біомаркер перекисного

cracking. With the help of traditional convection heating, these conditions can be met only for samples of small volume ($1\text{--}3\text{ мм}^3$) [4], but for those with a volume of 1 to 80 мм^3 this can be achieved by using the appropriate NPs in appropriate concentration. It has been shown that heating of vitrified coronary arteries and leaflets of the porcine aortic heart valve by radiofrequency excitation of silica-coated iron oxide NPs significantly improves their viability compared to convection heating in the absence of significant changes in organ biomechanical properties [43].

The use of gold nanorods in the laser heating of vitrified fish embryos *Danio rerio* [35] ensured their high survival by preventing intracellular recrystallization. At the same time, the use of traditional convection heating has led to high rates of embryo death. The increase in the heating rate at laser application is based on the ability of gold nanorods to efficiently generate heat when the laser wavelength corresponds to the NPs surface plasmon resonance energy. Taken together, these results demonstrate the ability of NPs to significantly improve the vitrification results for cells and tissues.

Cryoprotective effect of NPs on cells can be mediated by their influence not only on crystal formation and thermal conductivity of CPAs, but also other properties. A. V. Isaac *et al.* [28] showed a decreased damage of chromatin in sperm and the amount of malonic dialdehyde in the ejaculate of men with normozoospermia after cryopreservation in a cryoprotective medium with the addition of zinc oxide if compared to the samples without NPs. Malonic dialdehyde is a biomarker of membrane lipid peroxidation, in particular omega-3 and omega-6 fatty acids. The notably lower level of malonic dialdehyde in the group with zinc oxide NPs indicates their ability to neutralize the harmful effects of reactive oxygen species (ROS) generated during the freeze-warming. Unique feature of zinc oxide NPs is the presence of electron-hole excitonic pairs (e^- , h^+), which are able to initiate redox reactions [52]. Electrons in the zinc oxide NPs, being in an excited state, have a high energy, which allows them to effectively remove ROS, protecting cell membranes against the destructive influence of oxidative stress.

Moreover the protective effect of NPs may be stipulated with their participation in redox processes. In particular, cerium NPs, due to their chemical structure, are able to perform the catalase function of chemical degradation of H_2O_2 [10]. This property of cerium NPs has been used to improve the storage results of algae cells under low positive



окиснення ліпідів мембран, зокрема омега-3 і омега-6 жирних кислот. Виявлений значно нижчий рівень малонового діальдегіду у групі з додаванням НЧ оксиду цинку свідчить про їх здатність нейтралізувати шкідливу дію активних форм кисню (АФК), що генеруються під час процесу заморожування-відігріву. Унікальна особливість НЧ оксиду цинку полягає в наявності у них електронно-діркових екситонних пар (e^- , h^+), які здатні ініціювати окисно-відновлювальні реакції [53]. Електрони в НЧ оксиду цинку, перебуваючи в збудженому стані, володіють високою енергією, що дозволяє їм ефективно інактивувати АФК, захищаючи мембрани клітин від руйнівних наслідків окисаційного стресу.

Крім того, захисний ефект НЧ може бути обумовлений їх участю в окисно-відновлювальних процесах. Зокрема, НЧ церію, завдяки своїй хімічній структурі, здатні виконувати каталазну функцію з хімічної деградації H_2O_2 [5]. Ця властивість НЧ церію була використана для поліпшення результатів зберігання клітин водоростей за умов низьких позитивних температур [2]. Авторами показано, що після трьох тижнів гіпотермічного зберігання в розчині з додаванням 0,02 г/л НЧ діоксиду церію життєздатними залишилися 80–90% клітин *Spirulina platensis*, а в контрольній групі без НЧ живих клітин виявлено не було.

S. Safa та співавт. [52] продемонстрували, що комбіноване додавання 5 мг/мл вітаміну Е і 1% НЧ селену до сперматозоїдів півня має криозахисний ефект і значно підвищує якість сперми, збільшуючи рухливість, життєздатність і цілісність мембрани сперматозоїдів за рахунок зниження інтенсивності перекисного окислення ліпідів після заморожування-відтавання. Можливо, це пов'язано з тим, що селен є складовою ферменту глутатіонпероксидази, який відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті ліпідів клітинних мембран [35]. Крім того, селенові домішки підвищують активність аденозинтрифосфат (АТФ)-утилізуючих і АТФ-регенеруючих ферментів сперматозоїдів, які покращують рухливість і споживання кисню сперматозоїдами [44].

Перспективними в плані стимуляції антиоксидантного захисту є НЧ золота. У дослідженні G. Kirdaite та співавт. [37] була показана здатність НЧ золота зменшувати продукцію малонового діальдегіду за значного підвищення активності каталази, яка вважається основним ферментом антиоксидантного захисту і здійснює пряму елімінацію АФК. Антиоксидантні властивості НЧ золота можуть обумовлювати їхні криозахисні властивості. Більш того, E.V. Pavlovich та співавт. [49] була відзначена стимуляція проліферативної активності

temperatures [27]. The authors showed that after three weeks of hypothermic storage in solution with the addition of 0.02 g/l of NP cerium dioxide, 80–90% of *Spirulina platensis* cells remained viable, and in the control group no living cells were found without NPs.

S. Safa *et al.* [51] demonstrated that the combined addition of 5 mg/ml vitamin E and 1% selenium NPs to rooster sperm had a cryoprotective effect and remarkably improved sperm quality, increasing the motility, viability and integrity of the sperm membrane by reducing the intensity of peroxidation after freeze-thawing. This may be due to the fact that selenium is a component of the enzyme glutathione peroxidase, which plays an important role in the antioxidant protection of cell membrane lipids [34]. In addition, selenium impurities increase the activity of adenosine triphosphate (ATP)-utilizing and ATP-regenerating sperm enzymes, which boost sperm motility and oxygen consumption [43].

Gold NPs are favorable in terms of stimulating antioxidant protection. In the research by G. Kirdaite *et al.* [36] there was shown the ability of gold NPs to reduce the production of malonic dialdehyde with a significant rise in the activity of catalase, which was considered the main enzyme of antioxidant protection and directly eliminated ROS. The antioxidant properties of gold NPs can determine their cryoprotective properties. E.V. Pavlovich *et al.* [48] noted a slight stimulation of the proliferative activity of human fibroblasts, pre-frozen with the addition of 1.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ gold NPs, after further cultivation *in vitro* for 5 days. At the same time, high concentrations of gold NPs (3 and 6 $\mu\text{g} / \text{ml}$) reduced the proliferative potential of these cells, especially when cultured for 5–7 days *in vitro*.

