

抗衰老研究
11 卷, 11 月 2 日, 2008
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321197>
<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/rej.2008.0661>

人体冷冻实践的科学依据

本杰明 P. 贝斯特*

摘要

极低温度提供的条件可以保存组织长达上百年，可以冷冻包括人类心智在内的神经基础。通过一种叫玻璃化的过程，脑部组织可以不结冰就以超低温度冷冻起来。这一过程中大脑受到的损害，理论上说和在可预见的技术范围里可以实现抗衰老技术一样，是可以避免的。由于血液停止而对脑部造成的损伤，现在已知是由于一系列漫长复杂的的过程所产生的，这个过程完成的时间远超过一般的六分钟内的复苏技术。六分钟以后再灌入血液的损害主要集中在血管方面而不是大脑组织。神经细胞死亡需要好几个小时的时间。这一现象为法定死亡后的人类或者动物提供了冷冻并日后重新复苏的重生机会。在理想的情况下，医学上宣布死亡和开始冷冻程序之间的时间间隔可以缩短到一分钟之内，但是即使其间耽搁了很长时间也可以达到以后完全复活需要的条件。虽然冷冻技术可能有用的证据是间接性的，间接证据在许多科学领域也是至关重要的。如果衰老带来的复杂变化在未来某一天是可逆的，那么同样的因为停止血液流动而带来的复杂变化可能也是可逆的，这样可以通过超越现有医疗技术来达到挽救被需要治疗的生命。

*人体冷冻机构，克林顿镇，密歇根

人体冷冻概述

冷冻技术是在超低温度下保存人体和动物的实践，并寄希望于未来的科学技术可以把他们恢复到一个健康的生存条件并实现返老还童。目前人体冷冻技术只能应用于法律死亡后的冷冻个体上。

人体冷冻技术实践的科学依据来源于几个关键的概念：（1）低温可以降低新陈代谢。足够低的温度实际上可以阻止化学变化长达几个世纪。（2）玻璃化的混合物可以减少甚至完全阻止结冰的形成。（3）法律上的死亡并不代表“不可逆转的死亡”。死亡是一个过程，不是一个事件，而且这个过程花的时间远长于一般常识的认为。（4）低温保存和医学死亡带来的损伤在现今是无法逆转的，但是在未来理论上是可逆的。

必须在宣告法律的死亡后才能开始人体冷冻技术，因为冷冻还没有成为一个被批准和认证的医疗手段。在法律死亡以后，人体冷冻的团队会立即开始保存的程序。冷冻人体的程序是为了在心脏停止后，在冷冻到-120 度的过程中，最小化组织结构的改变来保护冷冻对象的组织。

在第一阶段，机械性地恢复冷冻对象的血液循环和呼吸，冷冻对象被药物保护并快速冷冻至0°C到10°C之间。冲洗掉冷冻对象的血液，而且将大量的体液置换成了一种冷冻保护剂的混合物，从而防止冰的形成。将冷冻对象置于低于-120°C的温度中冷冻保存。当未来医学具备能力的时候，冷冻对象将会被回温，冷冻保存液会被拿掉，组织得到修复，疾病得到治愈，冷冻对象从而得到新生（如果需要的话）。

冷却

食物的保鲜和冷冻技术是基于低温可以降低生化降解的速度这一原理上的。冷冻降低新陈代谢的速度（而且最终化学反应将完全停止），这是冷冻实践的核心。当宣布死亡以后冷冻对象被置于冰水的浴缸里。心肺辅助压缩、解压缩的机械活动也会加快冷却从流动的血液传递过来的热量。

对冷冻对象使用传导和流动结合的对流方式进行冷却。在对流方式中，一个实物（比如说冷冻对象）用快速循环的流体（液体或者气体）进行冷冻，这种流体可以将热度从冷冻对象的传导层带出。在把冷冻对象从人体体温（37°C）冷却到10°C的过程中，快速循环的冰水降温更有效，因为对流的效率比冰袋或者静止的水的效率高。

对流的公式应用的是牛顿冷却定律，定律中热量传导的速度等于 $hA(T_s - T_f)$ ， T_s 是初始温度（冷冻对象的头或者身体）， T_f 是最终温度（冷却媒介物的温度，比如冰水或者低温氮气）， A 是实物的表面积， h 是一个变量，这个变量取决于流体的运动速度和冷却媒介物的热传导性以及热容量。快速的流体运动速度和高的热传导性会增加 h 的值。牛顿冷却定律预示着冷却过程中，最开始的时候温度下降最快，因为 T_s 和 T_f 之间的差值最大。然后冷却的速度以指数下降。

温度的下降很大程度上可以延长从血液停止流动到发生不可逆转的损伤之间的时间。据报导很多人，特别是小孩，在经历了20分钟到一个小时甚至更长时间的心跳停止的体温过低的事故后幸存而且神经完全恢复，比如在冷水中溺水这种事故。冷却能极大的降低新陈代谢的速度。

