

低温保护剂导入组织器官过程研究进展

冯海靠, 胥义*

(上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海, 200093)

(Email: xuyi@usst.edu.cn)

摘要: 对组织器官来讲, 玻璃化仍然是最好的低温保存方式。然而, 实现玻璃化所需要的高浓度的低温保护剂会对细胞造成伤害, 因此设计合理的加载方式至关重要。本文先后从细胞及组织器官层面回顾了 CPA 加载及去除过程中的传质模型, 分析了 CPA 加载过程中细胞血管体积随渗透压变化的规律, 为 CPA 加载过程优化提供了理论依据。同时还介绍了 CT、FTIR 等先进的检测方法, 可用于 CPA 在组织器官内分布情况的无损检测。最后回顾了通过灌注法加载 CPA 低温保存兔肾的发展历史及现状, 列举了成功实现玻璃化保存的灌注流程。基于上述研究, 通过对 CPA 加载及去除过程进行合理设计及优化, 有望在不久的将来成功实现组织器官的低温保存。

关键词: 低温保存 低温保护剂 传质 渗透压 灌注

A review of research progress of CPA loading into tissues and organs

Feng Haikao, Xu Yi

(Institute of Bio-thermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093)

Abstract The vitrification is still the best way to cryopreserve the tissues and organs, however, the high concentration of cryoprotective agents (CPAs) to achieve vitrification may cause damage to cells, so it is very important to design the reasonable way to loading (unloading) the CPA into (out) tissues and organs. In this review, we reviewed the CPA/water transfer model both from the cell and tissue level, analyzed the variation of the cellular/capillary volume during the loading (unloading) process. This can help optimize the perfuse protocols in application. Then we introduced the CT、FTIR detection method, which can detect the distribution of the CPA in tissues or organs nondestructively. Finally we reviewed the development of perfusion method to introduce CPA into rabbit kidney and listed the typical perfusion protocol which achieve vitrification successfully. Based on these studies, we may achieve the successful vitrification of tissues and organs by designing perfusion protocols that avoid the CPA damage.

Keywords Cryopreservation Cryoprotective agents(CPA) Mass transfer Osmotic pressure Perfusion

0. 前言

目前全球范围内约有 120 万人因为患有终末期器官衰竭疾病而需要进行器官移植, 然而由于供体器官来源短缺, 实际移植人数只有不到 10%^[1]。即便如此, 受限于保存工艺, 仍然有

基金项目: 国家自然科学基金 (51576132)

作者简介: 冯海靠, (1994-), 男, 硕士研究生, 从事低温生物医学工程方面的研究。

大量原本可供移植的潜在供体器官被废弃。按照目前广泛采用的低体温保存法（4-10℃），心和肺一般可最长保存约4h，肝脏、胰腺8-12h，肾脏36h^[2]，这显然不能满足实际的使用需求。而如果能将器官保存在-80℃甚至-196℃（液氮温度）环境下，则理论上可保存数月甚至数个世纪之久^[3]。

1949年，英国生物学家 C. Polge 和 A.U. Smith 偶然发现了甘油对精子有低温保护作用^[4]，这也是使用最早的低温保护剂（CPA），此后一大批科学家相继投入到“低温保存”的领域中，并成功实现了精子、卵母细胞及胚胎等小尺寸简单生物样本的低温保存。然而根据 P. Mazur 提出的“两因素假说”，细胞在低温保存过程中，过慢的冷却速率会导致“溶液损伤”；而过快的冷却速率会引发“胞内冰损伤”，因此不同类型的细胞存在不同的最佳冷却速率^[5]。对含有多种细胞结构功能复杂的组织器官而言，传统慢速降温往往会有冰晶的形成和生长，很难完整保存生物样本原本的生理功能。1984年，Fahy 等人提出了采用高浓度低温保护剂在深低温环境下没有或含有极少量冰晶的玻璃化保存方法，并成功实现了鼠胚胎在-196℃的低温保存^[6,7]。2000年，Song 等人用浓度为 8.4M 的 VS55 溶液玻璃化保存了兔静脉血管，复温后血管最大收缩能力达到未处理对照组的 80%并且移植成功，这标志着多细胞组织的首次成功玻璃化保存^[8]。2002年，Fahy 在 8.4M VS55（VS41A）溶液基础上通过进一步添加 PVP、PVA 等冰晶成核抑制剂等配置成浓度为 9.3M 的 M22 溶液，成功将一个兔肾玻璃化保存在-130℃，并且复温后移植受体存活^[9]。玻璃化保存虽然可以避免降温过程中冰晶的生成，但是实现玻璃化所需要的高浓度的低温保护剂却可能对细胞和组织造成伤害：细胞体积的过度变化（渗透压损伤）及长时间在较高温度下（0℃以上）暴露于低温保护剂溶液中造成的毒性损伤（CPA 毒性损伤）^[10]。因此在确保低温保护剂完全均匀分布于生物样本的前提下，如何科学合理的设置加载步骤，是低温保存能否成功的关键。

