

ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ЛЬДА В КРИОЗАЩИТНЫХ РАСТВОРАХ

© 2017 г. А.А. Андреев*, Д.Г. Садикова*, Н.А. Ивличева*, А.В. Борода**

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

**Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН,
690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

E-mail: alandreev@mail.ru

Поступила в редакцию 15.03.16 г.

Исследовано формирование микрочастиц льда в тонком слое (0,2 мм) водных растворов криозащитных веществ при охлаждении до температуры -196°C . Форму и размер микрочастиц льда определяли методом криомикроскопии. При температурах ниже 0°C наблюдали образование сплошного массива льда, дальнейшее охлаждение вызывало растрескивание льда за счет возникновения термомеханических напряжений и формирование микрочастиц. Форма и размер частиц зависела от состава замороженного раствора и скорости охлаждения. Компоненты криозащитных растворов (криопротекторы, яичный желток, сахара и липиды) существенно изменяли форму и размеры микрочастиц льда.

Ключевые слова: криозащитные растворы, криомикроскопия, микрочастицы льда, растрескивание льда.

Выживание клеток при криоконсервации зависит от их способности компенсировать повреждения, возникающие вследствие физических, физико-химических, физиологических и биохимических воздействий, возникающих в ходе процесса замораживания–оттаивания. Большое значение при этом имеет стадия формирования твердой фазы (льда) [1–4].

Формирование льда, наряду с другими факторами (токсичность криопротекторов, осмотический шок, латеральная диффузия белков и липидов, перекристаллизация при оттаивании и т. д.), заметно влияет на выживание клеток в процессе замораживания–оттаивания.

Температура, при которой начинается процесс образования льда, называют температурой кристаллизации [5]. Присутствие растворенных веществ снижает равновесную температуру замерзания с температурным коэффициентом – криоскопической константой $1,86^{\circ}\text{C}/\text{M}$ [6]. Поэтому замерзание дистиллированной воды происходит при более высокой температуре, чем у ее растворов. Рост кристаллов льда начинается при температуре замерзания соответствующего водного раствора, при этом концентрация растворенных веществ в незамерзшей фазе увеличивается. Процесс формирования льда и уве-

личение концентрации остающегося жидкого раствора продолжается по мере охлаждения вплоть до тех пор, пока раствор не становится такой степени вязкости, что формирует аморфный (витрифицированный) лед [7].

Объем, занимаемый кристаллами льда, обычно определяется многими факторами, и существование кристаллических и витрифицированных (аморфных) областей является неизбежным следствием замерзания растворов. Образование льда при увеличении концентрации растворенных веществ в охлаждаемой жидкости приводит к формированию неоднородной среды. Интерес представляет поведение массива льда при дальнейшем понижении температуры до -196°C . Охлаждение вызывает сжатие образовавшихся кристаллов льда. Коэффициент линейного расширения (сжатия) льда, состоящего из дистиллированной воды, равен $50,7 \cdot 10^{-6}^{\circ}\text{C}^{-1}$, а коэффициент объемного расширения (сжатия) – $152 \cdot 10^{-6}^{\circ}\text{C}^{-1}$ [8]. Температурные коэффициенты льда замороженных растворов и аморфного льда, сформированного из концентрированных растворов, могут значительно различаться, что приводит к возникновению термомеханических напряжений при дальнейшем охлаждении [9,10]. При относительно малых напряжениях наблюдаются деформации, пропорциональные величине этих напряжений, а если напряжение становится чрезмерным, то будет

Сокращения: ФР – физиологический раствор, ДМСО – диметилсульфоксид.

происходить пластическая деформация материала либо разрыв в местах наименьшей прочности [11] и формирование отдельных частиц льда. Начальная фаза замораживания – формирование кристаллов льда в водных криозащитных растворах при отрицательных околонулевых температурах – достаточно хорошо изучена [12–23]. Процессы, которые происходят при глубоком охлаждении замороженного материала до температур, при которых осуществляется хранение (-196°C), изучены недостаточно. Большинство исследователей ограничиваются диапазоном температур от 0 до -80°C . Этот диапазон считается наиболее критическим из-за повреждений биологического материала при внеклеточном и внутриклеточном образовании кристаллов льда [24]. Термомеханические деформации и растрескивание в замораживаемой криозащитной среде при охлаждении до температур жидкого азота могут повредить одиночные клетки и внеклеточный матрикс. Явление растрескивания было показано в экспериментах по замораживанию биологических материалов [1,3,25,26].