当大脑的温度从37°C下降到31°C的时候，因为局部缺血造成沙鼠50%的神经损坏所需要的时间呈指数增长。在6只鼓膜温度10°C的低温实验狗中，90分钟的心跳停止过程中6只狗都没有出现神经损伤，7只狗中的2只在120分钟的实验中没有出现神经损坏⁴。人类曾在动脉大手术时被深度冷冻心跳超过一小时，而没有出现大量的神经损伤。在16°C到24°C之间⁵，当冷冻对象的脑电波完全停止时（脑电图双谱指数为零），回温后没有任何神经损伤，证实了动态的大脑活动可以停止又恢复而且还恢复了个人意识。

零下低温对避免局部缺血造成的损伤还能在北方树蛙（林蛙）的身上得到验证，北方树蛙可以在-3°C到-6°C半冷冻的状态下没有心跳的被保存数月，回温后完全复原⁶。1966年，日本的一个研究者将猫大脑内的血液替换成甘油从而减少冰的形成，冷冻至-20°C。在45天-20°C的而且没有血液循环的情况下，重新恢复猫的大脑显示出目测正常的EEG活动⁷。

化学反应（包括新陈代谢和局部缺血性损伤的过程）的速度（ k ），和温度（ T ）之间的关系可以用阿伦尼乌斯方程来描述⁸。

$$k = A \exp(-E_a/RT)$$

这里 **T** 的单位是开氏度, **E_a** 是活化能, **R** 是通用气体常数 (8.314 焦耳/摩尔开氏度), **A** 是频率因子 (分子碰撞的频率和碰撞时有利于反应的几率的关系)。对等式两边取自然对数后得到:

$$\ln k = (-E_a/RT) + \ln A$$

对于两个不同的温度 **T₁** 和 **T₂**, 所对应的也有不同的反应速度 **k₁** 和 **k₂**:

$$\ln k_1 = (-E_a/RT_1) + \ln A$$

$$\ln k_2 = (-E_a/RT_2) + \ln A$$

从 $\ln k_1$ 中减去 $\ln k_2$ 会得到一个四个变量的单一方程:

$$\ln k_1 - \ln k_2 = ((-E_a/RT_1) + \ln A) - ((-E_a/RT_2) + \ln A)$$

可以简化成:

$$\ln(k_1/k_2) = (E_a/R) * (1/T_2 - 1/T_1)$$

$$\text{或者 } k_1/k_2 = e^{(E_a/R) * (1/T_2 - 1/T_1)}$$

不同温度下酶的反应速度给出温度和新陈代谢关系的近似值。兔子肌肉中的乳酸脱氢酶—有着 13,100 卡路里/摩尔的活化能 (**E_a**) ⁹—可以作为一个代表性的酶。代入 1 热化学卡路里等于 4.184 焦耳就能得到 54,810 焦/摩尔。

比较乳酸脱氢酶在 40°C (313 开氏度) (**T₁**) 的反应速度 (**k₁**) 和在 30°C (303 开氏度) (**T₂**) 的反应速度 (**k₂**) 得到:

$$k_1/k_2 = e^{((54,810 \text{ J/mol})/(8.314 \text{ J/mol-K})) * (1/303 \text{ K} - 1/313 \text{ K})} = 2.004$$

在 40°C 的反应速度基本上正好是 30°C 的两倍, 或者反过来说, 温度每降低 10°C, 就能把反应速度降低近一半。这根 **Q₁₀** 原则是一致的, 根据经验计算出 0°C 到 40°C 之间, 温度每下降 10°C 反应速度会减少一半到三分之一 ¹⁰。

反应速度随着温度降低呈指数下降表明, 如果化学反应在这些温度下是可能的话, 反应速度在冷冻低温下 (低于 -100°C) 可以无限的低。用上面的等式比较在 37°C (310 开氏度, 人体正常体温) 到低温的反应速度, 得出下面的表格。

37°C 和低温下的反应速度比较

温度	参照物	在 37°C 下的速度比较	与 6 分钟在 37°C 下比较
0°C (273K)	融化冰	18	1.8 小时

-80°C (193K)	干冰	400,000	4.5 年
-120°C (153K)	玻璃转化	30 亿(3×10^9)	34,000 年
-196°C (77K)	液氮沸腾段	9×10^{27}	10^{23} 年

如果乳酸脱氢酶的反应速度代表了新陈代谢的一般速度，那么在 37°C 时新陈代谢会是 0°C 的 18 倍。实验观察到氧化磷酸化作用的速度在 4°C 是 37°C 的十二分之一，刚刚算过的值大致相等。

在人体体温下，反应速度是 -196°C 的 9×10^{48} 倍，说明在低温下一千年内都不会发生任何反应。按照这种速度，在 37°C 时 6 分钟内因局部缺血发生的生化反应，在液态氮的温度下需要 10^{23} 年才能达到。但是即使这些数字低估了在冷冻人体下的化学惰性，因为阿伦尼乌斯方程是建立在正常的化学反应可以存在于流体或者气体这个假设下的；在 -130°C 一下，即使玻璃化后的哺乳动物组织已经呈固态，粘度超过了 10^{13} 泊^{12,13}，这个粘度也是 20°C 的水的粘度的 10^{15} 倍。这导致了扩散速度远超过了地质学意义上的时间跨度。在液态氧的温度下，哺乳动物的组织甚至在背景辐射下还能保持固态长达好几个世纪¹²。