Thus, some types of NPs have properties that allow them to be used to increase the efficiency of cryopreservation of cells. These properties are largely determined by the chemical composition of the NPs, their size, shape, surface charge and so on. In this case, the cryoprotective effect of the NPs, depending on their characteristics, will be implemented by different mechanisms.

Nanoparticles are actively used not only to freeze cell suspensions, but also to perform cryoablation of pathological foci due to the ability of some types of NPs to increase the likelihood of intracellular ice formation *in situ*. The active development of this method of treatment is associated with the development of closed cryoprobes, in which liquid nitrogen circulates, causing the destruction of the focus of pathologically altered tissue [7].



фібробластів людини, попередньо заморожених із додаванням 1,5 мкг/мл НЧ золота, після подальшого культивування *in vitro* протягом 5-ти діб. При цьому великі концентрації НЧ золота (3 і 6 мкг/мл) знижували проліферативний потенціал даних клітин, особливо за культивування протягом 5–7 діб *in vitro*.

Таким чином, деякі типи НЧ володіють властивостями, які дозволяють використовувати їх для підвищення ефективності кріоконсервування клітин. Ці властивості багато в чому визначаються хімічним складом НЧ, їх розміром, формою, поверхневим зарядом тощо. При цьому кріозахисний ефект НЧ залежно від їх характеристик буде реалізовуватися за різними механізмами.

Наночастинки активно застосовуються не тільки з метою заморожування клітинних суспензій, але і при проведенні кріоабляції патологічних осередків за рахунок здатності деяких видів НЧ збільшувати ймовірність внутрішньоклітинного утворення льоду *in situ*. Активний розвиток даного способу лікування пов'язують із розробкою закритих кріозондів, в яких циркулює рідкий азот, застосування якого викликає руйнування вогнища патологічно зміненої тканини [12]. Авторами було показано, що витримка кріозонда в тканині протягом 1–2 хв при температурі -20°C була достатньою для формування зони некрозу в мозку пацієнтів, які страждають на хворобу Паркінсона. Подальші дослідження показали, що клітинам різного походження притаманна загибель у широкому температурному діапазоні ($-2\dots-70^{\circ}\text{C}$) [18]. Це визначається не тільки особливостями будови клітин, а й швидкістю охолодження тканини, часом витримки кріозонда при кінцевій температурі охолодження, швидкістю відтавання тощо.

Суттєвою проблемою при проведенні кріоабляційної терапії є нерівномірне промерзання тканини всередині та на периферії зони кріоабляції. Якщо в центральній зоні внутрішньоклітинне формування кристалів льоду призводить до механічної травми і дегідратації клітин із наступним їх осмотичним пошкодженням і загибеллю шляхом некрозу, то в периферійній зоні кріоабляції внутрішньоклітинне кристалоутворення відсутнє, і загибель пухлинних клітин відбувається переважно за типом апоптозу [51].

Загибель пухлинних клітин шляхом некрозу викликає вивільнення їх внутрішньоклітинного вмісту, зокрема ДНК, РНК і специфічних білків пухлин [31]. Ці антигени можуть розпізнаватися імунною системою, ініціюючи специфічну протипухлинну імунну відповідь. Крім того, важливим є вивільнення білків теплового шоку (БТШ)

The authors showed that the exposure of the cryoprobe in the tissue for 1–2 minutes at a temperature of -20°C was sufficient to form a necrosis zone in the brain of patients with Parkinson's disease. Subsequent studies have shown that cells of various origins are characterized by a death in a wide temperature range ($-2\dots-70^{\circ}\text{C}$) [13]. This is determined not only by the peculiarities of cell structure, but also by the rate of the tissue cooling, the time of exposure of the cryoprobe at the final cooling temperature, the rate of thawing, *etc.*

A significant problem in cryoablation therapy is the uneven freezing of tissue inside and on the periphery of the cryoablation zone. If in the central zone the intracellular formation of ice crystals leads to a mechanical trauma and dehydration of cells followed by their osmotic damage and death by necrosis, then in the peripheral zone of cryoablation intracellular crystal formation is absent and tumor cell death occurs mainly by apoptosis [51].

An important advantage of cryoablation is that the death of tumor cells by necrosis causes the release of their intracellular contents, in particular DNA, RNA and specific tumor proteins [30]. These antigens can be recognized by the immune system, initiating a specific antitumor immune response. In addition, it is important to release heat shock proteins (HSP) in the case of cell death by necrosis after cryotherapy. Since HSP70 is able to stimulate the maturation of dendritic cells with subsequent activation of T cells and the development of a specific immune response [1], maximum cell death by necrosis will contribute to the effectiveness of cryoablation therapy.

One of the significant problems is that the cells of the peripheral zone of cryoablation die by apoptosis without the release of DNA, RNA and HSP. In the absence of these signals, dendritic cells remain immature, maintaining the immunosuppressed state of the tumor carrier with the development of T cell anergy. Therefore, cryoablation, depending on the completeness of freezing of the pathological focus can have both stimulating and suppressive effects on the immune system of the tumor carrier.

The efficiency of cryoablation (in the sense of achieving the maximum number of necrotic cells) will be determined by a number of conditions, namely: cooling and heating rates, duration and final temperature of the cryoprobe, the number of freeze-warm cycles, and design features of the cryoprobe.

A perspective strategy to increase the effectiveness of cryoablation is the use of combination the-



в разі загибелі клітин шляхом некрозу після кріовпливу. З огляду на те, що БТШ70 здатний стимулювати дозрівання дендритних клітин із наступною активацією Т-клітин і розвитком специфічної імунної відповіді [6], максимальна загибель клітин шляхом некрозу сприятиме ефективності кріоабляційної терапії.

Однією з суттєвих проблем є те, що клітини периферійної зони кріоабляції гинуть шляхом апоптозу без вивільнення ДНК, РНК і БТШ. За відсутності цих сигналів дендритні клітини залишаються незрілими, підтримуючи імунодепресивний стан організму пухлиноносія з розвитком анергії Т-клітин. Отже, кріоабляція залежно від повноти промерзання патологічного вогнища може мати як стимулюючий, так і супресивний вплив на імунну систему пухлиноносія.

