

УДК 577.3

## ВЛИЯНИЕ ГАЗОВ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ СТРУКТУРЫ ЛЬДА, ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ВОДЫ И КРИОЗАЩИТНЫХ РАСТВОРОВ: ОПТИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2021 г. А.В. Кобелев, Н.В. Шишова, С.В. Уграицкая, Л.В. Заломова, В.А. Яшин,  
Н.В. Пеньков, Е.Е. Фесенко (мл.)

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

*E-mail: eugeny.ef@gmail.com*

Поступила в редакцию 22.07.2021 г.

После доработки 27.07.2021 г.

Принята к публикации 29.07.2021 г.

С помощью оптической микроскопии исследовано влияние воздуха, гелия, аргона, ксенона и гексафторида серы на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании воды и ряда криозащитных растворов в температурном диапазоне от 0 до  $-50^{\circ}\text{C}$ . Показано, что кристаллизация капли воды объемом  $\approx 200$  мкл в атмосфере воздуха происходит с нарушением целостности структуры льда. В замороженных образцах наблюдается образование газовых микропузырьков диаметром до 250 мкм. Продувка над поверхностью капли воды аргона, ксенона или гексафторида серы перед замораживанием позволяет снизить максимальный размер микропузырьков до 100 мкм. Продувка гелия над поверхностью воды, растворов DMEM и «ЕвроКоллинз» позволяет полностью устранить или значительно уменьшить образование газовых микропузырьков в процессе кристаллизации. Для формируемого при этом массива льда характерна тенденция к снижению вероятности растрескивания при охлаждении до  $-50^{\circ}\text{C}$ , что может способствовать выживаемости биологического материала при консервации. Добавление криопротектора этиленгликоля в концентрации 1–10 об. % в раствор позволяет снизить или полностью предотвратить выделение микропузырьков газа при замораживании. Механизм, с помощью которого реализуется данный феномен, остается неясным. Добавление этиленгликоля в концентрации 10 об. % и более также предотвращает растрескивание льда при охлаждении до  $-50^{\circ}\text{C}$ .

*Ключевые слова: криоконсервация, кристаллы льда, этиленгликоль, инертные газы, гелий, микропузырьки, растрескивание.*

DOI: 10.31857/S0006302921050021

Методы криоконсервации (глубокого замораживания биообъектов) возникли в середине прошлого века [1], активно развивались и в настоящее время широко применяются в различных сферах – науке, медицине, сельском хозяйстве, биотехнологическом производстве. Выживаемость биологических объектов при глубоком замораживании зависит от физических процессов, происходящих в водных растворах в процессе замораживания и оттаивания. Состав растворов и применяемые криопротекторы оказывают влияние на зарождение и рост кристаллов льда, их форму, размер, на возможность стеклования растворов, температурное сжатие и расширение. Существенную роль в перечисленных процессах играют растворенные в жидкой среде газы. Считается, что некоторые газы, например ксенон или

гексафторид серы, способны повысить жизнеспособность биологического материала при криоконсервации [2–7]. В нашей лаборатории на модели клеточных культур были показаны криозащитные свойства гелия [8].

Газы растворяются в воде по «пустотному механизму», внедряясь в полости, образованные молекулами воды [9]. Во время кристаллизации водных растворов газы вытесняются из образующихся кристаллов льда в окружающий водный раствор, что вызывает нарастание концентрации газов в остаточном незамерзшем растворе. В итоге достигается пересыщение раствора газами, и они начинают выделяться из раствора, образуя микропузырьки [10, 11]. Если имеется односторонний фронт кристаллизации, то газы могут быть выдавлены из жидкости. Если же

фронт неравномерный (например, в случае помещенной в жидкий азот криопробирки с жидкостью), то газы окажутся в ловушке, образованной кристаллами льда на периферии объема жидкости. При затвердевании раствора микропузырьки газа создают неоднородности. Именно эти неоднородности служат местами наиболее вероятного образования трещин при дальнейшем охлаждении отвердевших растворов вследствие процессов температурного сжатия и расширения, т.е. температурных деформаций. Кроме того, наличие микропузырьков способствует увеличению температурных градиентов при охлаждении/разогреве материала [11]. В процессе замораживания суспензии животных клеток нуклеация кристаллов льда происходит вне клеток, и при дальнейшем замораживании клетки, как правило, отесняются растущими кристаллами и сосредотачиваются в остаточном незамерзшем растворе [12]. Следовательно, очаги возникновения микропузырьков будут находиться вблизи клеток и перечисленные негативные явления с большой вероятностью могут служить повреждающими факторами.