有一个概念误区就是冷冻会导致哺乳动物的组织细胞内形成冰结晶，这样细胞就会爆裂掉。因为由冷水组成的哺乳动物的组织会导致细胞渗透，形成细胞外的纯的冰水结晶。解冻的时候会增加有毒电解质的浓度。当达到足够量的时候，最终细胞外形成的冰会挤碎剩下的还没有冰冻起来的通道¹²。不管是物理的挤压还是电解质的毒性，都是在慢冷冻过程中冰的形成后而产生的破坏因素，这在低温生物学家中是一个仍然存在的争论点¹⁵。不过人体冷冻实践就是建立在减少甚至消除结冰的努力上的。

玻璃化和冷冻储存

长期以来，冷冻实践向冷冻对象灌注常见的冷冻保护液来尽量阻止冰的形成，一般说来这种防冻混合物就是甘油。在 2007 年两家主要的做冷冻保护液灌注的冷冻机构（阿尔科生命延续基金和人体冷冻组织）声称他们用玻璃化的方案已经完全消除了大脑内的冰的形成，但是还没有声称对其他的器官或者组织能达到这种效果。

玻璃化是一种非结晶的固态结构，这和冰的结晶状态完全不同。琥珀就是一种常见的玻璃状（非晶体状）形态的例子。纯水也可以非结晶化，条件是如果每秒的冷冻下降温度不少于三百万开氏度，这种冷冻速度对于动物组织来说是不切实际的。蔗糖在足够迅速的冷冻条件下可以玻璃化成“棉花糖”，但是如果冷冻速度不够快就会形成“冰糖”结晶。在制作棒棒糖时，往蔗糖里加入玉米糖浆会让蔗糖慢速冷却达到一种非结晶的固态。二氧化硅可以很迅速的冷却成玻璃状的硅石或者在慢速冷却下形成结晶状（石英石）。常见的玻璃器皿和玻璃窗都是在制作过程中加入了钠和氧化钙，形成一种融化态的流体，这种流体能从粘稠的糖浆状慢慢冷却成一种非结晶状态的固体。在融化/熔化的温度下，因为没有从流体变为固态结晶体的阶段，所以当达到玻璃化的温度 (T_g) 时，就会极大地增加的粘稠度（固态的特性），其中 T_g 是由冷却的速度决定的。

在低温生物学中，常见的冷冻保护液包括了二甲亚砜（DMS）和多元醇乙二醇（一种汽车防冻液），丙二醇（曾被用到冰激凌里面以减少冰体结晶）和丙三醇（从上世纪 50 年代起用于冷冻精子和血细胞）。所有的这些混合物都具有氢键结合水来防止水分子形成冰。这些

冷冻保护液用依数干预阻止水分子形成冰晶。混合的冷冻保护液要比纯的冷冻保护液毒性低，而且可以完全阻止冰的形成。玻璃化混合物的抗冰剂（非冷冻保护液，比如一些防冻蛋白从化学上阻止冰晶体的形成）可以进一步的减少毒性和需要达到玻璃化的浓度。

困难在于冷冻保护液要达到足够的浓度才能阻止冰的形成，但是同时又要把毒性最小化，因为受到毒性的限制使得生物体系不能很好的从冷冻保存中恢复过来。快速冷冻可以让低浓度的冷冻保护液起到防止冰的形成的作用，但是组织体越大，快速冷冻越难。冷冻保护液的毒性变化与温度是相反的，所以使用粘度不是那么高的冷冻保护液混合物可以加速穿透组织，从而减少了组织在被冷冻前处在常温冷冻保护液里面的时间。

尽管对于冷冻保护液的毒性有多种解析，但是具体的分子机构还是不得而知²⁰。目前来看只要冷冻保护液不破坏分子，它们造成的损害也不一定是不可挽回的。另外，在减少玻璃化的混合物的毒性方面已经取得了相当大的进展^{21,22}，因此没有理由不相信未来不能制造出毒性更低的冷冻保护液。

研究者研究和尝试玻璃化最多的哺乳类器官是子宫。各种不同物种的子宫都实现了玻璃化，但是最重要的成就是实现老鼠子宫的玻璃化。玻璃化后被保存在-196°C温度中的老鼠子宫在回温以后生出的幼鼠成活率可以和新鲜子宫的成活率相比较。

对大鼠海马大脑切片研究表明，在玻璃化后以固态冷冻方式在-130°C下的大脑切片的生存力是可以和没有玻璃化或者冷冻过的切片相比较的。CA1区域（大脑中对缺血性损伤最脆弱的区域）的亚显微结构显示，回温后的大脑切片和没有冷冻过的比起来，看上去被保存的相当好²⁴。冷冻组织给大脑灌注玻璃化溶液直到达到饱和状态。

组织在被玻璃化和冷冻后保持了生存力也能显示亚显微结构。细胞内的 K^+/Na^+ 的比例值是一种常见的用来检验生存力的方法，尽管其他的方法（比如测量细胞内 ATP 的含量）可能以后也会有用。如果没有和 ATP 和 Na^+ 在细胞膜内和钠泵结合，也没有 K^+ 在细胞膜外，钠泵将无法维持细胞膜的功能。尽管细胞能在没有钠泵的情况下能维持几个小时的细胞膜功能，但是细胞内 Na^+ 缓慢流失导致 K^+ 在细胞外的流失，最终会导致几小时后细胞膜完全失去功能。同样的，如果细胞因为无法在线粒体内产生能量（ATP）而死亡，那么钠泵也会停止运作。因此，通常细胞内的 K^+/Na^+ 的比例显示的是钠泵的功能和细胞膜的完整性。