Процесс растрескивания в замороженных водных растворах с живыми тканями при низких температурах подробно изучен в работах [11,27]. В них показано, что при охлаждении ниже -100°C термомеханическое напряжение в замороженной среде увеличивается из-за сжатия льда. Формирование растрескиваний зависит от физических свойств замораживаемого материала (эластичности и жесткости). Если кристаллы льда в замерзшей среде характеризуются высокой жесткостью, то аморфный лед, образовавшийся из высококонцентрированных растворов, может обладать значительной эластичностью. Увеличение эластичности материала ведет к снижению температуры, при которой начинается растрескивание [11,27] и соответственно формирование микрочастиц льда.

Целью нашей работы было исследование размера и форм микрочастиц льда, сформировавшихся в замороженных криозащитных растворах при температуре жидкого азота.

МЕТОДЫ

Растворы. Все исследованные растворы готовили на дистиллированной воде. В них добавляли отдельные компоненты криозащитных сред в концентрациях, близких к используемым в методиках по криоконсервации биологического материала (спермы осетровых рыб, эмбриональных и нервных клеток моллюсков): физиологический раствор для осетра (ФР), ФР + 1 М диметилсульфоксида (ДМСО), ФР +

1,5 М ДМСО, ФР + 10% яичного желтка, 1 М ДМСО, 1,5 М ДМСО, 100% ДМСО, 1 М формамид, 2 М формамид, 1 М этиленгликоль, 1,37 М глицерин, 0,05 М трегалоза, 0,1–0,5 М таурин. Мы также исследовали физиологические солевые растворы, которые обычно используют при криоконсервации клеток (физиологический раствор для клеток осетра, среда для культивирования изолированных нейронов моллюска прудовика, среда Лейбовича L 15, среда Хенкса).

Для спермы осетра физиологический раствор имел следующий состав (мМ): NaCl – 84, KCl – 3, CaCl₂ – 3, NaHCO₃ – 23, pH 7,4 – 7,6 [28]. Раствор для культивирования изолированных нейронов моллюска прудовика имел состав (мМ): NaCl – 90, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1,5, трис-HCl – 0,25, pH 7,6 – 7,9 [29].

Экспериментальная установка. Схематическое изображение экспериментальной установки показано на рис. 1. Она была собрана на основе микроскопа Orthoplan (Zeiss, Германия) с освещением через объектив 4×/0,1 Planchomat. Образцы (10 мкл) водного раствора располагались на плоской поверхности в рабочем объеме (10 × 5 × 0,2 мм) кварцевой камеры Фукса–Розенталя (Aprexlab, Россия). Сверху образец накрывали покровным стеклом толщиной 0,15 мм (Deltalab, Испания). Таким образом, замороженные образцы представляли собой тонкий (0,2 мм) слой раствора. Камеру Фукса–Розенталя в пенопластовом боксе (14 × 8 × 5 см, толщина стенок 1,5 см) помещали под объектив микроскопа. В этот бокс сначала осуществляли регулирующую подачу паров азота, а затем жидкого азота. Процессы замораживания и оттаивания регистрировали на видео в отраженном свете. Использовали систему видеорегистрации НВ-35 (NV-Group, Россия). Температуру измеряли электронным термометром АТТ 2006 (Aktacom, Тайвань), с компьютерной регистрацией температуры. Использовали микротермопару медь/константан диаметром 0,1–0,15 мм. Следует отметить, что микротермопара обычно располагалась вне поля зрения микроскопа.

Образцы охлаждали до температуры жидкого азота (-196°C) с нелинейной скоростью от 10 до 20 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Экспериментальная установка позволяла осуществлять регистрацию температуры и видеоизображения в ходе охлаждения пробы вплоть до достижения температуры жидкого азота. Фоторегистрацию сформированных микрочастиц проводили при температуре жидкого азота (-196°C). Режимы охлаждения в модельных экспериментах соответ-

ствовавали режимам в процессе криоконсервации спермы рыб [30,31].

Обработка видеоизображений. Синхронная регистрация видео и температуры позволила наблюдать замерзание раствора и формирование микрочастиц льда в процессе охлаждения. Изображение окончательно сформированных микрочастиц льда регистрировали при температуре -196°C . Определение площади и периметра микрочастиц льда осуществляли с помощью компьютерной программы Reconstruct v.1.1.0 (© John C. Fiala, 2007, США).