Ефективність кріоабляції (в розумінні досягнення максимальної кількості некротичних клітин) буде визначатися рядом умов, а саме: швидкістю охолодження і відігріву, тривалістю і кінцевою температурою витримки кріозонда, його конструктивними особливостями та кількістю циклів заморожування-відігріву.

Перспективною стратегією підвищення ефективності кріоабляції є використання комбінованої терапії. Зокрема, були визначені ад'юванти, які можуть посилити деструктивний ефект кріовпливу в периферійній зоні, що дозволяє знизити кінцеву температуру охолодження до -20°C [19]. На сьогоднішній день в якості таких ад'ювантів можуть виступати антифризні білки, різні сольові розчини, хіміотерапевтичні засоби (блеоміцин, 5-фторурацил, фактор некрозу пухлини-альфа тощо) [25, 32].

Перспективним в цьому плані може бути локальне введення НЧ у пухлинний сайт перед проведенням кріоабляційної процедури [40, 64]. Вже отримані експериментальні дані, які свідчать про унікальні теплопровідні властивості НЧ, тому ефективність комбінованої кріоабляції з використанням НЧ зазвичай перевершує звичайні кріохірургічні операції [13, 65].

Основні переваги нанокріохірургії:

- збільшення ступеня промерзання тканини, що дозволяє підвищити ефективність елімінації таргетних пухлинних клітин;
- запобігання ймовірності недостатнього промерзання тканини між декількома кріозондами під час абляції великої пухлини;
- регуляція напрямку росту і орієнтації крижаної кулі, що є передумовою «слухняної» кріоабляції у випадку складних пухлин;
- зменшення впливу низьких температур на прилеглі до пухлини здорові тканини, що запобігає їх травмуванню.

rapy. In particular, adjuvants have been identified that can enhance the destructive effect of cryotherapy in the peripheral zone, which allows the reduction of final cooling temperature to -20°C [14]. To date, such adjuvants can be antifreeze proteins, various saline solutions, chemotherapeutic agents (bleomycin, 5-fluorouracil, tumor necrosis factor-alpha) [23, 31].

Encouraging in this regard may be the local introduction of NPs into the tumor site before the cryoablation [39, 64]. Experimental data have already been obtained that indicate the unique thermally conductive properties of NPs, so the efficiency of combination cryoablation using NPs is usually superior to conventional cryosurgery [8, 65].

The main advantages of nanocryosurgery:

- increasing the degree of tissue freezing-out, which enhances the efficiency of elimination of target cancer cells;
- preventing the possibility of insufficient freezing of tissue between several cryoprobes during ablation of a large tumor;
- regulation of the direction of growth and orientation of the ice ball, which is a prerequisite for 'manageable' cryoablation in the case of complex tumors;
- reducing the impact of low temperatures on healthy tissues adjacent to the tumor, which prevents their injury.

The probability of intracellular ice formation can be enhanced by using NPs with high thermal conductivity of Fe_3O_4 , TiO_2 , Al_2O_3 , which are able to increase the rate of ice ball formation *in situ*, thereby significantly increasing the efficiency of tissue freezing [8, 65, 68]. Thus, previous studies in cubic blocks of pig muscle tissue measuring $100 \times 80 \times 50$ mm have shown that the injection of aluminum NPs into pig tissue led to a local decrease in temperature to -115°C at a distance of 5 mm from the cryoprobe wall [68]. At the same time, cryoexposure without NPs injection reduced the temperature only to -75°C at the same distance from the probe under similar freezing conditions. In addition, when using the NPs, there was a larger 'scale' of freezing, estimated by the size of the ice ball. This is due to the increased thermal conductivity of the tissue because of the addition of NPs.

Similar *in vivo* studies have shown that locally injected magnesium oxide (MgO) NPs into the rabbit muscle significantly enhances tissue thermal conductivity, increases the rate of freezing, and gets bigger the volume of the ice ball compared to control cryoablation without the use of NPs.



Ймовірність внутрішньоклітинного утворення льоду може бути посилена шляхом використання НЧ із високою теплопровідністю, а саме: Fe_3O_4 , TiO_2 , Al_2O_3 , які здатні збільшити швидкість утворення крижаної кулі *in situ*, тим самим істотно підвищити ефективність промерзання тканини [13, 65, 68]. Так, попередні дослідження на кубовидних блоках м'язової тканини свині розміром $100 \times 80 \times 50$ мм показали, що ін'єкція НЧ алюмінію в тканину свині привела до локального зниження температури до -115°C на відстані 5 мм від стінки кріозонда [68]. При цьому кріовплив без ін'єкції НЧ зменшував температуру лише до -75°C на тій самій відстані від зонда за аналогічних умов заморожування. Крім того, при використанні НЧ спостерігався більший «масштаб» замерзання, оцінений за розміром крижаної кулі. Це пов'язано з підвищенням теплопровідності тканини за рахунок додавання НЧ.

Подібні дослідження *in vivo* продемонстрували, що локальне введення НЧ оксиду магнію (MgO) у м'язову тканину експериментальних тварин значно посилювало теплопровідність тканини, підвищувало швидкість проморожування і об'єм крижаної кулі в порівнянні з кріоблацією без використання НЧ. Це призводило до більшого кріоушкодження тканини. Механізм такої дії НЧ опосередкований ініціацією гетерогенної нуклеації, яка забезпечує більш високу ймовірність утворення внутрішньоклітинного льоду і таким чином підсилює некроз тканини після кріовпливу. Водночас встановлено, що наночастинкам MgO притаманна не тільки висока теплопровідність, але й біосумісність і здатність до біодеструкції. Цей факт дозволяє припустити їх високу ефективність при проведенні кріонаноабляції пухлин [13].