1. 模型

1.1. CPA 在细胞中的扩散过程

低温保护剂根据分子量的大小能否通过细胞膜分为两类：渗透性低温保护剂及非渗透性低温保护剂。渗透性低温保护剂主要包括甘油、乙二醇、二甲基亚砷等多元醇及甲酰胺、乙酰胺等分子量小于 100 的试剂；非渗透性低温保护剂则包括果糖、葡萄糖等单糖及二糖、多糖等糖类，以及 PVP、PEG、羟乙基淀粉等高分子聚合物。当向细胞加载渗透性低温保护剂时，由于细胞膜对水的渗透性要远远大于对 CPA 的渗透性，细胞刚开始会迅速脱水，之后随着 CPA 和水逐渐回到细胞，细胞会经历一个渐进的重新平衡的过程（如图 1）。这便是加载渗透性低温保护剂时细胞典型的“皱缩-肿胀”效应。而加载非渗透性低温保护剂时，细胞在刚开始

始脱水皱缩后则不会再有随后的膨胀出现。Kedem 和 katchalsky 根据线性不可逆热力学理论提出了经典的耦合被动膜运输方程（即 K-K 方程），能够定量描述细胞在保护剂加载或洗脱过程中的体积变化^[11,12]：

$$J_V = \frac{1}{A_C} \frac{dV(t)}{dt} = -L_P \left[(C_{salt}^e - C_{salt}^i) + \sigma (C_{CPA}^e - C_{CPA}^i) \right] RT$$

(1)

基金项目：国家自然科学基金（51576132）

作者简介：冯海靠，（1994-），男，硕士研究生，从事低温生物医学工程方面的研究。

$$J_{CPA} = \frac{1}{A_c} \frac{dN_{CPA}}{dt} = \bar{C}_{CPA} (1 - \sigma) J_V + P_{CPA} (C_{CPA}^e - C_{CPA}^i)$$

(2)