По полученным данным площади и периметра можно определить безразмерный изопериметрический параметр, характеризующий форму микрочастиц льда (фактор формы) – параметр F_f . Значение данного фактора можно вывести из изопериметрического неравенства

$$4\pi S \leq P^2, \quad (1)$$

где S – площадь, P – периметр.

Равенство достигается только тогда, когда кривая является идеальным кругом. Доказательство этого неравенства было приведено еще в 1948 г. [32]. Если мы имеем замкнутую кривую, то фактор формы будет выражен как

$$F_f = 4\pi S/P^2, \quad (2)$$

где P – длина периметра замкнутой кривой, S – площадь круга с тем же периметром.

Обычно $F_f \leq 1$, но в случае если кривая является идеальным кругом, то $F_f = 1$. Таким образом, фактор F_f выражает степень отклонения формы данной фигуры от круга. Данный фактор мы использовали для описания микрочастиц льда, которые образуются при глубоком охлаждении льда, полученного из криозащитных растворов. Площадь и периметр частиц льда измеряли по полученным экспериментальным микрофотографиям. Используя эти данные, мы рассчитывали безразмерный коэффициент, характеризующий степень округлости.

Статистическую обработку проводили с помощью программы SigmaPlot 12 (Demo). Результаты были представлены в виде среднеарифметического \pm стандартная ошибка среднего арифметического ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичная динамика процесса и последовательность событий при охлаждении представлена в виде отдельных кадров видеопленки, на примере замораживания раствора ДМСО (рис. 2). Регистрацию температуры и съемку

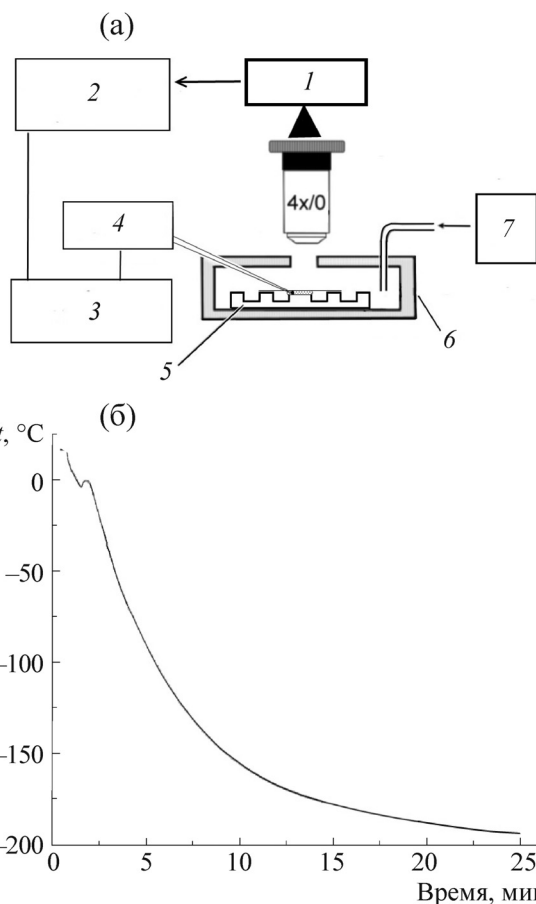


Рис. 1. (а) – Блок-схема установки для замораживания образцов: 1 – микроскоп, 2 – видеоокуляр микроскопа, 3 – компьютер, 4 – электронный термометр, 5 – камера Фукса–Розенталя, 6 – пенопластовый бокс, 7 – регулируемая система подачи охлажденного и жидкого азота. (б) – Типичная температурная кривая процесса охлаждения образца (дистиллированной воды).

видео проводили параллельно. При температуре ниже 0°C начинался процесс образования кристаллов льда (стадия I), при дальнейшем охлаждении происходило формирование сплошной массы льда (стадия II), начиналось его растрескивание (стадия III) и формирование микрочастиц под действием термомеханических напряжений (стадии III и IV).

Общая последовательность событий при замораживании всех растворов была одинаковой. Различались только типичные температуры для первых трех стадий замораживания. Температура замораживания раствора зависела от концентрации растворенных веществ и с достаточной точностью соответствовала теоретическим расчетам по криоскопической константе [33].