Ранее нами была высказана гипотеза, что снижение концентрации растворенных газов в биологическом материале может снизить количество неоднородностей в растворе при замораживании и повысить выживаемость криоконсервированных клеток [8]. Наиболее распространенный физический способ дегазации жидкостей — вакуумирование, но к живым клеткам и тканям млекопитающих подобный метод неприменим. Однако значительно снизить количество растворенных газов в системе с живыми объектами можно методом инкубации в атмосфере газа с низкой растворимостью. При инкубации суспензии клеток в атмосфере определенного состава газы, находящиеся в растворе, будут выходить из него по градиенту концентрации, а газ из газообразной фазы будет переходить в раствор в количестве, определяющемся коэффициентом растворимости. Чем меньше коэффициент растворимости такого газа в жидкости, тем меньше окажется общее количество газов, растворенных в жидкой фазе, в результате инкубации в его атмосфере.

Особенно интересен в этом отношении гелий. Это нетоксичный инертный газ, с низким коэффициентом растворимости в воде и водных растворах. Помимо низкой растворимости в воде, гелий, в отличие от большинства других газов, имеет сравнительно высокий коэффициент растворимости во льду. При одной и той же температуре его растворимость во льду выше, чем в воде [13]. Очевидно, что при образовании льда гелий, встраиваясь в кристаллическую решетку льда, не будет вытесняться в окружающий раствор и, следовательно, не будет образовывать микропузырьки.

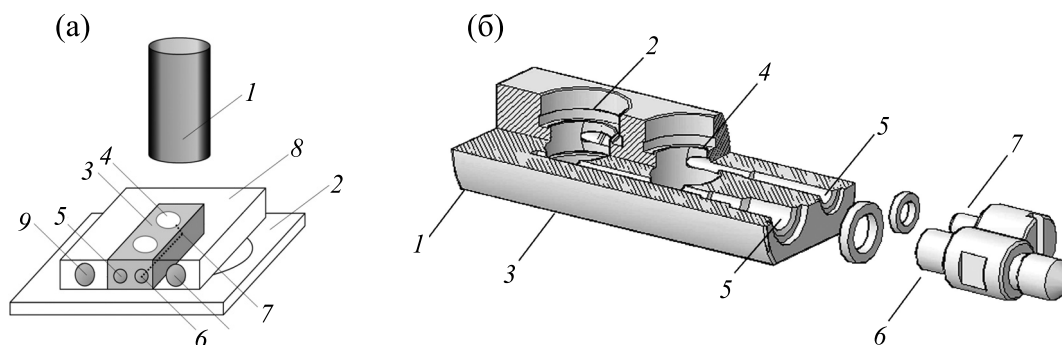
Целью настоящей работы являлось исследование влияния газовой атмосферы на замораживание воды и консервирующих растворов, в том числе содержащих классические криопротекторы (на примере этиленгликоля). Мы сравнивали процесс кристаллизации и структуру отвердевшей капли, замороженной в атмосфере гелия, аргона, ксенона, гексафторида серы и воздуха.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наиболее информативным методом наблюдения за различными процессами в реальном времени является оптическая микроскопия. В ряде работ оптическую микроскопию применяли для наблюдения за образованием и ростом кристаллов газовых гидратов [14–16]. В работе [17] нами отработана методика наблюдения за образованием и ростом кристаллов газовых гидратов в герметичной ячейке под давлением газа. Для изучения влияния инертных газов (гелий, аргон, ксенон) и гексафторида серы на структуру образующегося льда была использована аналогичная методика наблюдения за каплей жидкости в герметичной ячейке. Этот метод позволяет заменить газовый состав, окружающий каплю, на время, достаточное для газообмена в жидкости, и наблюдать за процессами в охлаждаемой капле в реальном времени с разрешением  $\sim(1-10)$  мкм.

Процесс образования льда исследовали в титановой кювете-барокамере (рис. 1) (далее по тексту — барокамера), установленной в поле зрения стереомикроскопа MZ16A (Leica, Германия). При исследовании капли применяли метод проходящего, нижнего и бокового освещения.

Внутри основного отсека барокамеры помещали каплю исследуемой жидкости объемом 250 мкл (диаметр капли  $\approx 12$  мм, высота (толщина)  $\approx 1.7$  мм). При комнатной температуре к барокамере подсоединяли пластиковый баллон, направленный 2 л исследуемого газа при атмосферном давлении. Предварительно для вытеснения атмосферных газов из внутреннего объема барокамеры ее продували 200 мл газа. Исследуемую жидкость выдерживали при комнатной температуре 1 ч, в течение которого каждые 2 мин подавали в барокамеру газ из баллона порциями по 50 мл. Излишки газа выходили через ослабленную заглушку, поэтому давление в камере не превышало атмосферное. Между газовой средой и жидкостью протекали процессы сорбции/десорбции газов. Растворенные в жидкой капле атмосферные газы диффундировали из жидкости в газовую среду и удалялись при продувке газа через камеру. Растворение инертного газа в воде происходило до достижения максимальной равновесной концентрации при данных значениях давления и температуры. Таким образом происходила смена состава газов, растворенных в капле



**Рис. 1.** (а) – Схема экспериментальной установки, используемой для изучения кристаллизации растворов в газовой атмосфере: 1 – объектив микроскопа с CCD-камерой, 2 – столик микроскопа, 3 – кювета-барокамера, 4 – смотровое окно, 5 – вход газа, 6 – выход газа и вход термопары, 7 – термопара, 8 – теплообменник, 9 – каналы для подключения охлаждающего термостата. (б) – Схема титановой кюветы-барокамеры: 1 – корпус; 2 – основной отсек, объем 1 мл, место установки верхнего смотрового окна; 3 – место установки нижнего смотрового окна; 4 – резервный отсек, объем 1 мл, место установки дополнительного верхнего смотрового окна; 5 – газовые каналы; 6 – входной штуцер; 7 – выходной штуцер с ниппелем.