为了检测细胞内的 K^+/Na^+ 的比例，组织被放在甘露醇里洗掉细胞外的离子。接着用三氯乙酸打破细胞壁释放细胞内的离子。用火焰光度计或者原子吸收分光仪来检测钠离子和钾离子的相对浓度。玻璃化的大鼠海马大脑切片的生存性研究发现，用细胞内的 K^+/Na^+ 的比例值分析出来的切片生存性超过一般切片生存性值的 90%²⁴。

一个兔子的肾被玻璃化后用-135°C冷冻，然后又回温并且移植到兔子体内。这个被玻璃化过的移植体作为仅有的一个肾，明显功能正常地维持了兔子的生存²⁵。一些人觉得了解大脑在被冷冻保存的时候大脑功能是至关重要的。但从简单的层面来说，肾产生尿液，大脑产生意识。既然一个玻璃化后又回温的肾有产生尿的能力，那么一个生理上恢复又回温的大脑产生意识的能力也不会差。生理上机构的保存和恢复应该是体现在功能上的恢复，不在于是器官还是组织。

用来保存兔子肾脏的玻璃混合液是 M22。冷冻人体机构阿尔科 Alcor 用 M22 来玻璃化冷冻对象。对兔子灌注 M22 时发现保存的大脑亚显微组织并没有形成冰。

快速地从 0°C 冷却到 -130°C 才能最小化冰的形成。当从 -130°C 冷却到 -196°C 时，大型玻璃化的固态样品的热应力可能导致裂痕和断裂²⁷。尽管理论上如果冷却到 -196°C 的速度足够慢。可以避免裂痕的产生，但是这个冷却速度的值还不明确，而且可能慢到无法实际操作。在玻璃转化温度时进行退火可以减少玻璃化样品的热应力，但是很可能不够。因为已知的天然性质，裂痕损害的修复比结冰损害的修复要容易的多。

“死亡的可逆性”？

早在 20 世纪 50 年代人们就相信心跳停止的时候死亡是可逆的。如今，心肺复苏手术 (CPR) 结合心脏电击器 (AEDs) 已经挽救了无数曾经因为心跳停止而被宣告医学死亡的人的生命²⁹。但是现在仍然广泛得认为如果心跳停止 6 分钟以后还得不到供血，大脑将会发生不可逆转的损伤。

在 1976 年彼得·沙法 (CPR 之父) 展示如果提高动脉压、降低肾上腺素、肝磷脂加上用右旋糖酐 40 血液稀释⁴⁰，狗能在 12 分钟没有心跳的情况下保持神经不受损伤。十多年后一个实验表明，猫在再灌注和去肾上腺素 (或者多巴胺) 后大脑缺血长达一个小时，其中原发性的 EEG 有 50% 恢复了活性。十五只猫中有六只在集中护理后恢复自然呼吸，而且其中一只在正常的神经功能下 (除了轻微的运动失调) 存活了一整年³¹。6 分钟的限制不主要是神经层面的现象，问题是增加的灌注压力可以被增加的血管抵抗力抵消 (部分)³²。

当缺血时间超过大概 20 分钟后，血液恢复后会加剧再灌注造成的组织损伤。缺血时间过长以后再供血会引发炎症发生而且引发氧气形成无毒的自由基 (反应性的氧种类) 比如超氧化物³³。黄嘌呤氧化镁产生的超氧化物对内皮细胞造成的损伤远超软组织细胞³⁴。在引发炎症的情况下，比如发生在再灌注的时候，可诱导的氧化一氮合成酶能增加高于正常值几千倍的氧化一氮的浓度³⁵。在再灌注时，过高数量的超氧化物把几乎所有可用的一氧化氮都转化成了过氧硝酸盐—被认为是造成脑内毛细血管内皮细胞损伤的主要物质³⁶。

神经性中毒³⁷ 对脑结构的损伤效应在死后仍然存在的时间要比一般认为的长的多。在阻止血液回流到大脑皮层 (大脑性局部缺血) 6 小时后，老鼠的大脑皮层只有 15% 的神经坏死。大部分 (65%) 没有出现坏死直到缺血达到了 12 小时以后³⁸。在老年人死后大约 2.6 个小时的大脑中分离出神经细胞，放在试管内两周以后，有 70-90% 的神经表现出存活性³⁹。

心跳停止六分钟以后导致神经损伤的部分原因是，局部缺血引发了神经自我毁灭的过程 (细胞坏死)，完成这一过程要花好几个小时。但在某种层面上治疗可能可以干预这种细胞坏死。大鼠海马 CA1 分区中神经比大脑中其他地方的神经都更容易因为缺血而坏死⁴⁰。但是使用阻止细胞死亡进行的半胱天冬酶抑制剂可以大大降低大鼠海马因缺血造成的细胞死亡⁴¹。半胱天冬酶抑制剂也并用来阻止冷冻的造血细胞从冷冻温度下回温的时候坏死⁴²。在缺血/再灌注损伤后的老鼠肝脏中，BAG-1 蛋白和细胞死亡后的 Bcl-2 蛋白家族结合展示出强大的抗坏死细胞的能力⁴³。