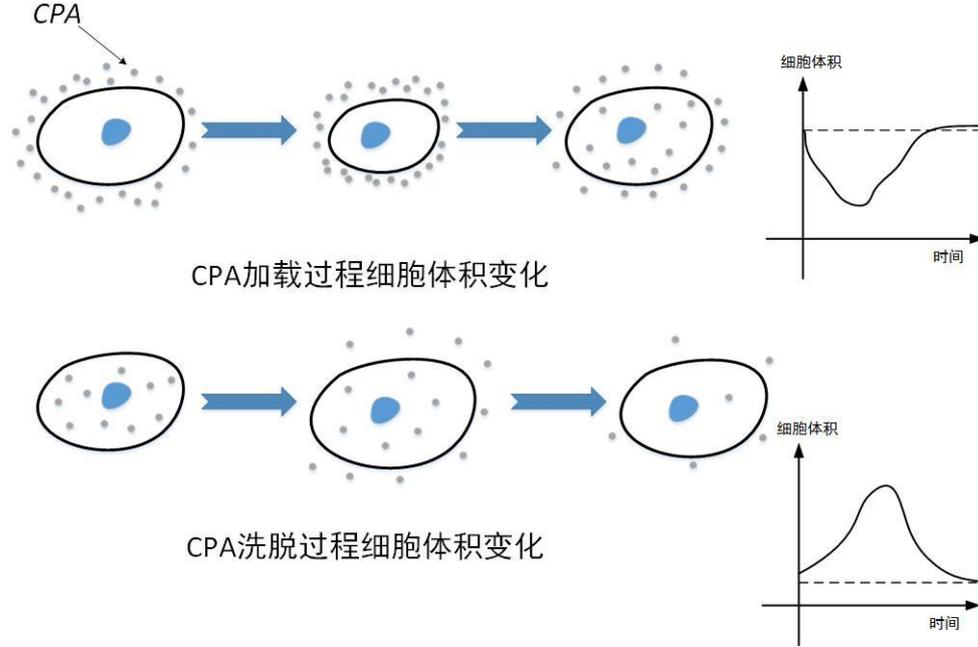


图 1：细胞加载洗脱渗透性 CPA 时的体积变化

其中 J_V 为总体积流量， V 为细胞体积， t 为时间， N 为溶质摩尔数， A_c 为细胞表面积， L_p

为水的渗透系数， C 为溶质的渗透压浓度， J_{CPA} 为低温保护剂通过细胞膜的流量，上标 e 表示细胞外，上标 i 表示细胞内， R 为通用气体常数， T 为绝对温度， σ 为细胞膜对低温保护剂的反射系数， P_{CPA} 为细胞膜对低温保护剂的渗透系数， \bar{C}_{CPA} 为胞外和胞内的平均渗透压浓度。

K-K 模型为最常用的描述跨膜运输过程的方程，根据 Kleinhans 等人的研究，通过取消反射系数 σ ，K-K 模型也可以转化为两参数模型^[13]。

如果这种因渗透压变化导致的细胞体积变化超过一定限度，就会引发渗透压休克从而伤害细胞。因此为了在 CPA 的加载和去除过程中减小渗透压造成的损伤，大多数情况下都会采用分步加载去除法。1995 年，Gao 等人系统研究了甘油加载去除过程中人精子渗透压损伤同体积变化间的关系，并基于此提出了能够预测最优加载去除方案的理论模型^[11]。2000 年，Song 等人用梯度加载去除 8.4M VS55 的方法成功实现了兔静脉血管的玻璃化保存^[8]，这表明对有多种细胞类型的复杂组织器官而言，同样可以通过分步加载的方法来避免或者减轻低温保护剂加载去除过程中的渗透压损伤。最近，Higgins 和 Benson 等人在上述模型的基础上，从数学上开发了一种能够评估 CPA 加载毒性的“代价函数”来优化 CPA 的平衡过程，已经成功应用于细胞的加载过程^[14]。他们正尝试通过建立更复杂的数学模型将这种方法扩展到三维的组织器官领域，有望在将来应用于组织器官 CPA 加载过程的优化^[15]。

基金项目：国家自然科学基金（51576132）

作者简介：冯海靠，（1994-），男，硕士研究生，从事低温生物医学工程方面的研究。

1.2. CPA 在组织器官中的导入过程

对于结构复杂的组织器官而言，CPA 的加载一般有两种方法：一种是通过组织本身含有的紧密的血管网进行灌注（如肾脏、肝脏等器官）；另一种则是通过外边界加载，这种方法适用于组织切片及大多数的工程化组织。由于灌注法在合适的温度压力下可以利用天然的血管网将溶质快速均匀分布，是人们低温保存组织器官加载 CPA 时的首选。有研究表明，将肾脏浸泡在甘油溶液中进行完全平衡可能需要几个月，而采用灌注法在几小时甚至几十分钟内便可完全平衡^[16]。Krogh 圆柱模型和网格热力学模型常被用来研究灌注过程中 CPA 和溶剂在组织器官中的传质过程。1982 年，Rubinsky 和 Cravalho 首次使用 Krogh 模型（如图 2），假定器