Так как температуры, при которых наблюдали соответствующие стадии, значительно различались в зависимости от состава растворов,

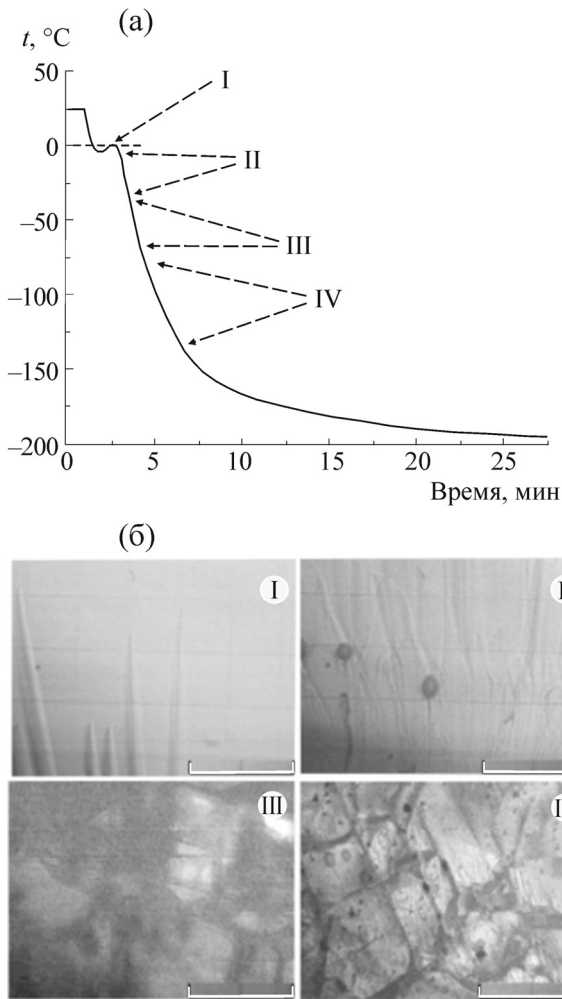


Рис. 2. Последовательность событий при замерзании дистиллированной воды. (а) – Температурная кривая процесса охлаждения. Цифрами обозначены характерные температурные диапазоны: I – начало замерзания раствора; II – раствор замерз, образовался сплошной массив льда; III – начинается процесс растрескивания, причем трещины имеют нерегулярный характер; IV – микрочастицы льда, сформировавшиеся из раствора 1,5 М ДМСО. Скорость охлаждения на линейном участке температурной кривой составляла $10 \pm 2^\circ\text{C}/\text{мин}$. (б) – Видеокадры, характеризующие соответствующие стадии замерзания раствора. Под соответствующими номерами показаны характерные особенности изображения льда для этих диапазонов температуры. Масштабная линейка – 500 мкм.

для исследования параметров сформированных микрочастиц льда использовали кадры видеоизображения при температуре жидкого азота (-196°C).

Начало растрескивания также зависело от состава раствора, температура начала растрескивания находилась в диапазоне $-30 - -170^\circ\text{C}$. При этом в присутствии криопротекторов и дополнительных компонентов криозащитной среды

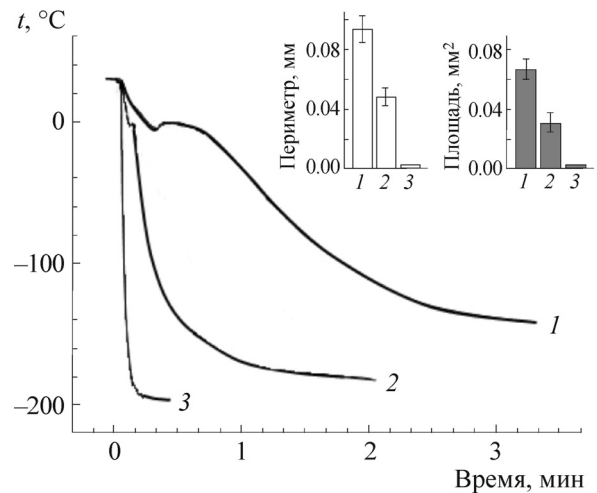


Рис. 3. Температурные кривые процесса охлаждения физиологического раствора для осетра с 10% ДМСО. Средняя скорость охлаждения на линейном участке кривой охлаждения: 1 – $2000^\circ\text{C}/\text{мин}$, 2 – $60^\circ\text{C}/\text{мин}$, 3 – $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. При скорости $2000^\circ\text{C}/\text{мин}$ происходило стеклование среды замораживания, отдельные частицы льда были очень маленькими. На врезке – зависимость периметра (светлые столбики) и площади (темные столбики) образовавшихся частиц льда (при -196°C), от скорости охлаждения образца.