жидкости. Перед охлаждением входной и выходной штуцеры затягивали, перекрывая ход газа, и далее газовую атмосферу не меняли. Скорость охлаждения капли в барокамере составляла  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Система была снабжена системой термостатирования, которая позволила проводить наблюдения при контролируемой температуре в интервале от  $0^{\circ}\text{C}$  до  $-50^{\circ}\text{C}$ . Кювету вставляли в П-образный теплообменник, охлаждающий ее с задней и боковых поверхностей. Теплообменник подключали к жидкостному криотермостату FT-311-80 (ЛОИП, Россия). В качестве хладагента использовали этиловый спирт. Температуру барокамеры контролировали при помощи цифрового термометра АТТ-2006 (ЗАО НПП «Эликс», Россия) с точностью  $0.1^{\circ}\text{C}$  (термопара ТМКн). Термопару вводили в корпус барокамеры через выходной газовый канал, ввод герметизировали. Датчик располагали над каплей, касаясь ее поверхности (виден на снимках, например, на рис. 4г). Чтобы атмосферная влага не конденсировалась на смотровом окне и не ухудшала изображение исследуемой системы, наблюдения проводили через тонкий слой этилового спирта, который наносили на внешнюю поверхность верхнего смотрового окна.

В качестве исследуемой жидкости использовали деионизированную воду высокой степени очистки с удельным сопротивлением  $17 \text{ МОм}\cdot\text{см}$ , (Sartorius Arium Pro, Weighing Technology GmbH, Германия), среду DMEM (Gibco, Life Technology Corp., Великобритания), консервирующий раствор «ЕвроКоллинз» ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –  $2.04 \text{ г/л}$ ,  $\text{KCl}$  –  $1.12 \text{ г/л}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  –  $7.3 \text{ г/л}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  –  $0.84 \text{ г/л}$ , глюкоза –  $34.96 \text{ г/л}$ ), раствор «ЕвроКоллинз без глюкозы», а также этиленгликоль (Sigma-Aldrich, США). Растворы исследовали под атмосферой

гелия, аргона, ксенона и гексафторида серы. В качестве контроля использовали атмосферный воздух.

При наблюдении за замораживанием воды и растворов фиксировали температуру льдообразования, сайты первичной нуклеации льда, наличие и рост микропузырьков газа, наличие и паттерн растрескивания криогидрата при дальнейшем охлаждении.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**1. Влияние газов на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании воды.** В первом эксперименте мы исследовали влияние аргона, ксенона, гексафторида серы, а также гелия на структуру массива льда, образующегося при замораживании исследуемой аликвоты воды. В качестве контроля наблюдали замораживание капли в атмосфере воздуха.

Известно, что вследствие преодоления энергетического барьера при охлаждении кристаллизация происходит не в точке равновесного кристаллообразования, а при более низкой температуре в переохлажденной жидкости. Нуклеация льда при охлаждении является стохастическим процессом и ее точная температура зависит от скорости охлаждения и наличия частиц-нуклеаторов в растворе или на границах капли [18]. В наших экспериментах нуклеация воды происходила в диапазоне  $-4 \sim -7^{\circ}\text{C}$  (см. табл. 1) и начиналась с быстрого образования тонкой корки льда на поверхности, после чего продолжалась в объеме капли.

Состав газовой фазы внутри барокамеры не оказывал влияния ни на температуру нуклеации кристаллов льда, ни на местоположение сайтов

**Таблица 1.** Характеристика замораживания воды в атмосфере различных газов

Атмосфера	Температура (°C) и характер нуклеации при скорости охлаждения 1°C/мин	Наличие газовых микропузырьков в поле капли	Температура (°C) начала процесса растрескивания и наличие трещин при температуре –50°C
Воздух $n = 8$	$-5.2 \pm 0.8$ Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–250 мкм по всему полю капли	$-32.0 \pm 5.0$ Наличие множества трещин в объеме капли
Гелий $n = 10$	$-5.0 \pm 1.0$ Первичная нуклеация на поверхности капли	Незначительное количество микропузырьков в поле капли или их полное отсутствие	$-33.4 \pm 4.0$ Наличие трещин в объеме капли
Аргон $n = 10$	$-4.8 \pm 0.3$ Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–100 мкм по всему полю капли	$-29.6 \pm 5.4$ Наличие множества трещин в объеме капли
Ксенон $n = 4$	$-5.3 \pm 1.5$ Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–100 мкм по всему полю капли	н/о Наличие множества трещин в объеме капли
Гексафторид серы $n = 10$	$-5.5 \pm 0.5$ Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–100 мкм по всему полю капли	$-31.7 \pm 6.4$ Наличие множества трещин в объеме капли