Ефективність цього підходу була підтверджена *in vitro* при кріоконсервуванні суспензії клітин раку молочної залози лінії MCF-7 [65]. Показано, що додавання НЧ Fe_3O_4 збільшує ймовірність внутрішньоклітинного утворення льоду в процесі заморожування і підсилює рекристалізацію клітин, що викликає їх загибель. Автори охолоджували суспензію клітин MCF-7 від кімнатної температури до -40°C зі швидкістю 5 град/хв, витримували при кінцевій температурі протягом 1 хв і потім відігрівали до кімнатної температури зі швидкістю 100 град/хв. Увесь процес контролювали за допомогою кріомікроскопії. Показано, що обробка пухлинних клітин НЧ у концентрації 100 і 1000 мкг/мл дозозалежно збільшувала ймовірність внутрішньоклітинного льодоутворення, що є основною причиною загибелі клітин. При цьому НЧ у концентрації 10 мкг/мл, навпаки, зменшували ймовірність утворення внутрішньоклітинних кристалів

This led to greater cryodamage to the tissue. The mechanism of this action of NPs is mediated by the initiation of heterogeneous nucleation, which provides a higher probability of intracellular ice formation and thus enhances tissue necrosis after cryopreservation. At the same time, it has been found that MgO nanoparticles have not only high thermal conductivity, but also biocompatibility and biodegradation ability. This fact suggests their high efficiency in cryonanoablation of tumors [8].

The effectiveness of this approach has been confirmed *in vitro* in the cryopreservation of a suspension of the MCF-7 breast cancer cells [65]. It is shown that the addition of Fe_3O_4 NPs increases the probability of intracellular ice formation during freezing and enhances the recrystallization of cells, that causes their death. The authors cooled the suspension of MCF-7 cells from room temperature down to -40°C at a rate of 5 deg/min, kept at a final temperature for 1 min, and then warmed to room temperature at a rate of 100 deg/min. The whole process was monitored by cryomicroscopy. It was shown that the treatment of tumor cells with NPs at a concentration of 100 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ dose-dependently increased the likelihood of intracellular ice formation, which is the main cause of cell death. At the same time, NPs at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, on the contrary, reduced the probability of formation of intracellular crystals in comparison with the control, increasing the viability of cryopreserved tumor cells [65]. Thus, the authors suggest when rising the NPs concentration, their clustering occurs, which enlarges the volume and surface area of the NPs and reduces the interfacial energy. Such changes increase the probability of intracellular crystal formation by adsorption of H_2O molecules on the surface of these clusters, which enhanced the destruction of cells during their heating due to recrystallization of these crystals.

Nanoparticles of non-metallic nature, on the contrary, are able to reduce the thermal conductivity of the tissue, so they can also be used in cryosurgery. However, their function is not to strengthen, but to weaken the heat transfer in a particular area of tissue, which prevents the freezing of healthy tissues surrounding the target tumor during cryoablation [39]. Such non-metallic NPs are introduced along the edges of a solid tumor to 'protect' normal tissues.

Thus, nanocryosurgery is able to provide flexible control of the cryosurgical process, potentiating the freezing of pathologically altered tissue and preventing damage to normal.



у порівнянні з контролем, підвищуючи життєздатність кріоконсервованих пухлинних клітин [65]. Таким чином, автори припускають, що за умов підвищення концентрації НЧ відбувається їх кластеризація, що збільшує обсяг і площу поверхні НЧ та знижує міжфазну енергію. Такі зміни підвищують ймовірність внутрішньоклітинного кристалоутворення шляхом адсорбції молекул H_2O на поверхні даних кластерів, що посилювало руйнування клітин при їх відігріві за рахунок рекристалізації.

Наночастинки неметалевої природи, навпаки, здатні знижувати теплопровідність тканини, тому також можуть використовуватися в кріонанохірургії. Однак їх функція полягає не в посиленні, а в ослабленні перенесення тепла в конкретній зоні тканини, що запобігає промерзанню здорових тканин, які оточують пухлину-мішень під час проведення кріоабляції [40]. Такі НЧ неметалевої природи вводяться по краях солідної пухлини для «захисту» нормальних тканин.

Таким чином, нанокріохірургія здатна забезпечити гнучкий контроль кріохірургічного процесу, потенціюючи проморожування патологічно зміненої тканини і запобігаючи пошкодженню нормальної.

Однак підґрунтям до здійснення кріонанохірургічних втручань є проведення глибоких експериментальних досліджень. Кріобіологічні дослідження, виконані з використанням суспензії пухлинних клітин, не визначають усі закономірності кріоабляційного впливу на тканини пухлини, але саме суспензійні культури можуть дати загальне уявлення про особливості відповіді пухлинних (зокрема, стовбурових ракових) клітин на фізико-хімічні фактори, які реалізуються в процесі низькотемпературного заморожування. Більш того, оцінка функціонального стану клітин після кріовпливу, включаючи їх здатність до проліферації після екстремальних фізико-хімічних чинників, неможлива при використанні солідних моделей пухлини.

Зручною моделлю для проведення подібного роду експериментальних досліджень є асцитна форма аденокарциноми Ерліха (АКЕ), яка була отримана зі спонтанного раку молочної залози миші. Доведена можливість НЧ на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів пригнічувати ріст пухлини *in vivo* [1, 21, 22]. Отримані результати свідчать про залежність типу загибелі клітин АКЕ, зміни їх фенотипових характеристик і функціонального потенціалу від кінцевої температури охолодження [20]. Дослідження поєднаного застосування НЧ і факторів низькотемпературного заморожування є новим перспективним напрямком експериментальної наноонкології.

However, the basis for the implementation of cryosurgical interventions is the performance of profound experimental studies. Cryobiological studies carried-out using a suspension of tumor cells do not determine all the patterns of cryoablation on tumor tissues, but suspension cultures can give a general idea of the response of tumor cells, including stem cells, to physicochemical factors that are implemented during low-temperature freezing. Moreover, the assessment of functional state of cells after cryoexposure, including their ability to proliferate after extreme physicochemical factors, is impossible when using solid tumor models.

A convenient model for this kind of experimental research is the Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cell line, which was obtained from spontaneous mouse breast cancer. The possibility of NPs based on orthovanadates of rare earth elements to inhibit tumor growth *in vivo* has been proven [16–18]. The obtained results indicate the dependence of the type of EAC cell death, changes in their phenotypic characteristics and functional potential on the final temperature of cooling [15]. The study of the combined use of NPs and low-temperature freezing is a new optimistic area of experimental nanooncology.

In the main, there are all prerequisites to believe that modern nanocryobiological approaches will occupy a worthy place in the general list of technologies used in cryobiology and cryomedicine to successfully solve the tasks.