в растворе температура начальной фазы процесса растрескивания льда снижалась, т.е. сформированный массив льда обладал большей степенью пластичности. Например, у дистиллированной воды температура, при которой начиналось растрескивание, в среднем составляла $-46 \pm 6^\circ\text{C}$ ($n = 10$), у физиологического раствора для осетровых рыб – $-63 \pm 7^\circ\text{C}$ ($n = 10$), у ФР с добавлением 1,5 М ДМСО – $-129 \pm 11^\circ\text{C}$ ($n = 7$), у ФР с 1,5 М ДМСО и 10% яичного желтка – $-156 \pm 9^\circ\text{C}$ ($n = 5$). Видно, что в присутствии криопротекторов и дополнительных компонентов криозащитного раствора эластичность замороженной среды значительно повышалась, возможно, вследствие увеличения доли аморфной (наиболее эластичной) фазы льда в общем объеме замороженной среды.

Дальнейшее охлаждение вплоть до температуры жидкого азота приводило к формированию микрочастиц льда.

Скорость охлаждения влияет на размеры и форму частиц, образующихся при термомеханическом растрескивании льда. Это видно на примере замораживания образцов физиологического раствора для осетра с 10% ДМСО (рис. 3). Видно, что при увеличении скорости охлаждения площадь и периметр микрочастиц льда значительно уменьшаются. Микрочастицы льда, формирующиеся при медленном охлаждении раствора ($10^\circ\text{C}/\text{мин}$), были значительно