官是由一系列相同的 Krogh 圆柱组成，模拟了甘油和水在心脏血管内/管外细胞空间的对流扩散的传递过程^[17]，根据 K-K 模型：

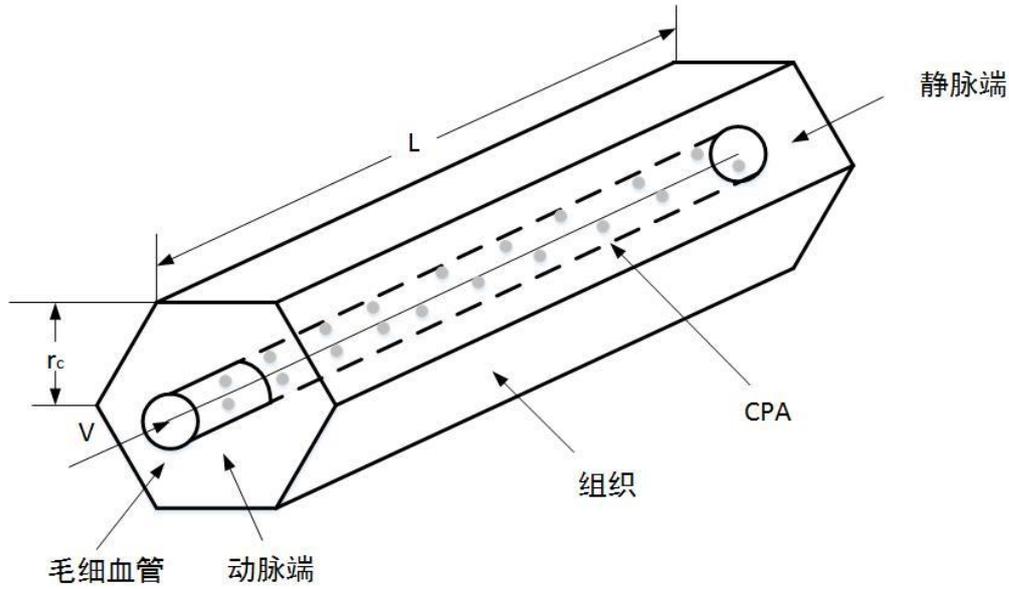


图 2: Krogh 圆柱模型的单元体示意图

$$\frac{dr_c(t)}{dt} = -L_p \left[(C_{salt}^f - C_{salt}^t) + \sigma (C_{CPA}^f - C_{CPA}^t) \right] RT \quad (3)$$

$$J_{CPA} = 2\pi r_c(t) \cdot L \cdot \left[\omega_s RT \Delta C_{CPA} - \frac{dr_c(t)}{dt} (1 - \sigma_{CPA}) C_{CPA}^m \right] \quad (4)$$

$$C_{CPA}^f = H \cdot t, 0 \leq t \leq t_0; C_{CPA}^f = C_{max}, t_0 \leq t \leq t_f. \quad (5)$$

其中 r_c 为血管半径， L 为血管长度， ω_s 为 CPA 的渗透率， H 为保护剂线性加载速率。通过模拟发现随着甘油的加载浓度逐渐增大，血管半径也会随之增大；而当甘油浓度恒定后，血管半径则会减小直到初始值。同时还发现血管半径变化速率、最大半径及组织内非渗透性物质浓度等可能会对器官造成损伤的参数均与甘油加载速率 H 直接相关。1986 年，Pegg 和

Rubinsky 等人通过实验测得甘油灌注兔肾过程中血管阻力变化^[18]，发现不同甘油加载速率下血管半径变化基本相同。他们将此归结为模型中反射系数 σ 对保护剂浓度的依赖性，通过