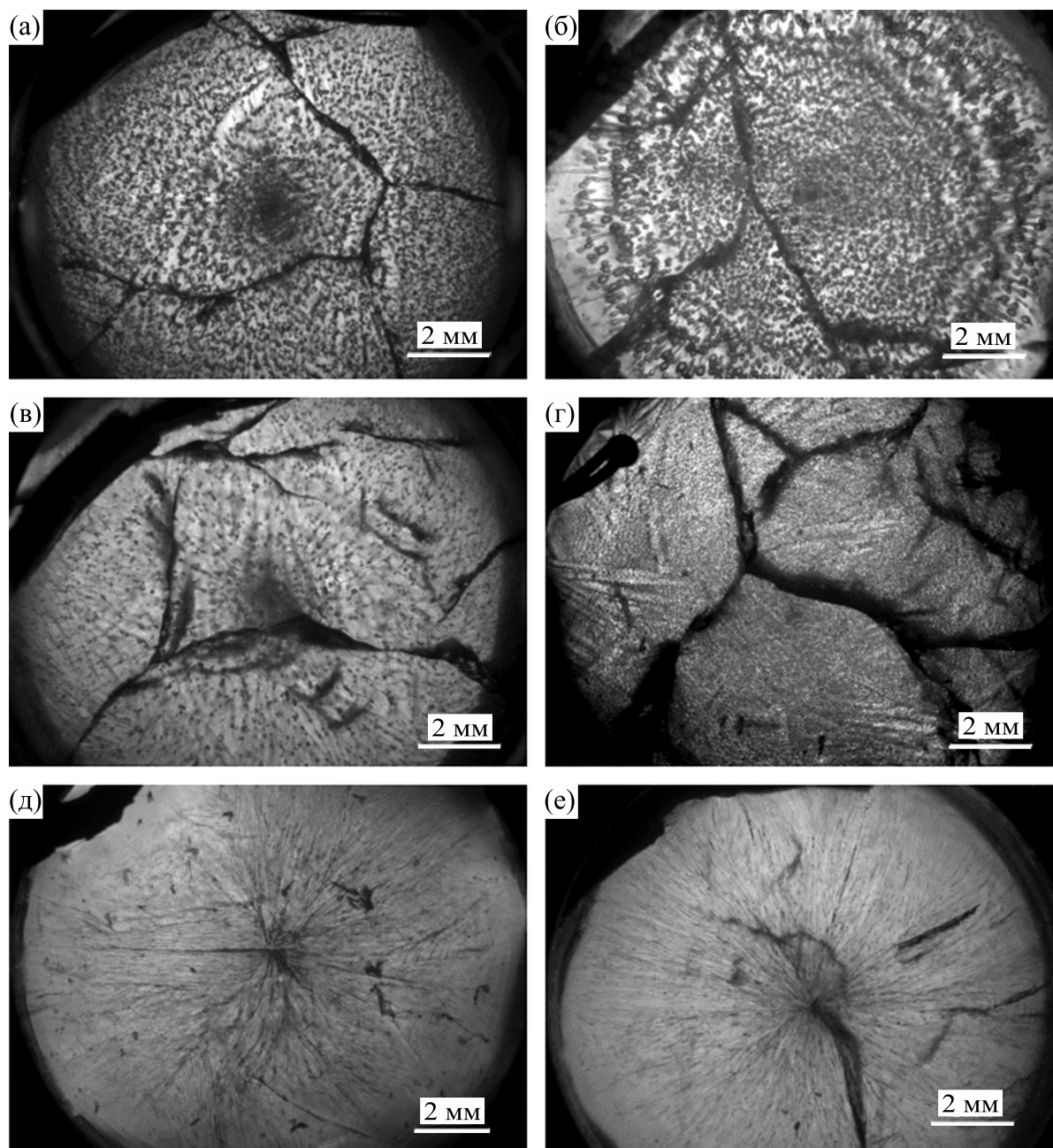
первичной нуклеации. Фронт кристаллизации продвигался симметрично от краев капли, где она наиболее интенсивно охлаждалась, к центру. Так как плотность льда меньше плотности жидкой воды, то по мере кристаллизации объем аликвоты воды увеличивался, за счет чего в центре отвердевшей капли образовывалось вздутие. Такая деформация формы капли сама по себе не вызывала растрескивания льда.