大多数的神经学家认为思想意识在解剖学基础上是大脑物理结构中的编码，特别是神经纤维网的连接性和突触强度⁴⁴ 和可能是神经细胞表观遗传的机构⁴⁵。即使完全没有脑电波活动但是脑神经仍然可以全面恢复的事实^{5,46} 证明了一个命题，这个命题是指意识的根本基础是机构性的而不是动态性的，所以意识可以在冷冻低温下被保存。

关于大脑中储存的大量冗余的信息量的可能性，在中风之后大脑皮层的功能仍然能显著恢复^{47,48,49}。神经干细胞的移植治疗引发了关于让大脑从因缺血，中毒和冷冻造成的损伤中恢复的可能性的进一步讨论⁵⁰。这些观点觉得人体在次优条件下冷冻保存中可以承受的损伤还能增加。

人体冷冻的关键是保存大脑的结构和恢复大脑的功能。其他的器官和组织没有这么重要，因为未来医学会轻易的解决人造器官和干细胞组织再生。蝾螈的附属物再生已经作为参考被用到哺乳动物的再生药物中⁵¹。可生物降解的三维编制纤维支架⁵²很可能被用到器官的再造中，如果不能在全身使用的话。

传统的冷冻致力于消除损伤，而且减少对未来分子修复技术的依赖。在许多案例中，冷冻对象在复苏前经历了一分钟内心脏骤停。证据表明意识神经基础的保存时间远超过六分钟，这就是说那些没有及时得到处理的冷冻对象，在结合分子医学挽回死细胞和修复受损血管的条件下也能恢复。这不是说在血液循环停止六分钟后冷冻是没有意义的。在心脏停跳的时候许多组织仍然是活的，而且会过好几个小时才会死去。

在最好的情况下，冷冻对象的大脑内实际上没有任何冰的形成过程。在高于冷冻温度的情况下，加上疾病治疗和抗老复原，将进行修复玻璃化大脑组织中因局部缺血造成的一点损伤。

尽管现有的法律法规已经对生和死之间画了明确的界限，生物学和心理学上的事实指出复活是一个连续性的而不是二原状态的过程。意识是从胚胎到胎儿到儿童到成年逐渐体现的，意识也是在神经退行性的疾病中逐渐消失的。在心跳停止后思想意识在解剖学的基础上（大脑）经过几个小时到几天逐渐分解，分解的速度因温度而变。意识非二进制的特点也会成为冷冻对象大脑部分损伤然后修复并得到重生，导致部分记忆缺失和原有自我认知的部分恢复的证据。

冷冻程序

对于防止最终的冷冻对象进行减少局部缺血/再灌注损伤的预处理是明智的，但是不仅仅是在实践过程中做到。举例来说，在缺血前提前 30 分钟进行静脉注射 α -生育酚形成维生素 E (20mg/kg)，被证明可显著减少皮质过氧化和神经性损伤⁵³。最好同时包括 α -生育酚和 γ -生育酚，因为 γ -生育酚可以除去过氧硝酸盐但 α -生育酚不能⁵⁴。对冷冻病人进行维生素 E 的预处理还增加了减少血液凝固的优点—而且还不会出现因为阿司匹林而造成胃部出血的风险。许多鱼油（特别是三文鱼油）除了能减少心跳骤停的风险外，也有一样的功能⁵⁵。通常减少冷冻病人的血液凝固有很大的好处。但是对于正在进行手术的病人，维生素 E 和鱼油有可能会因为具有造成大量流血的危险而被禁用。

通常只对事先和冷冻机构（比如阿尔科生命延续基金会，美国人体冷冻学会或者人体冷

冻机构)签订了合同和资金安排的对象进行冷冻处理。在最理想的环境下，冷冻对象会在心跳停止后很快被宣布死亡。只有在法律宣布死亡后，才能开始冷冻程序。

当心跳停止并被宣布死亡后，冷冻对象将被用药物静止，减少脑部新陈代谢，防止/逆转血液凝固，增加血压，稳定 pH 防止酸中毒，并避免局部缺血/再灌注的损伤。

冷冻程序包括尽快地恢复血液循环和呼吸以保证组织的存活状态。在冷冻界中，这被称作心肺辅助 (CPS) 而不是心肺复苏 (CPR)，因为死亡以后的复苏是不被要求的 (DNR，不实施心肺复苏的条件)。使用到异丙酚 (2,6-丙泊酚) 的部分原因是静止状态可以避免复苏，而且还有一个好处是能起到保护神经的作用⁵⁶。异丙酚被证实可以防止由于缺血/再灌注的损伤引起的神经细胞坏死。

肝磷脂用来防止血液凝固。通常用链激酶来溶解血栓分解血液凝块。THAM (三羟基氨基甲烷) 起到缓冲作用，不产生二氧化碳的情况下维持动脉的 pH，而且因为它能穿透细胞膜⁵⁸还能维持细胞内的 pH。

当有可用设施的时候，冷冻团队能用机械设备恢复血液循环和呼吸，这种机械设备可以用下行冲程 (压缩) 和上行冲程 (解压缩) 来恢复血液循环。压缩和解压活动 (ACDC) 和腹部插入式的压缩可以大幅度推进 CPS 的灌注⁵⁹。肾上腺素被广泛的应用来维持血压以辅助 CPS，尽管也可以使用抗利尿激素⁶⁰。