基金项目：国家自然科学基金（51576132）

作者简介：冯海靠，（1994-），男，硕士研究生，从事低温生物医学工程方面的研究。

拟合实验数据发现反射系数 σ 与甘油浓度成反比关系，并在此基础上重新模拟了不同加载过程中甘油在肾脏组织内的分布。此后，Bischof 等人也利用 Krogh 模型研究了加载 DMSO 的大鼠肝脏低温保存过程中血管/组织间的水分传递规律，发现降温速率越慢，血管半径越大，而血管外细胞体积越小^[19]。尽管 Krogh 模型相对简单，但仍然能够反应组织器官在 CPA 加载过程中管内/管外组织细胞间的体积变化，从而为减轻渗透压损伤和 CPA 毒性提供指导。Krogh 模型没有考虑血管和细胞间组织间隙的影响，实际上在组织间隙中由于浓度梯度仍然存在着溶质溶剂的运输扩散过程。基于此，Diller 等人提出了更真实复杂的网格热力学模型研究了兔肾灌注 CPA 过程中血管和细胞的体积变化^[20,21]。他们将肾脏看做是由重复的渗透压可变的血管、间质及细胞的隔间构成的，每一部分体积均由所含的水、CPA、胶体及其他溶质所决定。单个细胞通过半透的细胞膜与间质和环境隔开，同时假定间质中有独立平行的存储运输过程。整个系统可通过 Bond 图的形式展现出来，其中包括阻力元件（渗透率的倒数），容量元件（体积流入流出细胞或间质引起的容积变化）及由化学势变化所决定的源项。Diller 等人通过以上研究指出，在向肾脏中灌注加载 CPA 时，可以通过向灌注液中适当添加非渗透性溶质、减小灌注压力、限制清除过程中 CPA 变化速率等方法减轻灌注过程可能引发的渗透压损伤及机械损伤。

目前来看对低温保护剂导入组织器官传质过程研究的模型大多局限在单一组分溶质，虽然它们可以在一定程度上反映 CPA 加载去除过程中血管与组织细胞间的物质交换过程，但由于实际低温保存中为减轻 CPA 化学毒性多采用多种溶质构成的复合型 CPA 溶液，加之组织器官内毛细血管、细胞类型分布的不均匀性，因此更真实复杂接近实际的模型亟待建立。最近，Cui 等人通过将活组织简化为多孔介质模型，利用 Maxwell-Stefen 方程模拟了不同温度、不同组织、不同 CPA 及溶质间不同作用对 CPA 传质过程的影响，他们发现不同 CPA 分子间的相互作用会显著影响各自的传递过程^[22]。Elliott 等人则根据热力学平衡方程指出，如果在 CPA 的导入过程中组织器官内外存在压力差，那么最终的平衡浓度可能会低于加载浓度^[23]。

2. 应用

2.1. CPA 在组织器官中的检测

组织器官低温保存的效果取决于 CPA 能否快速均匀加载，因此准确获取 CPA 在组织器官中的分布情况至关重要，在此基础上可以计算得到 CPA 的扩散参数并评估优化加载方案。如下式所示：

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{eff} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (6)$$

其中 C 为 CPA 浓度， D_{eff} 为等效扩散系数。通过不同时刻测得的 CPA 的浓度值，可以利用

式(6)推得对应加载条件下 CPA 的等效扩散系数。传统的有创检测方法包括渗透压测定法^[24]，放射示踪法^[25]，DSC 检测法^[26]等，这些方法均需要破坏组织器官完整性并且所测结果是整个选定区域的平均值。近些年来，随着生物医学工程的快速发展，NMR 核磁共振，CT 扫描

基金项目：国家自然科学基金(51576132)

作者简介：冯海靠，(1994-)，男，硕士研究生，从事低温生物医学工程方面的研究。

无损检测技术也被广泛应用于 CPA 在组织器官中的分布评估。SA Isbell 等人用高场强 NMR 微成像技术研究了 DMSO 在大鼠肾脏、肝脏组织内的扩散过程，并计算得到了与文献值相近的渗透率与有效扩散系数^[27]。JC Bischof 利用 CT 扫描加载甘油的猪肝组织，通过将不同时刻得到的灰度值转化为 CPA 的浓度值，进而计算得到其扩散参数^[28]。Bischof 等人还利用 CT 检测法成功实现了猪动脉血管的玻璃化保存^[29]。最近，WF Wolkers 团队利用 ATR-FTIR 傅里叶变换红外光谱技术研究了 VS83 玻璃化溶液在脱细胞心脏瓣膜中的扩散过程^[30]，区别于以往的检测方法，他们测得了单独的 CPA 溶质在心脏瓣膜血管中对应的扩散系数，发现尽管 DMSO、PG、甲酰胺等溶质分子量相差不大，但是扩散系数却有显著差别。这对研究复合型 CPA 在组织器官中的扩散过程有重要的指导意义。