При дальнейшем охлаждении наблюдали растрескивание льда. Процесс растрескивания начался в диапазоне температур от  $-20$  до  $-40^\circ\text{C}$ . Мы не выявили какого-либо влияния газовой атмосферы на температуру появления первых трещин (рис. 2а–е). Что касается количества возникших трещин, то в атмосфере гелия мы фиксировали как образцы с выраженными явлениями растрескивания льда, так и практически полностью лишенные их (рис. 2д, е). С нашей точки зрения можно говорить о тенденции к снижению явления растрескивания в атмосфере гелия, что логично связать с сокращением газовой фазы в растворе. Однако чтобы эту тенденцию достоверно подтвердить, требуются эксперименты в составе большей выборки, а также модель подсчета выраженности процесса явления растрескивания, например, по общей протяженности трещин в поле образца.

При замораживании капли воды в атмосфере воздуха наблюдали возникновение многочисленных микропузырьков размером 5–250 мкм (рис. 3а).

Кристаллизация воды в атмосфере аргона, ксенона и гексафторида серы также происходила с образованием газовых микропузырьков размером 5–100 мкм (рис. 3б–г). При описанных методах наблюдения не было выявлено заметной разницы в количестве и размере микропузырьков газа при замораживании в атмосфере аргона, ксенона и гексафторида серы. Кристаллизация капли воды в атмосфере гелия резко отличалась, так как при этом либо не наблюдалось образования микропузырьков газа, либо они были малочисленны. Образовавшийся лед был прозрачным, с наличием единичных микропузырьков (рис. 3д, е).

Примечательно, что структура льда, замороженного в атмосфере аргона, ксенона, гексафторида серы и воздуха визуально выглядела сходной. При этом аргон, ксенон и гексафторид серы значительно отличаются по показателю растворимости в воде. Ксенон имеет сравнительно высокий коэффициент растворимости (5.0 ммоль/л при  $20^\circ\text{C}$ ), в то время как гексафторид серы слабо растворим в воде (0.29 ммоль/л) и по этому показателю близок к гелию (0.40 ммоль/л при  $20^\circ\text{C}$ , растворимость дана по работе [19]). Образцы