在对冷冻对象进行 ACDC CPS 的过程中，他或者她被浸在循环冰水中。在水中进行冷却比在空气中更快⁶¹，而且根据牛顿冷却定律，在流动的水中比在静止的水中快很多。另外 ACDC CPS 带动血液循环，更加幅度加快了冷冻对象的冷却速度。

一旦冷冻对象的温度冷却到 10°C 一下，就可以开始灌注玻璃化溶液了。通过控制与冷冻保护液接触的时间达到脑部的玻璃化，这个时间要比大鼠海马的脑部切片玻璃化的时间长的多。冷冻保护液是有毒的，所以增加与冷冻保护液接触的时间意味着增加接触部位的毒性。但是大的器官和人体组织不会像组织切片一样冷却的那么快，因此必须使用到更高浓度的冷冻保护液来防止冰的形成。

有的建议说系统将冷冻对象保存在近-130°C 的温度下而不是-196°C 可以减少由于热应力产生的裂痕。冷冻对象被保存在刚好-130°C 以下时仍然会保持固态，因为迄今为止玻璃化溶液的玻璃转化温度刚好在-120°C 以下²⁰。除了对少数几个冷冻对象外，储存在刚好-130°C 以下没有被全面实施。

冷冻对象被储存在类似保温瓶一样液态氮的罐子里，这是一种经济又不用依赖电力 (因此不怕断电) 的储存方案。

科学和间接证据

很多批评家声称人体冷冻不科学也不可能成为科学，除非将一只经过冷冻温度保存过后的哺乳动物回温并且完全复活。但是根据间接证据建立在外推法上的模型才是科学的中心所在。

没有人见过地球的核心。在大爆炸以后的百万分之一秒内，宇宙状态的模型就被建好了。科学家描述全球变暖几年以后的地球状态。建造模型用来描述装有核废水的容器在千百年后的样子—在核废水的处理上模型被认为是相当可靠的。人类登上月球的经历间接说明人类未来有天也许能登上火星。

很多人为他们的新生宝宝冷冻脐带血干细胞，他们这么做是基于对未来科技的期望而不是现在的科技。正是这种对未来科技的期望，濒危物种的胚细胞和 DNA 也被冷冻保存起来。流行感冒的疫苗只能有 50% 的机会保护一个超过 65 岁的成人^{62,63}。不能说冒险采用只有间接证据证明有成功可能性的医疗手段就是不科学的，不管这个被称为不科学的医疗手段是保守的或者是激进的，完全能保证成功的医疗手段也不能说就是科学的。

如果有貌似合理的模型证明对冷冻保存过的对象修复和复活是可能的^{65,66}，那么根据这些模型进行的人体冷冻看上去也是合理的；人体冷冻是一个长时间的方案，也许会成功，也许不会。如果要等到一个冷冻保存过的哺乳动物成功复活了才开始冷冻保存人类，可能意味着已经浪费了太多生命。这就好像我们等上千万年，确保核废水是可以被控制以后，才开始处理这些废水。间接证据的存在就时为了说明：证明冷冻实践是否是科学的核心依据，不是能否复活冷冻保存后的哺乳动物。

总结

低温能减缓生物时间，在液态氮的温度下能有效地停止时间。冷冻保护液大大减少了组织冷冻保存造成的损伤，而且有效的玻璃化能完全阻止冰的形成。冷冻保护液造成的损伤很有可能是可修复的，而且也在不断发现低毒性的冷冻保护液。应用到人类和动物上时，冷冻保存意味着达到一种原则上可逆的稳定生物状态。

当心脏停止跳动血液循环也停止的时候，死亡是一个过程的开始而不是结束。当基于心肺停止的法律死亡被宣布的时候，冷冻程序的宗旨是用人工恢复血液循环和迅速冷冻来减少进一步的损伤。从还有体温的医学死亡到大脑内关于被界定成人类的信息完全消失还有好几个小时的时间间隔。

关于老化是一种能被治疗甚至最终也许能被完全逆转的疾病（返老还童）的假设，是基于通常认为老化是包含了细胞和分子层面的多种类病症的研究，理解和用可预测的工具是可逆的基础上的。因大脑缺血造成的病症（医学死亡），从冷冻保存上说，和其他目前无法治愈的疾病一样有必要被研究而且未来可能会被治愈。如果在未来某天老化的损伤是可以被修复的，那么没有理由不相信因为冷冻程序而造成的损伤也能被修复。而且如果未来某天老化的损伤是可以被修复的，冷冻也许是现今一些人类去研究未来医学对现存无法治愈的疾病和复活的唯一途径。

参考书目

1. Eich C, Brauer A, Kettler D. Recovery of a hypothermic drowned child after resuscitation with cardiopulmonary bypass followed by prolonged extracorporeal membrane oxygenation. *Resuscitation*. 2005 Oct;67(1):145-8.