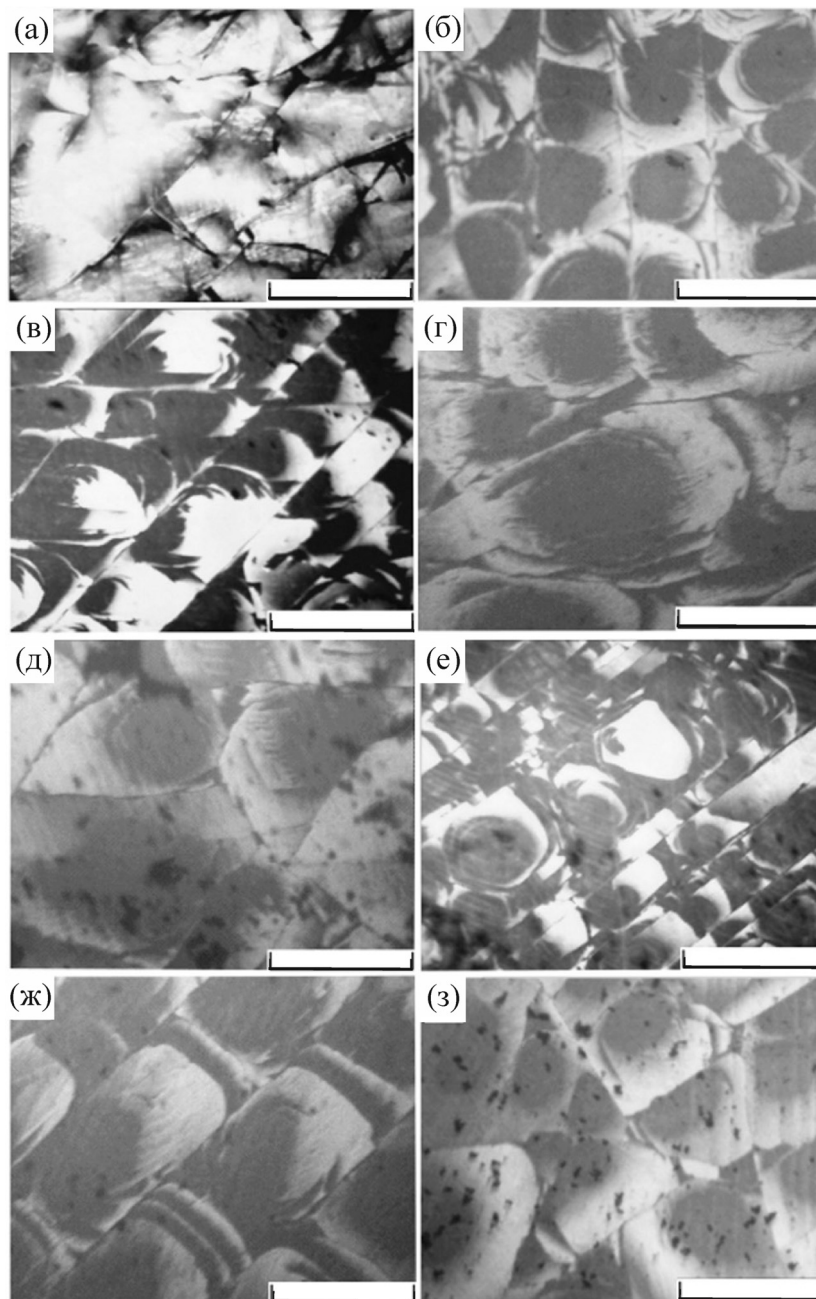


Рис. 4. Фотографии микрочастиц льда в замороженных модельных растворах при -196°C : (а) – дистиллированная вода; (б) – ДМСО (1,5 М); (в) – формамид (1 М); (г) – диметилформамид (1 М); (д) – таурин (0,1 М); (е) – этиленгликоль (1 М); (ж) – глицерин (1 М); (з) – среда для криоконсервации спермы осетра (физиологический раствор для осетра + 10% ДМСО + 10% яичного желтка). Масштабная линейка – 500 мкм.

больше по площади и периметру, чем при быстром ($60^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Следует отметить, что при очень высокой скорости охлаждения (около $2000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) растрескивание обычно не наблюдалось. Происходило стеклование среды.

На рис. 4 показаны фотографии сформированных микрочастиц льда исследуемых растворов (дистиллированная вода, ДМСО, формамид, диметилформамид, таурин, этиленгликоль,

глицерин, среда для криоконсервации спермы осетра). Данные вещества используют при криоконсервации живых объектов.

На фотографиях микрочастиц льда при -196°C видно, что:

– термомеханическое растрескивание льда, сформированного из дистиллированной воды, приводит к образованию остроугольных частиц разного размера (рис. 2б, 4а);

Размер и форма микрочастиц льда при -196°C

№ р-ра	Образец	Площадь, мм^2	Периметр, мм	Фактор формы	*n
1	Вода дистиллированная	$0,12 \pm 0,32$	$1,56 \pm 0,71$	$0,62 \pm 0,21$	223
2	ФР (0,14 М)	$0,10 \pm 0,02$	$1,27 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,01$	286
3	ФР + ДМСО (1 М)	$0,12 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,06$	$0,82 \pm 0,03$	80
4	ФР + ДМСО (1М) + яичный желток	$0,14 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,02$	39
5	Среда Хенкса	$0,146 \pm 0,014$	$1,62 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,02$	44
6	Среда Хенкса + липосомы (0,6%)	$0,10 \pm 0,006$	$1,21 \pm 0,04$	$0,824 \pm 0,006$	81
7	ДМСО (1 М)	$0,16 \pm 0,05$	$1,60 \pm 0,21$	$0,78 \pm 0,03$	16
8	ДМСО (1,5 М)	$0,080 \pm 0,018$	$1,10 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,01$	156
9	ДМСО (100%)	$0,040 \pm 0,002$	$0,72 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,02$	104
10	Формаид (1 М)	$0,09 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,05$	48
11	Формаид (2 М)	$0,13 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,08$	21
12	Таурин (0,1 М)	$0,040 \pm 0,002$	$0,77 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,04$	67
13	Таурин (0,2 М)	$0,030 \pm 0,002$	$0,63 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,05$	78
14	Таурин (0,5 М)	$0,020 \pm 0,001$	$0,60 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,02$	80
15	Этиленгликоль (1 М)	$0,15 \pm 0,02$	$1,47 \pm 0,06$	$0,86 \pm 0,05$	45
16	Глицерин (1,37 М)	$0,13 \pm 0,09$	$1,38 \pm 0,33$	$0,82 \pm 0,02$	92
17	Трегалоза (0,05 М)	$0,11 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,01$	82

Примечание. *n – количество измеренных микрочастиц льда.

– в присутствии криозащитных веществ характер микрочастиц льда резко меняется. Размер и форма частиц становятся более однородными, частицы приобретают округлую форму (рис. 4б–ж);

– в среде для криоконсервации спермиев осетра с добавлением яичного желтка также формировались подобные микрочастицы, однако, вероятно, за счет присутствия яичного желтка границы между микрочастицами сильно размыты, ввозможно, за счет образования аморфного льда (рис. 4з).