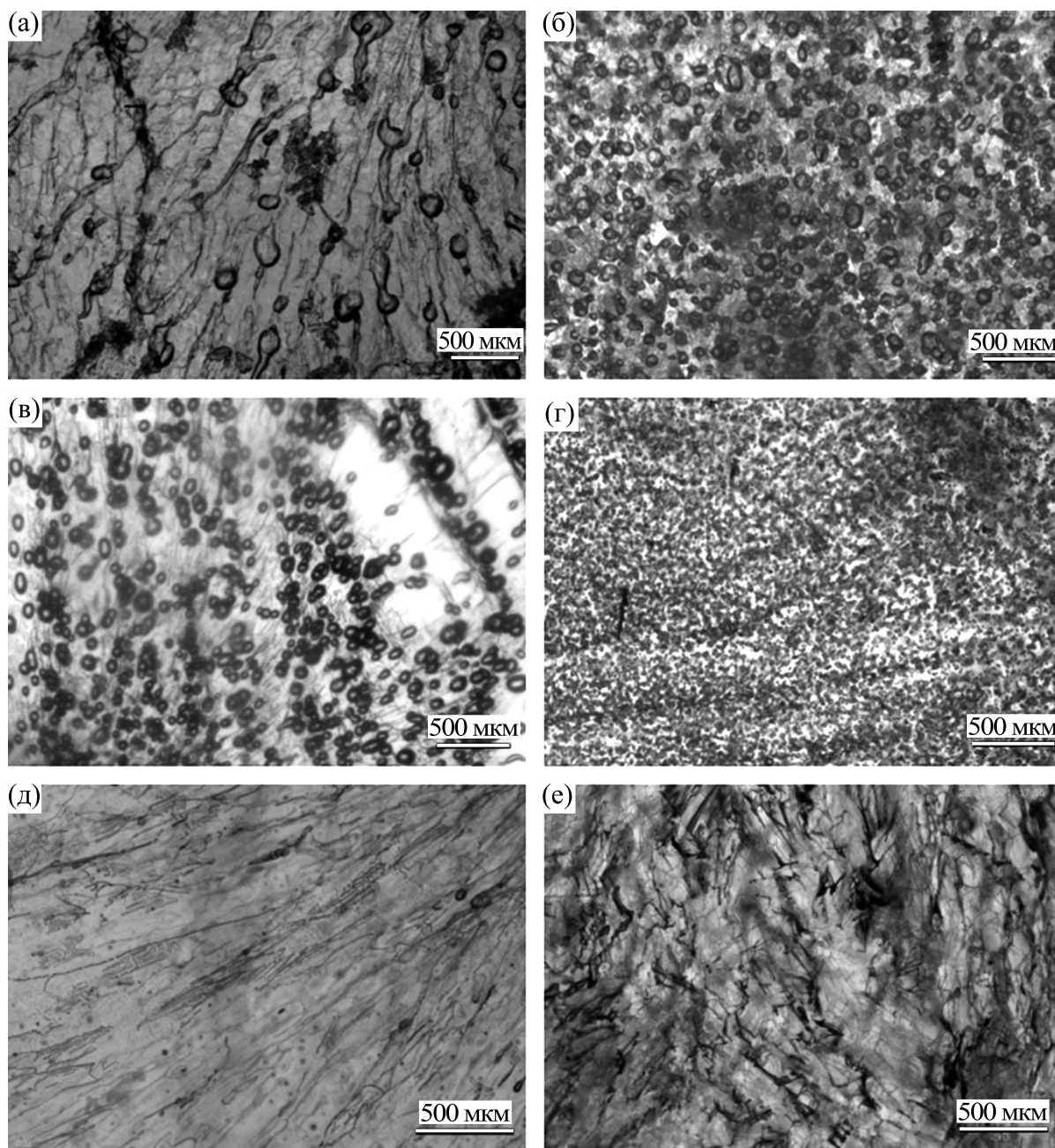


**Рис. 2.** Фотографические изображения явления растрескивания массива льда капли воды, замороженной в кювете-барокамере в условиях продувки воздухом (а), аргоном (б), ксеноном (в), гексафторидом серы (г) и гелием (д, е). Изображения получены при температуре  $-50^{\circ}\text{C}$ .

льда, полученные в атмосфере ксенона и гексафторида серы, мало отличались друг от друга, тогда как использование гелия привело к заметным изменениям. По-видимому, существенное влияние на возникновение нарушений структуры льда оказывает не только количество растворенного газа, но и его природа. Гелий (наряду с водородом и неоном) обладает аномально высоким коэффициентом растворимости во льду, обусловленным малым размером молекулы, позволяю-

щим ему встраиваться в кристаллическую решетку льда [20]. Вероятно, именно это свойство послужило причиной резкого отличия льда, замороженного в атмосфере гелия.

**2. Влияние гелия на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании растворов ДМЕМ, «ЕвроКоллинз» и «ЕвроКоллинз без глюкозы».** В связи выраженным действием гелия, предохраняющим массив льда от образования микропузырьков, замораживание растворов ре-