2. Bolte RG, Black PG, Bowers RS, Thorne JK, Corneli HM. The use of extracorporeal rewarming in a child submerged for 66 minutes. *JAMA*. 1988 Jul 15;260(3):377-9.
3. Takeda Y, Namba K, Higuchi T, Hagioka S, Takata K, Hirakawa M, Morita K. Quantitative evaluation of the neuroprotective effects of hypothermia ranging from 34 degrees C to 31 degrees C on brain ischemia in gerbils and determination of the mechanism of neuroprotection. *Crit Care Med*. 2003 Jan;31(1):255-60.
4. Behringer W, Safar P, Wu X, Kentner R, Radovsky A, Kochanek PM, Dixon CE, Tisherman SA. Survival without brain damage after clinical death of 60-120 mins in dogs using suspended animation by profound hypothermia. *Crit Care Med*. 2003 May;31(5):1523-31.
5. Hayashida M, Sekiyama H, Orii R, Chinzei M, Ogawa M, Arita H, Hanaoka K, Takamoto S. Effects of deep hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion on electroencephalographic bispectral index and suppression ratio. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2007 Feb;21(1):61-7.
6. Costanzo JP, Lee RE Jr, DeVries AL, Wang T, Layne JR Jr. Survival mechanisms of vertebrate ectotherms at subfreezing temperatures: applications in cryomedicine. *FASEB J*. 1995 Mar;9(5):351-8.
7. Suda I, Kito K, Adachi C. Viability of long term frozen cat brain in vitro. *Nature*. 1966 Oct 15;212(5059):268-70.
8. CHEMISTRY: The Central Science (Seventh Edition); pp.511-512; Brown, TL, et. al., Editors; Prentice Hall (1997).
9. Low PS, Bada JL, Somero GN. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Feb;70(2):430-2.
10. Davidson EA, Janssens IA. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):165-73.
11. Dufour S, Rousse N, Canioni P, Diolez P. Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation. *Biochem J*. 1996 Mar 15;314 (Pt 3):743-51.
12. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984 Sep;247(3 Pt 1):C125-42.
13. Angell CA. Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions. *Chem Rev*. 2002 Aug;102(8):2627-50.

14. CRC Handbook of Chemistry and Physics (76th Edition), p.6-10, David R. Lido, Editor-in-Chief CRC Press (1995-1996).
15. Mazur,P, "Principles of Cryobiology" in Life In the Frozen State, pp.37-51, Barry J. Fuller, et. al., Editors; CRC Press (2004).
16. Chamberlain,F, Vitrification arrives! Cryonics 2000 21(4):4-9.
17. Best,B, Long Life: Longevity through Technology, CI-VM-1 cryoprotectant and CI carrier solution used for vitrification 2007 Mar-Apr; 39(3-4):5-6 .
18. Bald WB. On crystal size and cooling rate. J Microsc. 1986 Jul;143(Pt 1):89-102.
19. Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. Cryobiology. 2000 May;40(3):228-36.
20. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Cryobiology. 1990 Jun;27(3):247-68.
21. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. Cryobiology. 2004 Feb;48(1):22-35.
22. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, Zendejas E. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. Cryobiology. 2004 Apr;48(2):157-78.
23. Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, Koyama K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. Fertil Steril. 2006 Oct;86 Suppl 4:1182-92.
24. Pichugin Y, Fahy GM, Morin R. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification. Cryobiology. 2006 Apr;52(2):228-40.
25. Fahy,GM, "Vitrification as an approach to cryopreservation: general perspectives", CRYOBIOLOGY; 51(3):348 (2005) [Abstract].
26. Lemler J, Harris SB, Platt C, Huffman TM. The arrest of biological time as a bridge to engineered negligible senescence. Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun;1019:559-63.
27. Fahy GM, Saur J, Williams RJ. Physical problems with the vitrification of large biological systems. Cryobiology. 1990 Oct;27(5):492-510.

28. Baudot,A., Odagescu,V, "An automated cryostat designed to study the vitrification of cryoprotective solutions without any function", CRYOBIOLOGY 53:442 (2006) [Abstract].
29. Cobb LA, Fahrenbruch CE, Walsh TR, Copass MK, Olsufka M, Breskin M, Hallstrom AP. Influence of cardiopulmonary resuscitation prior to defibrillation in patients with out-of-hospital ventricular fibrillation. JAMA. 1999 Apr 7;281(13):1182-8.
30. Safar P, Stezoski W, Nemoto EM. Amelioration of brain damage after 12 minutes' cardiac arrest in dogs. Arch Neurol. 1976 Feb;33(2):91-5.
31. Hossmann KA. Resuscitation potentials after prolonged global cerebral ischemia in cats. Crit Care Med. 1988 Oct;16(10):964-71.
32. Shaffner DH, Eleff SM, Brambrink AM, Sugimoto H, Izuta M, Koehler RC, Traystman RJ. Effect of arrest time and cerebral perfusion pressure during cardiopulmonary resuscitation on cerebral blood flow, metabolism, adenosine triphosphate recovery, and pH in dogs. Crit Care Med. 1999 Jul;27(7):1335-42.
33. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. Transplant Proc. 2007 Mar;39(2):481-4.
34. Ratych RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. Surgery. 1987 Aug;102(2):122-31.
35. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. Free Radic Biol Med. 2002 Dec 1;33(11):1440-50.
36. Wu S, Tamaki N, Nagashima T, Yamaguchi M. Reactive oxygen species in reoxygenation injury of rat brain capillary endothelial cells. Neurosurgery. 1998 Sep;43(3):577-83.
37. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev. 1999 Oct;79(4):1431-568.
38. Garcia JH, Liu KF, Ho KL. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. Stroke. 1995 Apr;26(4):636-42.
39. Konishi Y, Lindholm K, Yang LB, Li R, Shen Y. Isolation of living neurons from human elderly brains using the immunomagnetic sorting DNA-linker system. Am J Pathol. 2002 Nov;161(5):1567-76.