В таблице представлены основные геометрические параметры изученных растворов. Видно, что размеры и фактор формы образовавшихся частиц льда зависели от состава раствора.

Фактор формы является одним из универсальных параметров, с помощью которого можно сравнивать округлость микрочастицы льда в разных растворах, так как он не имеет прямой зависимости от условий получения этих частиц.

При сравнении фактора формы изучаемых растворов мы видим, что с увеличением концентрации растворенных веществ в растворе микрочастицы становятся более округлыми, фактор формы увеличивается и стремится к единице (таблица). Сравнивая растворы 1–3, можно сказать, что при добавлении солей физиологического рас-

творя в дистиллированную воду происходит увеличение F_f на 0,16. Такое же увеличение видно при измерении частиц льда в 1 М растворе ДМСО. Однако при замораживании раствора 3, который имеет в составе физиологический раствор и 1 М ДМСО, обнаружили, что увеличение фактора формы на каждый включенный в состав дополнительный компонент составляет 0,04. Такая же тенденция заметна при введении таурина (растворы 13–15) и ДМСО (растворы 8–10). Можно предположить, что зависимость увеличения фактора формы от концентрации имеет экспоненциальную форму и при увеличении концентрации раствора стремится к единице, т.е. к идеальной форме круга. Однако для криоконсервации живых клеток само по себе увеличение концентрации не может быть эффективным способом из-за высокой токсичности большинства используемых криопротекторов. Поэтому с целью повышения криозащитных свойств среды для замораживания биологического материала в состав среды часто вводят вещества, которые обладают стабилизирующим действием на мембрану. Таким веществом может быть яичный желток, бычий сывороточный альбумин, различные белки. Все эти вещества в растворенном состоянии способны влиять на процессы кристаллизации воды при замерзании. Кроме того, известно, что водорастворимые липиды в крио-

защитной среде также влияют на форму льда при замерзании криозащитного раствора [31].

При изучении влияния яичного желтка, липидов и аминокислот на формирование микрочастиц льда (растворы 4, 5 и 7) показано, что данные растворенные вещества приводят к образованию микрочастиц с близким по величине фактором формы (от 0,82 до 0,86), что может говорить о похожем механизме влияния данных веществ на процесс образования льда. Видно, что чем сложнее липидный и белковый состав растворенного вещества, тем выше фактор формы образующихся микрочастиц льда. Можно сделать предположение, что яичный желток, используемый как дополнительный компонент криозащитных сред, образует при замерзании эластичные области между жесткими участками льда, что уменьшает термомеханические напряжения в замороженной среде. Добавление яичного желтка позволяет получить более эффективный криозащитный раствор, вероятно, за счет его влияния на процесс образования и роста микрочастиц льда при криоконсервации биологических объектов.

В заключение можно сказать, что метод визуализации микрочастиц льда, а также дальнейший их анализ посредством фактора формы является показательным способом прогнозирования качественного влияния криопротекторов на живые клетки в процессе криоконсервации. Показано, что увеличение концентрации солевого раствора может увеличить прогнозируемую выживаемость клеток, а также что белково-липидный комплекс предпочтителен как дополнительный компонент криозащитных сред, так как позволяет снизить концентрацию солей (криопротекторов) в растворе и повысить выживаемость клеток в процессе замораживания–оттаивания.

Работы выполнены в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» по проекту «Разработка методов и технологий мониторинга, управления и сохранения биологического разнообразия водных экосистем южных регионов России» (соглашение № 14.604.21.0129 от 20.10.2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0129, № государственной регистрации 114111940059).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. M. Fahy, J. Saur, and J. R. Williams, *Cryobiology* **27**, 492 (1980).

2. G. M. Fahy, in *The Biophysics of Organ Preservation*, Ed. by D. E. Pegg and A. M. Karow, Jr. (Plenum Publishing Corp., New York, 1987), pp. 265–297.

3. C. Kroener and B. J. Luyet, *Biodynamica* **10** (201) 47 (1966).

4. M. J. Taylor, Y. C. Song, and K. G. M. Brockbank, in *Life in the Frozen State*, Ed. by B. J. Fuller, N. Lane, and E. E. Benson (CRC Press, New York, 2004), pp. 603–641.

5. T. Koop, B. Luo, A. Tsias, and T. Peter, *Nature (Lond.)*, **406**, 611 (2000).

6. А. Г. Стромберг и Д. П. Семченко, *Физическая химия* (Высш. шк., М., 1999).