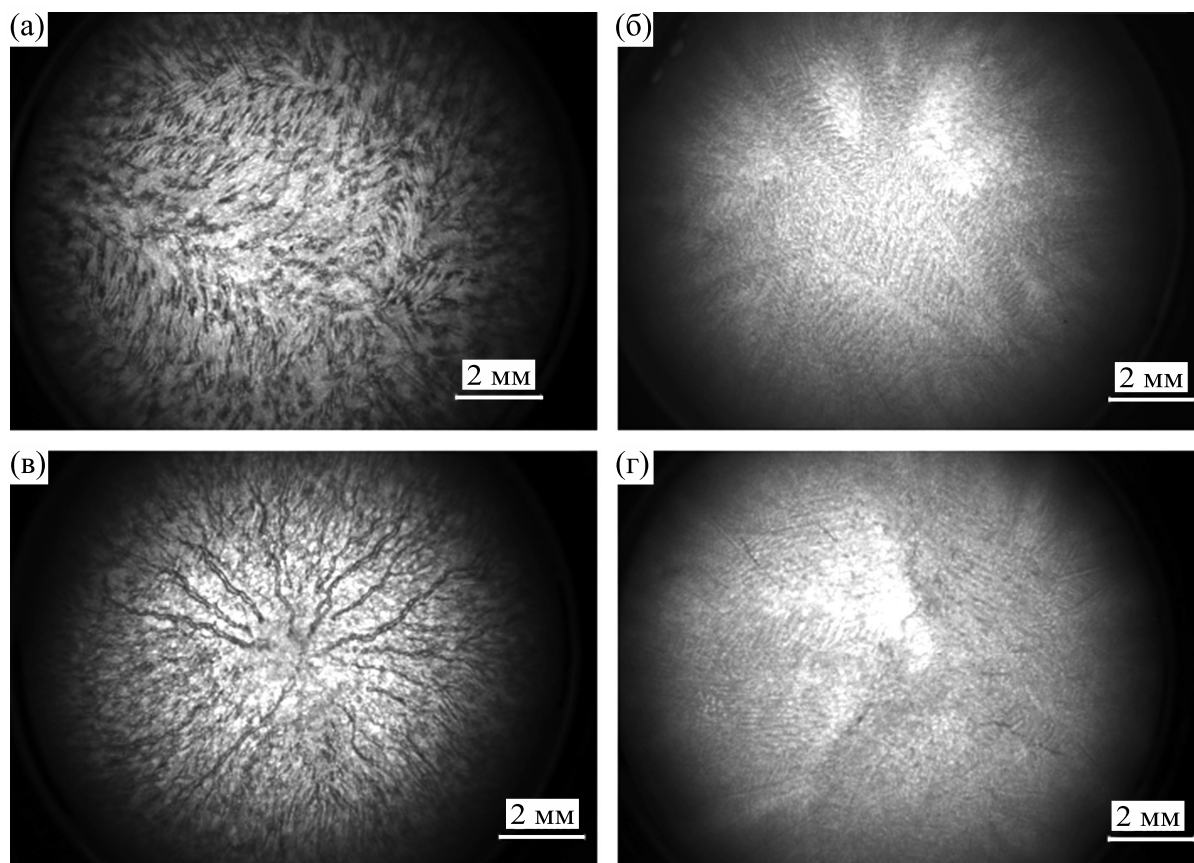


**Рис. 3.** Фотографические изображения структуры льда капли воды, замороженной в кювете-барокамере в условиях продувки воздухом (а), аргоном (б), ксеноном (в), гексафторидом серы (г) и гелием (д, е). Изображения получены при температуре  $-50^{\circ}\text{C}$ .

гистрировали в атмосфере воздуха и гелия. Среду DMEM часто используют для консервации линий эукариотических клеток, добавляя в нее стандартные криопротекторы. Раствор «Евро-Коллинз» относится к первому поколению консервирующих растворов для гипотермического хранения органов. Консервирующие растворы в будущем имеют шанс войти в состав криозащитных растворов для криоконсервации органов, когда такая технология будет разработана.

В процессе медленного замораживания исследуемых растворов часть воды кристаллизуется в виде чистого льда. В оставшихся незамерзшими областях концентрируются соли и прочие вещества. Эти области отвердевают в виде криогидрата при более низкой температуре, чем водный лед.

При замораживании DMEM (рис. 4а) и «Евро-Коллинз» в атмосфере воздуха образование криогидрата сопровождалось выделением микропузырь-



**Рис. 4.** Фотографические изображения массива льда растворов DMEM (а, б) и «ЕвроКоллинз без глюкозы» (в, г), замороженных в кювете-барокамере в атмосфере воздуха (а, в) и гелия (б, г). Изображения получены при температуре  $-12^{\circ}\text{C}$ .

ков растворенных газов. Располагаясь между кристаллитами, микропузырьки вызывали появление микротрещин и разломов в массиве льда. Первые очаги трещин появлялись при температуре около  $-13^{\circ}\text{C}$  через 1–2 мин после начала кристаллизации. Из каждого очага формировалось несколько разломов длиной до 200 мкм и шириной 10–50 мкм. Через 2–5 мин микротрещины распространялись по всей видимой поверхности замороженной капли. Кристаллизация раствора «ЕвроКоллинз без глюкозы» (рис. 4в) несколько отличалась: скопления газовых микропузырьков, сливаясь, образовывали протяженные полости длиной 2–5 мм, в последующем формирующие трещины.

Различие в структуре криогидрата, образованного раствором «ЕвроКоллинз без глюкозы» и остальными растворами, можно объяснить тем, что последний содержит исключительно неорганические соли, в то время как остальные растворы помимо солей содержат сахара либо аминокислоты. Как сахара, так и большинство аминокислот обладают криозащитными свойствами и

оказывают существенное влияние на структуру замороженных растворов [21]. Добавление этих веществ повышает вязкость жидкости и способствует стеклованию криогидрата. Возникающие аморфные структуры обладают одновременно повышенной эластичностью и более высоким коэффициентом температурного сжатия по сравнению с кристаллами льда, что приводит к возникновению термомеханических напряжений при дальнейшем охлаждении [22,23].

Продувка гелия над растворами DMEM и «ЕвроКоллинз» (стандартным и без глюкозы) непосредственно перед замораживанием в подавляющем большинстве экспериментов позволила предохранить образующийся лед от возникновения газовых полостей или отдельных микропузырьков (рис. 4б, г). В серии экспериментов наблюдения за образовавшимся льдом проводили в течение 1 ч при  $-50^{\circ}\text{C}$ . За это время образование микронеоднородностей во льду не наблюдалось.

**3. Влияние этиленгликоля на целостность структуры льда и поведение газовой фазы при заморажи-**

**Таблица 2.** Характеристика замораживания растворов этиленгликоля до  $-50^{\circ}\text{C}$ 

Раствор	Температура ( $^{\circ}\text{C}$ ) и характер нуклеации при скорости охлаждения $1^{\circ}/\text{мин}$	Наличие микропузырьков в поле капли, а также характер растрескивания льда и криогидрата при охлаждении
Вода + этиленгликоль (1%)	$-9.5 \pm 1.3$ Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки отсутствуют. Наличие микротрещин ( $10-50 \times 200$ мкм) после кристаллизации объема капли
Вода + этиленгликоль (10%)	$-11.0 \pm 1.1$ Первичная нуклеация в объеме капли; образуются дендритоподобные кристаллы	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют
Вода + этиленгликоль (45%)	$-41.6 \pm 3.6$ Первичная нуклеация на стенках отсека или вблизи них; образуется лед в виде массива тонкой слоистой структуры	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют
DMEM + этиленгликоль (10%)	$-11.0 \pm 1.6$ Первичная нуклеация в объеме капли; образуются дендритоподобные кристаллы	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют
DMEM + этиленгликоль (45%)	$-41.0 \pm 3.4$ Первичная нуклеация на стенках отсека или вблизи них; образуется лед в виде массива тонкой слоистой структуры	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют

Примечание. Для всех растворов  $n = 4$ .