2.2. 兔肾灌注流程

从上世纪 60 年代起，低温生物学家们便致力于通过灌注法加载 CPA 来低温保存哺乳动物肾脏器官。上述的传质模型虽然可以从物理学角度减轻 CPA 灌注过程的损伤，但实际的操作流程应该同时从生理学及生物化学等多方面考虑。DE Pegg 和 GM Fahy 等人以兔肾为实验对象，围绕 CPA 种类、灌注液基质(CPA 溶剂)、灌注压力温度时间等做了大量实验。Pegg 等人经过数十年的研究指出^[31]，当采用不同的降温速率保存灌注较低浓度 CPA(如 2-4M 甘油)的兔肾时，组织中尤其是血管内仍然会产生大量冰晶从而使血管扭曲膨胀破裂，从而严重影响器官功能，因此现阶段深低温保存组织器官最好的方法仍然是无冰晶的玻璃化保存。Fahy 等人则通过不断尝试组合 CPA 配方(二甲基亚砷、甲酰胺、乙二醇)，添加 PVP、PVA 等高分子聚合物，调整灌注液成分等，先后配置出了 VS4，VS41A(VS55)，M22 等用于组织器官低温保存玻璃化溶液，并用 M22 灌注兔肾后成功实现了玻璃化保存^[9,32]。Fahy 的灌注流程如图 3 所示。刚开始 CPA 的浓度通过线性加载的方式逐渐增加至 5M，灌注压力保持在 40mmHg，

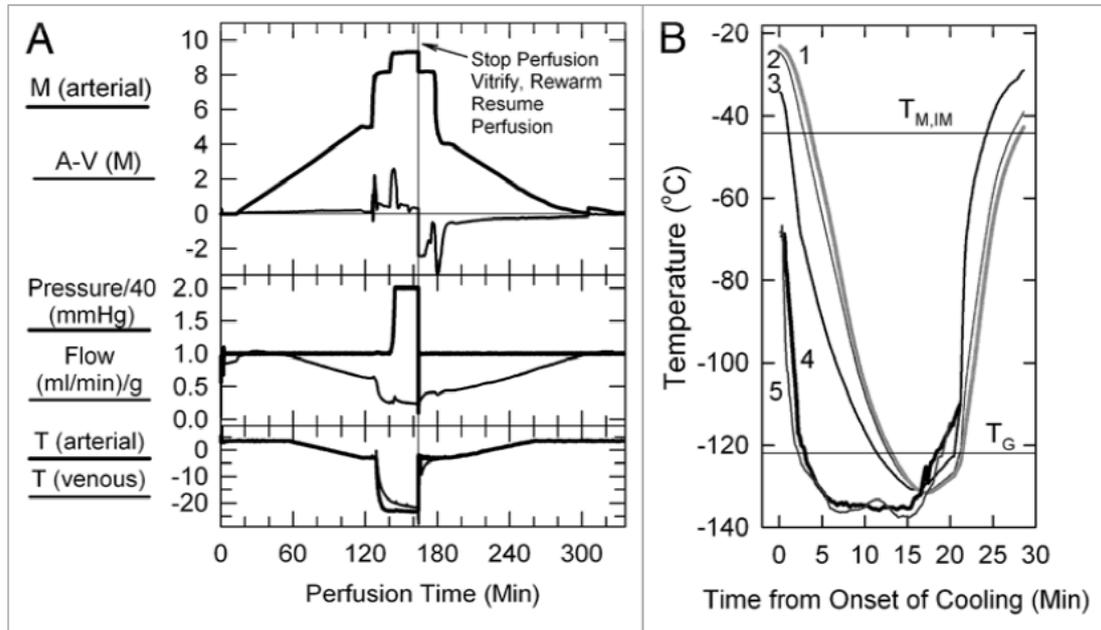


图 3: Fahy 等人成功实现兔肾玻璃化保存时的 CPA 灌注方案^[9]。A 图中分别为 CPA 浓度、灌注压力、流量、温度随时间变化; B 图为另外测得的肾脏不同区域在冷冻及复温过程中温度变化。

基金项目: 国家自然科学基金 (51576132)