References

1. Basu S, Binder RJ, Suto R, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol*. 2000; 12(11): 1539–46.
2. Bischof J. Nanowarming: A new concept in tissue and organ preservation. *Cryobiology* [Internet]. 2015 [cited 8.01.2020]; 71(1): 176. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224015001236>
3. Blanc G. Sur les nanotechnologies. *Futuribles*. 2004; 293: 57–62.
4. Brockbank KGM, Chen Z, Greene ED, Campbell LH. Vitrification of heart valve tissues. In: Wolkers FW, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. New York: Springer; 2015. p. 399–421.
5. Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, et al. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat Nanotechnol*. 2012; 7(6): 383–8.
6. Choi SUS, Eastman JA. Enhancing thermal conductivity of fluids with nanoparticles, developments and application of non-newtonian flows. In: Siginer DA, Wang HP, editors. *Developments and applications of non-newtonian flows*. New York: ASME; 1995. p. 99–105.



У цілому існують усі передумови вважати, що сучасні нанокріобіологічні підходи посядуть гідне місце в загальному переліку технологій, які використовують у кріобіології і кріомедицині з метою успішного вирішення поставлених часом завдань.

Література

1. Гольцев АН, Бабенко НН, Гаевская ЮА, и др. Способность НЧ на основе ортованадатов к идентификации *in vitro* и инактивации *in vivo* стволовых раковых клеток. Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. 2013; 11(4): 729–39.
2. Гречишников МП, Голояд МА, Липина ОВ, и др. Применение растворов наноразмерных частиц диоксида церия и ортованадата гадолия для гипотермического хранения культуры клеток *Spirulina platensis*. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(2): 173.
3. Гунько ВМ, Зарко ВИ, Гончарук ЕВ, и др. Процессы низкотемпературной дипольной релаксации в системах бычий сывороточный альбумин-нанооксид-вода. Поверхность. 2009; 16 (1): 14–25.
4. Гунько ВМ, Туров ВВ, Горбик ПП. Вода на межфазной границе. Киев: Наукова думка; 2009. 694 с.
5. Щербак АБ, Жолобак НМ, Иванов ВК, и др. Наноматериалы на основе диоксида церия: свойства и перспективы использования в биологии и медицине. Биотехнология. 2011; 4 (1): 9–28.
6. Basu S, Binder RJ, Suto R, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *Int Immunol*. 2000; 12(11): 1539–46.
7. Bischof J. Nanowarming: A new concept in tissue and organ preservation. *Cryobiology* [Internet]. 2015 July 14 [cited 8.01.2020]; 71(1): 176. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224015001236>
8. Blanc G. Sur les nanotechnologies. *Futuribles*. 2004; 293: 57–62.
9. Brockbank KGM, Chen Z, Greene ED, Campbell LH. Vitrification of heart valve tissues. In: Wolkers FW, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. New York: Springer; 2015. p. 399–421.
10. Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, et al. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat Nanotechnol*. 2012; 7(6): 383–8.
11. Choi SUS, Eastman JA. Enhancing thermal conductivity of fluids with nanoparticles, developments and application of non-newtonian flows. In: Siginer DA, Wang HP, editors. *Developments and applications of non-newtonian flows*. New York: ASME; 1995. p. 99–105.
12. Cooper IS, Lee AS. Cryostatic congelation: a system for producing a limited, controlled region of cooling or freezing of biologic tissues. *J Nerv Ment Dis*. 1961; 133: 259–63.
13. Di DR, He ZZ, Sun ZQ, Liu J. A new nano-cryosurgical modality for tumor treatment using biodegradable MgO nanoparticles. *Nanomedicine*. 2012; 8(8): 1233–41.
14. Eroglu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*. 2003; 46(2): 121–34.
15. Etheridge ML, Xu Y, Rott L, et al. RF heating of magnetic nanoparticles improves the thawing of cryopreserved biomaterials. *Technology*. 2014; (2): 229–42.
16. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 16–20.
17. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*. 2004; 25(6): 375–88.
18. Gage AA, Baust JG. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*. 1998; 37(3): 171–86.
19. Goltsev AM, Bondarovich MO, Babenko NM, et al. Freezing levels determine successful cryoablation of Ehrlich carcinoma cells. In: Risco R, Corral A. editors. *Society for Low Temperature Biology. Proceedings of the 55th SLTB Scientific Conference; october 3–4, 2019, Seville, Spain*. Seville; 2019. p 54.
20. Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YuA, et al. Nanotechniques inactivate cancer stem cells. *Nanoscale Res Lett*. [Internet]. 2017 June 15 [cited 05.11.2018]; 12(1): 415. Available from: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-017-2175-9>
21. Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YuA, et al. [Capability of orthovanadate-based nanoparticles to *in vitro* identification and *in vivo* inhibition of cancer stem cells.] *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies*; 2013; 11 (4): 729–39. Russian.
22. Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YuA, et al. Application of nanoparticles based on rare earth orthovanadates to inactivate Ehrlich carcinoma growth. *Biotechnol Acta*. 2015; 8(4): 113–21.
23. Guha A, Devireddy RV. Effect of palmitoyl nanogold particles on the subzero thermal properties of phosphate buffered saline solutions. *J Nanotechnol Eng Med*. [Internet]. 2010 May 5 [cited 04.09.2019]; 1(2): 021004. Available from: <https://asmedigitalcollection.asme.org/nanoengineeringmedical/article-abstract/1/2/021004/418110/Effect-of-Palmitoyl-Nanogold-Particles-on-the?redirectedFrom=fulltext>
24. Gun'ko VM, Turov VV, Bogatyrev VM, et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces. *Adv Colloid Interface Sci*. 2005; 118(1–3): 125–72.
25. Gun'ko VM, Turov VV, Gorbic PP. [Water at the interface boundaries]. Kyiv: Naukova Dumka; 2009. 694 p. Russian
26. Gun'ko VM, Zarko VI, Goncharuk EV, et al. [Low-temperature dipolar relaxation in bovine serum albumin-nano-oxide-water systems]. *Surface*. 2009; 16 (1): 14–25. Russian
27. Han B, Iftekhar A, Bischof JC. Improved cryosurgery by use of the thermophysical and inflammatory adjuvants. *Technol Cancer Res Treat*. 2004; 3(2):103–11.
28. Han X, Ma HB, Wilson C, Crister JK. Effects of nanoparticles on the nucleation and devitrification temperatures of polyol cryoprotectant solutions. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2008; 4(4): 357–61.