7. D. E. Pegg, M. C. Wusteman, and S. Boylan, *Cryobiology* **34** (2), 183 (1997).

8. Н. И. Кошкин и М. Г. Ширкевич, *Справочник по элементарной физике*, 9-е изд. (Наука, М., 1982).

9. Y. Rabin and P. S. Steif, *ASME J. Appl. Mech.* **65** (2), 328 (1998).

10. Y. Rabin and P. S. Steif, *Int. J. Solids Struct.* **37**, 2363 (2000).

11. Y. Rabin, P. S. Steif, K. C. Hess, et al., *Cryobiology* **53**, 75 (2006).

12. E. Asahina, *Nature* **191**, 1263 (1961).

13. A. Baudot, L. Alger, and P. Boutron, *Cryobiology* **40**, 151 (2000).

14. A. Baudot, C. Cacela, M. L. Duarte, and R. Faustoc, *Cryobiology* **44**, 150 (2002).

15. A. Baudot and V. Odagescu, *Cryobiology* **48**, 283 (2004).

16. K. R. Diller, *J. Biomech. Eng.* **127**, 67 (2005).

17. J. M. Hey, P. M. Mehl, and D. R. MacFarlane, *J. Therm. Anal.* **49**, 991 (1997).

18. J. M. Hey and D. R. MacFarlane, *Cryobiology* **37**, 119 (1998).

19. H. Ishiguro and B. Rubinsky, *Cryobiology* **31**, 483 (1994).

20. H. Ishiguro, A. Kataori, and M. Nozawa, *Cryobiology* **59**, 410 (2009).

21. P. Mazur, I. L. Pinn, and F. W. Kleinhans, *Cryobiology* **55**, 158 (2007).

22. P. M. Mehl, *Cryobiology* **30**, 509 (1993).

23. B. Rubinsky and M. Ikeda, *Cryobiology* **22**, 55 (1985).

24. P. Mazur, *J. Gen. Physiol.* **47**, 347 (1963).

25. L. I. Kramarova, N. A. Ivlicheva, R. H. Ziganshin, et al., in *Living in a Seasonal World*, Ed. by T. Ruf, et al. (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2012), pp. 201–210.

26. Л. И. Цветкова, Н. Д. Пронина, О. Б. Докина и др., *Рыбное хозяйство*, № 4, 77 (2012).

27. Y. Rabin and P. S. Steif, in *Advances in Biopreservation*, Ed. by J. G. Baust and J. M. Baust (Taylor & Francis Group, 2007), pp. 359–379.

28. E. Burzawa-Gerard, B. F. Goncharov, A. Dumas, and Y. A. Fontaine, *Gen. Comp. Endocrinol.* **29** (4), 498 (1976).

29. Н. А. Ивличева, И. А. Чистопольский, Л. И. Крамарова и Э. Н. Гахова, *Биол. мембраны* **31** (5), 342 (2014).
30. C. Labbe, G. Maise, and R. Billard, in *Abstr. XXXIII Intern. Symp. on New Species for Mediterranean Aquaculture* (Alghero, 1998), pp. 97–110.
31. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Э. Н. Гахова и др., *Биофизика* **54** (5), 869 (2009).
32. E. Schmidt, *Math. Nachr.* **1**, 81 (1948).
33. А. В. Борода, Дис. ... канд. биол. наук (ИБМ ДВО РАН, 2010).
34. B. J. Fuller, *CryoLetters* **25** (6), 375 (2004).

Formation of Ice Microparticles in Cryoprotective Solutions

A.A. Andreev*, D.G. Sadikova*, N.A. Ivlicheva*, and A.V. Boroda**

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

***Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia*

The formation of ice microparticles in a thin layer (0.2 mm) of aqueous solutions of cryoprotective agents at temperatures reached to -196°C was studied. The shape and size of ice microparticles were determined by cryomicroscopy. At temperatures below 0°C the formation of pack ice was observed, further cooling caused ice cracking by virtue of the emergence of thermomechanical stresses, and the formation of microparticles. The shape and size of the particles depended on the composition of the frozen solution and the cooling rate. The components of cryoprotective solutions (cryoprotectants, egg yolk, sugars and lipids) significantly changed the shape and size of ice microparticles.

Key words: cryoprotective solutions, cryomicroscopy, ice microparticles, ice cracking