作者简介: 冯海靠, (1994-), 男, 硕士研究生, 从事低温生物医学工程方面的研究。

灌注液温度则由 4°C 逐渐降至 -3°C; 随后将 CPA 浓度提升至 8.4M, 温度降至 -22°C; 最后灌注全浓度的 9.3M 的 M22 溶液, 同时将压力提升至 80mmHg。灌注完成后, 将兔肾降温至 -130°C 保存 8 分钟, 再按照图 3 所示流程洗脱后移植, 兔子成功存活。Fahy 等人通过将兔子处死后对肾脏检测并结合之前的 DSC 实验结果提出, 兔肾髓质区域由于 M22 未能完全渗透导致复温过程中出现反玻璃化生成冰晶引起组织损伤; 皮质区域虽然没有冰晶形成但是较快的升降温速率导致的热应力也会可能其组织结构造成损伤。因此 CPA 能否通过灌注快速均匀的扩散到组织中去是器官深低温保存能否成功的关键。如果组织器官内部 CPA 分布完全, 则在低温保存过程中则可以用相对较低的降温速率, 既不会有冰晶生成, 也不会有热应力损伤。尽管 M22 灌注后的兔子成功存活, 但其术后检测发现的较高浓度的血清肌酐值仍然说明了兔肾在灌注过程中受到了损伤。此后, Fahy 等人通过不断改进灌注液配方, 使用“flowlock”灌注方法等使肌酐值逐步下降^[33]。Fahy 等人将在此基础上进一步测试优化后的灌注流程在玻璃化保存及复温后移植的效果。Rabin 等人则根据 Fahy 使用 M22 灌注兔肾的实验结果, 采用有限元法模拟了人的肾脏在低温保存降温过程中的温度变化^[34]。模拟结果显示尽管人肾脏体积大约是兔肾的 21 倍, 但降温速率仍然高于所对应 M22 浓度的临界降温速率, 能够实现玻璃化。上述研究充分表明, 灌注法可以实现保护剂在组织器官内的充分扩散, 有望用于人体组织器官的低温保存; 但同时 CPA 灌注过程中的渗透压损伤、毒性损伤以及 CPA 灌注液成分对组织细胞生物化学特性的影响等均需要同时考虑以实现 CPA 的最优加载, 从而最大限度保持组织器官活性及功能。

3. 总结

低温保存可以抑制生物活性材料的生化反应, 从而实现组织器官的长期保存。现阶段要实现

组织器官的深低温保存必须要借助高浓度的 CPA 来实现玻璃化。CPA 加载过程中的渗透压损伤、毒性损伤会严重影响组织细胞活性, 因此能使 CPA 实现快速均匀分布的加载方案至关重要。本文先后从细胞及组织层面回顾了 CPA 加载及洗脱时的传质过程模型, 得到了体积随渗透压的变化规律, 为 CPA 加载去除过程的优化提供了理论依据。同时, CT、FTIR 等先进的检测手段也可以直接用于检测 CPA 加载过程中在组织器官内的扩散情况。在这些已有理论模型和先进检测技术的基础上, 结合低温生物学家数十年的实验探索, 通过对 CPA 的导入及去除流程进行合理的设计及优化, 有望在不久的将来成功实现组织器官的低温保存。

参考文献

1. Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT) World Health Organization Organ Donation and Transplantation Activities 2016. <http://www.transplant-observatory.org>.
 2. J. K. Lewis, J. C. Bischof, I. Braslavsky, K. G. Brockbank, G. M. Fahy, B. J. Fuller, Y. Rabin, A. Tocchio, E. J. Woods, B. G. Wowk, J. P. Acker, S. Giwa, The grand challenges of organ banking: Proceedings from the first global summit on complex tissue cryopreservation. *Cryobiology* 72, 169–182 (2016).
 3. 华泽钊, 生物材料的低温保存, *科学*, 1987,39 (1) :35-41.
 4. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.
-
- 基金项目: 国家自然科学基金 (51576132)
- 作者简介: 冯海靠, (1994-), 男, 硕士研究生, 从事低温生物医学工程方面的研究。
Nature 1949; 164:666.
5. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963;47:347–369.
 6. Fahy GM, MacFarlane, DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;21:407–426.
 7. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573 – 575.
 8. Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, Brockbank KG, Taylor MJ. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nature biotechnology*. 2000;18(3):296-299.
 9. Fahy GM, et al. Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis* 2009; 5:167–175.
 10. Han B, Bischof JC. Engineering challenges in tissue preservation. *Cell preservation technology*[J].2004, 2(2):91 - 112.
 11. Kedem, O. and Katchalsky, A. (1958) Thermodynamic analysis of the permeability of biological membrane to nonelectrolytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 229-246.
 12. Gao, D.Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L.E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., Crister E.S. and Crister J.K. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol, *Human Reproduction* 10, 1109-1122.
 13. Kleinhans FW. Membrane permeability modeling: Kedem-Katchalsky vs. a two-parameter formalism. *Cryobiology* 1998;37:271–289.
 14. AF Davidson, C Glasscock, DR Mcclanahan et al. Toxicity Minimized Cryoprotectant Addition and Removal Procedures for Adherent Endothelial Cells. *Plos One*, 2015 , 10 (11) :e0142828.
 15. R Warner, A Higgins. Extending Single Cell Cytotoxicity Minimization Strategies to 3D Tissues. *Cryobiology* 80 (2018) 187.