19. Goel R, Anderson K, Slaton J, et al. Adjuvant approaches to enhance cryosurgery. *J Biomech Eng.* [Internet]. 2009 July 28 [cited 22.10.2019]; 131(7): 074003. Available from: <https://asmedigitalcollection.asme.org/biomechanical/article-abstract/131/7/074003/400489/Adjuvant-Approaches-to-Enhance-Cryosurgery?redirectedFrom=fulltext>
20. Goltsev AM, Bondarovich MO, Babenko NM, et al. Freezing levels determine successful cryoablation of Ehrlich carcinoma cells. In: Risco R, Corral A. editors. *Society for Low Temperature Biology. Proceedings of the 55th SLTB Scientific Conference*; october 3–4, 2019, Seville, Spain. Seville; 2019. p 54.
21. Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YuA, et al. Nanotechniques inactivate cancer stem cells. *Nanoscale Res Lett.* [Internet]. 2017 June 15 [cited 05.11.2018]; 12(1):415. Available from: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-017-2175-9>
22. Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YuA, et al. Application of nanoparticles based on rare earth orthovanadates to inactivate Ehrlich carcinoma growth. *Biotechnol Acta.* 2015; 8(4): 113–21.
23. Guha A, Devireddy RV. Effect of palmitoyl nanogold particles on the subzero thermal properties of phosphate buffered saline solutions. *J Nanotechnol Eng Med.* [Internet]. 2010 May 5 [cited 04.09.2019]; 1(2): 021004. Available from: <https://asmedigitalcollection.asme.org/nanoengineeringmedical/article-abstract/1/2/021004/418110/Effect-of-Palmitoyl-Nanogold-Particles-on-the?redirectedFrom=fulltext>
24. Gun'ko VM, Turov VV, Bogatyrev VM, et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* 2005; 118(1–3): 125–72.
25. Han B, Iftekhhar A, Bischof JC. Improved cryosurgery by use of thermophysical and inflammatory adjuvants. *Technol Cancer Res Treat.* 2004; 3(2):103–11.
26. Han X, Ma HB, Wilson C, Crister JK. Effects of nanoparticles on the nucleation and devitrification temperatures of polyol cryoprotectant solutions. *Microfluidics and Nanofluidics.* 2008; 4(4): 357–61.
27. Hao B, Liu B. Thermal properties of PVP cryoprotectants with nanoparticles. *J Nanotechnol Eng Med.* [Internet]. 2011 May 19 [cited 15.10.2019]; 2(2): 021015. Available from: <https://asmedigitalcollection.asme.org/nanoengineeringmedical/article-abstract/2/2/021015/467070/Thermal-Properties-of-PVP-Cryoprotectants-With?redirectedFrom=fulltext>
28. He X, Bischof JC. Multiscale technologies for cryomedicine: implementation from nano to macroscale. Singapore: World Scientific; 2016. 374 p.
29. Isaac AV, Kumari S, Nair R, et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 494(3–4): 656–62.
30. Jana S, Salehi-Khojin A, Zhong WH. Enhancement of fluid thermal conductivity by the addition of single and hybrid nano-additives. *Thermochim Acta.* 2007; 462 (1–2): 45–55.
31. Jansen MC, van Hillegersberg R, Schoots IG, et al. Cryoablation induces greater inflammatory and coagulative responses than radiofrequency ablation or laser induced thermotherapy in a rat liver model. *Surgery.* 2010; 147(5): 686–95.
32. Jiang J, Goel R, Schmechel S, et al. Pre-conditioning cryosurgery: cellular and molecular mechanisms and dynamics of TNF- α enhanced cryotherapy in an *in vivo* prostate cancer model system. *Cryobiology.* 2010; 61(3): 280–8.
33. Kang HU, Kim SH, Oh JM. Estimation of thermal conductivity of nanofluid using experimental effective particle volume. *Experimental Heat Transfer.* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 10.10.2019] 19 (3): 181–91. Available from: <https://koreauniv.pure.elsevier.com/en/publications/estimation-of-thermal-conductivity-of-nanofluid-using-experimenta>
34. Keblinski P, Phillpot SR, Choi SUS, Eastman JA. Mechanism of heat flow in suspensions of nano-sized particles (nanofluids). *Int J Heat Mass Transfer.* 2002; 45 (4): 855–63.
35. Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology.* 2019; 126: 121–7.
36. Khosla K, Wang Y, Hagedorn M, et al. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. *ACS Nano.* 2017; 11(8): 7869–78.
37. Kirdaite G, Leonaviciene L, Bradunaite R, et al. Antioxidant effects of gold nanoparticles on early stage of collagen-induced arthritis in rats. *Res Vet Sci.* 2019; 124: 32–7.
38. Kobayashi A, Golash HN, Kirschvink JL. A first test of the hypothesis of biogenic magnetite-based heterogeneous ice-crystal nucleation in cryopreservation. *Cryobiology.* 2016; 72(3): 216–24.
39. Li WJ, Zhou XL, Liu BL, et al. Effect of nanoparticles on the survival and development of vitrified porcine GV oocytes. *CryoLetters.* 2016; 37(6): 401–5.
40. Liu J, Deng Z-S. Nano-cryosurgery: advances and challenges. *J Nanosci Nanotechnol.* 2009; 9(8): 4521–42.
41. Liu MS, Lin MC, Tsai CY, Wang CC. Enhancement of thermal conductivity with Cu for nanofluids using chemical reduction method. *Int J Heat Mass Transfer.* 2006; 49 (17–18): 3028–33.
42. Lv F, Liu B, Li W, Jaganathan GK. Devitrification and recrystallization of nanoparticle-containing glycerol and PEG-600 solutions. *Cryobiology.* 2014; 68(1): 84–90.
43. Manuchehrabadi N, Gao Z, Zhang J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nano-