40. Radovsky A, Safar P, Sterz F, Leonov Y, Reich H, Kuboyama K. Regional prevalence and distribution of ischemic neurons in dog brains 96 hours after cardiac arrest of 0 to 20 minutes. *Stroke*. 1995 Nov;26(11):2127-33.
41. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1998 Jul 1;18(13):4914-28.
42. Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *FASEB J*. 2002 Oct;16(12):1651-3.
43. Sawitzki B, Amersi F, Ritter T, Fisser M, Shen XD, Ke B, Busuttil R, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of Bag-1 by ex vivo gene transfer protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Hum Gene Ther*. 2002 Aug 10;13(12):1495-504.
44. Abraham WC, Robins A. Memory retention--the synaptic stability versus plasticity dilemma. *Trends Neurosci*. 2005 Feb;28(2):73-8.
45. Arshavsky YI. "The seven sins" of the Hebbian synapse: can the hypothesis of synaptic plasticity explain long-term memory consolidation *Prog Neurobiol*. 2006 Oct;80(3):99-113.
46. Rothstein TL. Recovery from near death following cerebral anoxia: A case report demonstrating superiority of median somatosensory evoked potentials over EEG in predicting a favorable outcome after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2004 Mar;60(3):335-41.
47. Dancause N, Barbay S, Frost SB, Plautz EJ, Chen D, Zoubina EV, Stowe AM, Nudo RJ. Extensive cortical rewiring after brain injury. *J Neurosci*. 2005 Nov 2;25(44):10167-79.
48. Carmichael ST. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol*. 2006 May;59(5):735-42.
49. Nudo RJ. Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery. *Stroke*. 2007 Feb;38(2 Suppl):840-5.
50. Savitz SI, Dinsmore JH, Wechsler LR, Rosenbaum DM, Caplan LR. Cell therapy for stroke. *NeuroRx*. 2004 Oct;1(4):406-14.
51. Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine.

Science. 2005 Dec 23;310(5756):1919-23.

52. Cooper JA Jr, Sahota JS, Gorum WJ 2nd, Carter J, Doty SB, Laurencin CT. Biomimetic tissue-engineered anterior cruciate ligament replacement. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3049-54.
53. Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Sogabe T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration. Stroke. 1983 Nov-Dec;14(6):977-82.
54. Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):3217-22.
55. Charnock JS, McLennan PL, Abeywardena MY. Dietary modulation of lipid metabolism and mechanical performance of the heart. Mol Cell Biochem. 1992 Oct 21;116(1-2):19-25.
56. Adembri C, Venturi L, Tani A, Chiarugi A, Gramigni E, Cozzi A, Pancani T, De Gaudio RA, Pellegrini-Giampietro DE. Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia: inhibition of mitochondrial swelling as a possible mechanism. Anesthesiology. 2006 Jan;104(1):80-9.
57. Polster BM, Basanez G, Young M, Suzuki M, Fiskum G. Inhibition of Bax-induced cytochrome c release from neural cell and brain mitochondria by dibucaine and propranolol. J Neurosci. 2003 Apr 1;23(7):2735-43.
58. Gehlbach BK, Schmidt GA. Bench-to-bedside review: treating acid-base abnormalities in the intensive care unit - the role of buffers. Crit Care. 2004 Aug;8(4):259-65.
59. Babbs CF. CPR techniques that combine chest and abdominal compression and decompression: hemodynamic insights from a spreadsheet model. Circulation. 1999 Nov 23;100(21):2146-52.
60. Wenzel V, Lindner KH. Arginine vasopressin during cardiopulmonary resuscitation: laboratory evidence, clinical experience and recommendations, and a view to the future. Crit Care Med. 2002 Apr;30(4 Suppl):S157-61.
61. Baccino E, Cattaneo C, Jouineau C, Poudoulec J, Martrille L. Cooling rates of the ear and brain in pig heads submerged in water: implications for postmortem interval estimation of cadavers found in still water. Am J Forensic Med Pathol. 2007 Mar;28(1):80-5.

62. Nichol KL, Nordin J, Mullooly J, Lask R, Fillbrandt K, Iwane M. Influenza vaccination and reduction in hospitalizations for cardiac disease and stroke among the elderly. *N Engl J Med.* 2003 Apr 3;348(14):1322-32.
63. Hak E, Buskens E, van Essen GA, de Bakker DH, Grobbee DE, Tacken MA, van Hout BA, Verheij TJ. Clinical effectiveness of influenza vaccination in persons younger than 65 years with high-risk medical conditions: the PRISMA study. *Arch Intern Med.* 2005 Feb 14;165(3):274-80.
64. Drexler KE. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Sep;78(9):5275-5278.
65. Freitas RA Jr. What is nanomedicine? *Nanomedicine.* 2005 Mar;1(1):2-9.