16. Pegg DE, Karow AM Jr, eds. *The Biophysics of Organ Cryopreservation*. New York: Plenum, 1987.
17. B Rubinsky, EG Cravalho. Transient mass transfer processes during the perfusion of a biological organ with a cryoprotective agent solution. *Cryobiology* 1982;19 (1): 70-82.
18. DE Pegg, B Rubinsky et al. Analysis of the introduction and removal of glycerol in rabbit kidneys using a Krogh cylinder model. *Cryobiology* 1986;23 (2): 150-160.
19. JC Bischof. Quantitative Measurement and Prediction of Biophysical Response During Freezing in Tissues. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2000. 02:257–88.
20. CA Lachenbruch, KR Diller. A network thermodynamic model of kidney perfusion with a cryoprotective agent. *Journal of Biomechanical Engineering* , 1999 , 121 (6) :574-83.
21. CA Lachenbruch, KR Diller, DE Pegg. Sensitivity of Kidney Perfusion Protocol Design to Physical and Physiological Parameters. *Ann N Y Acad Sci* , 2010 , 858 (1) :298-309.
22. X Xu, ZF Cui. Modeling of the Co - Transport of Cryoprotective Agents in a Porous Medium as a Model Tissue. *Biotechnology Progress*, 2003 , 19 (3) :972-981.
23. HY Elmoazzen, JA Elliott, LE McGann. Cryoprotectant equilibration in tissues. *Cryobiology* 2005;51 (1): 85-91.
24. Borel Rinkes IH, Toner M, Ezzell RM, et al. Effects of dimethyl sulfoxide on cultured rat hepatocytes in sandwich configuration. *Cryobiology* 1992;29:443–453.
25. Elford, B. C. Diffusion and distribution of dimethyl sulfoxide in the isolated guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.*
26. IB Jacobsen. Distribution and removal of glycerol by vascular albumin perfusion in rabbit kidneys. *Cryobiology* , 1978 , 15 (3) :302-311.
27. SA Isbell, CA Fyfe et al. Measurement of cryoprotective solvent penetration into intact organ tissues using high-field NMR microimaging. *Cryobiology*, 1997, 35 (2) :165-72.
28. JC Bischof et al. Use of X-ray tomography to map crystalline and amorphous phases in frozen biomaterials. *Annals of Biomedical Engineering*, 2007, 35 (2) :292-304.
29. N Manuchehrabadi, Z Gao, J Zhang et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles. *Science Translational Medicine*, 2017, 9 (379) :eaah4586.
30. A Vázquez-Rivera, KK Sommer, H Oldenhof et al. Simultaneous monitoring of different vitrification solution components permeating into tissues. *Analyst*, 2017, 143 (2).
31. DE Pegg. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*, 2010, 60 (3):36-44.
32. GM Fahy, B Wowk et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*, 2004, 46 (2):157-158.
33. GM Fahy. Elimination of most damage after perfusing rabbit kidneys with M22 solutions. *Cryobiology*, 2016 , 73 (3) :407-407.
34. L Ehrlich, GM Fahy, B Wowk et al. Thermal Analyses of a Human Kidney and a Rabbit Kidney During Cryopreservation by Vitrification. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2018 , 140 (1).