35. Khalil WA, El-Hairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*. 2019; 126: 121–7.
36. Khosla K, Wang Y, Hagedorn M, et al. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. *ACS Nano*. 2017; 11(8): 7869–78.
37. Kirdaite G, Leonaviciene L, Bradunaite R, et al. Antioxidant effects of gold nanoparticles on early stage of collagen-induced arthritis in rats. *Res Vet Sci*. 2019; 124: 32–7.
38. Kobayashi A, Golash HN, Kirschvink JL. A first test of the hypothesis of biogenic magnetite-based heterogeneous ice-crystal nucleation in cryopreservation. *Cryobiology*. 2016; 72(3): 216–24.
39. Li WJ, Zhou XL, Liu BL, et al. Effect of nanoparticles on the survival and development of vitrified porcine GV oocytes. *CryoLetters*. 2016; 37(6): 401–5.
40. Liu J, Deng Z-S. Nano-cryosurgery: advances and challenges. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009; 9(8): 4521–42.
41. Liu MS, Lin MC, Tsai CY, Wang CC. Enhancement of thermal conductivity with Cu for nanofluids using chemical reduction method. *Int J Heat Mass Transfer*. 2006; 49 (17–18): 3028–33.
42. Lv F, Liu B, Li W, Jaganathan GK. Devitrification and recrystallization of nanoparticle-containing glycerol and PEG-600 solutions. *Cryobiology*. 2014; 68(1): 84–90.
43. Manuchehrabadi N, Gao Z, Zhang J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticle. *Sci Transl Med*. [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 15.10.2019]; 9 (379): eaah4586. Available from: <https://stm.sciencemag.org/content/9/379/eaah4586.short>
44. Marin-Guzman J, Mahan D, Whitmoyer R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J Anim Sci*. 2000; 78(6): 1544–50.
45. Maxwell JC. A treatise on electricity and magnetism. Oxford: Clarendon Press; 1881. 435 p.
46. Montiel Schneider MG, Martin MJ, Coral DF, et al. Selective contrast agents with potential to the earlier detection of tumors: Insights on synthetic pathways, physicochemical properties and performance in MRI assays. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018; 170: 470–8.
47. Oliver AE, Jamil K, Crowe JH, Tablin F. Loading human mesenchymal stem cells with trehalose by fluid-phase endocytosis. *Cell Preserv Technol*. 2004; 2(1): 35–49.
48. Patel HE, Das SK, Sundararajan T, et al. Thermal conductivities of naked and monolayer protected metal nanoparticle based nanofluids: manifestation of anomalous enhancement and chemical effects. *Appl Phys Lett*. [Internet]. 2003 September 30 [cited 10.10.2019]; 83:2931. Available from: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1602578>.
49. Pavlovich EV, Volkova NA. Influence of gold nanoparticles on human fibroblast before and after cryopreservation. In: Fesenko O, Yatsenko L, editors. *Nanoplasmonics, nano-optics, nanocomposites, and surface studies*. Switzerland, Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 413–20.
50. Rao W, Huang H, Wang H, et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7(8): 5017–28.
51. Robilotto AT, Baust JM, Van Buskirk RG, et al. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013; 16(1): 41–9.
52. Safa S, Moghaddam G, Jozani RJ, et al. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Anim Reprod Sci*. 2016; 174: 100–6.
53. Sanjay SS, Pandey AC, Kumar S, Pandey AK. Cell membrane protective efficacy of ZnO nanoparticles. *SOP Trans Nano-tech*. 2014; 1(1): 21–9.
54. Stefanic M, Ward K, Tawfik H, et al. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating
- particle. *Sci Transl Med*. [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 15.10.2019]; 9 (379): eaah4586. Available from: <https://stm.sciencemag.org/content/9/379/eaah4586.short>
43. Marin-Guzman J, Mahan D, Whitmoyer R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J Anim Sci*. 2000; 78(6): 1544–50.
44. Maxwell JC. A treatise on electricity and magnetism. Oxford: Clarendon Press; 1881. 435 p.
45. Montiel Schneider MG, Martin MJ, Coral DF, et al. Selective contrast agents with potential to the earlier detection of tumors: Insights on synthetic pathways, physicochemical properties and performance in MRI assays. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018; 170: 470–8.
46. Oliver AE, Jamil K, Crowe JH, Tablin F. Loading human mesenchymal stem cells with trehalose by fluid-phase endocytosis. *Cell Preserv Technol*. 2004; 2(1): 35–49.
47. Patel HE, Das SK, Sundararajan T, et al. Thermal conductivities of naked and monolayer protected metal nanoparticle based nanofluids: manifestation of anomalous enhancement and chemical effects. *Appl Phys Lett*. [Internet]. 2003 September 30 [cited 10.10.2019]; 83:2931. Available from: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1602578>.
48. Pavlovich EV, Volkova NA. Influence of gold nanoparticles on human fibroblast before and after cryopreservation. In: Fesenko O, Yatsenko L, editors. *Nanoplasmonics, nano-optics, nanocomposites, and surface studies*. Switzerland, Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 413–20.
49. Rao W, Huang H, Wang H, et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7(8): 5017–28.
50. Robilotto AT, Baust JM, Van Buskirk RG, et al. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013; 16(1): 41–9.
51. Safa S, Moghaddam G, Jozani RJ, et al. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Anim Reprod Sci*. 2016; 174: 100–6.
52. Sanjay SS, Pandey AC, Kumar S, Pandey AK. Cell membrane protective efficacy of ZnO nanoparticles. *SOP Trans Nano-tech*. 2014; 1(1): 21–9.
53. Stefanic M, Ward K, Tawfik H, et al. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating



- trehalose delivery via enhanced membrane permeation. *Biomaterials*. 2017; 140: 138–49.
55. Thomé S, Craze J, Mitchell C. Dimethylsulfoxide-induced serum hyperosmolality after cryopreserved stem-cell graft. *Lancet*. 1994; 344(8934): 1431–2.
 56. Wang B, Liu G, Balamurugan V, et al. Apatite nanoparticles mediate intracellular delivery of trehalose and increase survival of cryopreserved cells. *Cryobiology*. 2019; 86: 103–10.
 57. Wang J, Zhao G, Zhang Z, et al. Magnetic induction heating of superparamagnetic nanoparticles during rewarming augments the recovery of hUCM-MSCs cryopreserved by vitrification. *Acta Biomater*. 2016; 33: 264–74.
 58. Wang L, Fan J. Toward nanofluids of ultra-high thermal conductivity. *Nanoscale Res Lett*. 2011; 6(1): 153.
 59. Wang T, Zhao G, Liang XM, Xu YP. Numerical simulation of the effect of superparamagnetic nanoparticles on microwave rewarming of cryopreserved tissues. *Cryobiology*. 2014; 68(2): 234–43.
 60. Warriar P, Teja A. Effect of particle size on the thermal conductivity of nanofluids containing metallic nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. [Internet]. 2011 Mar 22 [cited 09.09.2019]; 6(1): 247. Available from: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-6-247>.
 61. Wu Z, Chen J, Sun Y, et al. Tumor microenvironment-response calcium phosphate hybrid nanoparticles enhanced siRNAs targeting tumors *in vivo*. *J Biomed Nanotechnol*. 2018; 14(10): 1816–25.
 62. Xie H, Fujii M, Zhang X. Effect of interfacial nanolayer on the effective thermal conductivity of nanoparticle-fluid mixture. *Int J Heat Mass Transfer*. 2005; 48(14): 2926–32.
 63. Xu Y, Yu HM, Niu YQ, et al. Effects of superparamagnetic nanoparticles on nucleation and crystal growth in the vitrified VS55 during warming. *CryoLetters*. 2016; 37(6): 448–54.
 64. Yan J-F, Liu J. Nanocryosurgery and its mechanisms for enhancing freezing efficiency of tumor tissues. *Nanomedicine*. 2008; 4(1): 79–87.
 65. Ye P, Kong Y, Chen Xi, Li W, et al. Fe₃O₄ nanoparticles and cryoablation enhance ice crystal formation to improve the efficiency of killing breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017; 8(7): 11389–99.
 66. Yi J, Tang H, Zhao G. Influence of hydroxyapatite nanoparticles on the viscosity of dimethyl sulfoxide-H₂O-NaCl and glycerol-H₂O-NaCl ternary systems at subzero temperatures. *Cryobiology*. 2014; 69(2): 291–8.
 67. Yi J, Zhao G. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on biotransport phenomena in freezing HeLa cells. *J Nanotechnol Eng Med*. [Internet]. 2014 November 1 [cited 15.10.2019]; 5(4): 040904. Available from: <https://asmedigitalcollection.asme.org/nanoengineeringmedical/article-abstract/5/4/040904/374691/Effect-of-Hydroxyapatite-Nanoparticles-on?redirectedFrom=fulltext>
 68. Yu TH, Liu J, Zhou YX. Selective freezing of target biological tissues after injection of solutions with specific thermal properties. *Cryobiology*. 2005; 50(2): 174–82.
 69. Zhang W, Gilstrap K, Wu L, et al. Synthesis and characterization of thermally responsive pluronic F127-chitosan nanocapsules for controlled release and intracellular delivery of small molecules. *ACS Nano*. 2010; 4(11): 6747–59.
 70. Zhang W, Rong J, Wang Q, He X. The encapsulation and intracellular delivery of trehalose using a thermally responsive nanocapsule. *Nanotechnology* [Internet]. 2009 Jun 16 [cited 14.11.2019]; 20(27): 275101. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/20/27/275101>
 71. Zhou X, Li W, Zhang D, Dai J. Hydroxyapatite nanoparticles improved survival rate of vitrified porcine oocytes and its mechanism. *CryoLetters*. 2015; 36(1): 45–50.
 72. Zhou XL, Yuan J, Liu JF, Liu BL. Loading trehalose into red blood cells by electroporation and its application in freeze-drying. *CryoLetters*. 2010; 31(2): 147–56.
 59. Wang T, Zhao G, Liang XM, Xu YP. Numerical simulation of the effect of superparamagnetic nanoparticles on microwave rewarming of cryopreserved tissues. *Cryobiology*. 2014; 68(2): 234–43.
 60. Warriar P, Teja A. Effect of particle size on the thermal conductivity of nanofluids containing metallic nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. [Internet]. 2011 Mar 22; [cited 09.09.2019]; 6(1): 247. Available from: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-6-247>.
 61. Wu Z, Chen J, Sun Y, et al. Tumor microenvironment-response calcium phosphate hybrid nanoparticles enhanced siRNAs targeting tumors *in vivo*. *J Biomed Nanotechnol*. 2018; 14(10): 1816–25.
 62. Xie H, Fujii M, Zhang X. Effect of interfacial nanolayer on the effective thermal conductivity of nanoparticle-fluid mixture. *Int J Heat Mass Transfer*. 2005; 48(14): 2926–32.
 63. Xu Y, Yu HM, Niu YQ, et al. Effects of superparamagnetic nanoparticles on nucleation and crystal growth in the vitrified VS55 during warming. *CryoLetters*. 2016; 37(6): 448–54.
 64. Yan J-F, Liu J. Nanocryosurgery and its mechanisms for enhancing freezing efficiency of tumor tissues. *Nanomedicine*. 2008; 4(1): 79–87.
 65. Ye P, Kong Y, Chen Xi, Li W, et al. Fe₃O₄ nanoparticles and cryoablation enhance ice crystal formation to improve the efficiency of killing breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017; 8(7): 11389–99.
 66. Yi J, Tang H, Zhao G. Influence of hydroxyapatite nanoparticles on the viscosity of dimethyl sulfoxide-H₂O-NaCl and glycerol-H₂O-NaCl ternary systems at subzero temperatures. *Cryobiology*. 2014; 69(2): 291–8.
 67. Yi J, Zhao G. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on biotransport phenomena in freezing HeLa cells. *J Nanotechnol Eng Med*. [Internet]. 2014 November 1 [cited 15.10.2019]; 5(4): 040904. Available from: <https://asmedigitalcollection.asme.org/nanoengineeringmedical/article-abstract/5/4/040904/374691/Effect-of-Hydroxyapatite-Nanoparticles-on?redirectedFrom=fulltext>
 68. Yu TH, Liu J, Zhou YX. Selective freezing of target biological tissues after injection of solutions with specific thermal properties. *Cryobiology*. 2005; 50(2): 174–82.
 69. Zhang W, Gilstrap K, Wu L, et al. Synthesis and characterization of thermally responsive pluronic F127-chitosan nanocapsules for controlled release and intracellular delivery of small molecules. *ACS Nano*. 2010; 4(11): 6747–59.
 70. Zhang W, Rong J, Wang Q, He X. The encapsulation and intracellular delivery of trehalose using a thermally responsive nanocapsule. *Nanotechnology* [Internet]. 2009 Jun 16 [cited 14.11.2019]; 20(27): 275101. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/20/27/275101>
 71. Zhou X, Li W, Zhang D, Dai J. Hydroxyapatite nanoparticles improved survival rate of vitrified porcine oocytes and its mechanism. *CryoLetters*. 2015; 36(1): 45–50.
 72. Zhou XL, Yuan J, Liu JF, Liu BL. Loading trehalose into red blood cells by electroporation and its application in freeze-drying. *CryoLetters*. 2010; 31(2): 147–56.