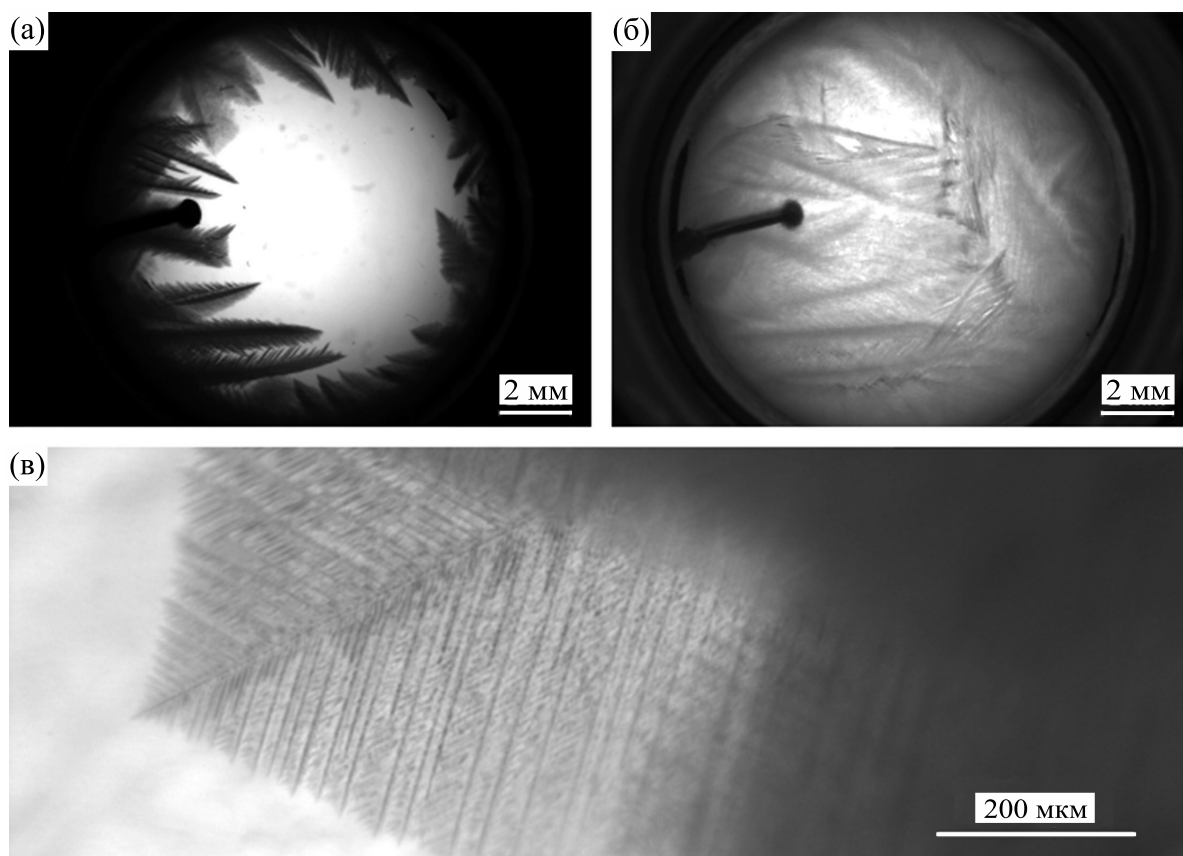
**вании.** На следующем этапе мы исследовали влияние криопротектора этиленгликоля на структуру твердой фазы при замораживании в атмосфере воздуха. Для этого мы замораживали ряд растворов этиленгликоля разной концентрации до температуры  $-50^{\circ}\text{C}$  (см. табл. 2).

Замораживание водного раствора этиленгликоля низкой концентрации (1 об. %) имело как сходства, так и отличия от кристаллизации чистой воды. После образования поверхностной корки льда объем жидкости кристаллизовался симметрично от краев к центру. Даже такое незначительное содержание криопротектора предотвратило образование видимых газовых микропузырьков. Однако его оказалось недостаточно для предохранения массива льда от возникновения микротрещин при дальнейшем охлаждении. Неясным остается механизм, с помощью которого реализовался феномен отсутствия видимой газовой фазы при отвердевании раствора, поскольку снижением коэффициента растворимости газов в системе «вода—этиленгликоль» при таком содержании этиленгликоля можно пренебречь.

Следует отметить, что полное отвердевание водных растворов этиленгликоля происходит при температуре ниже  $-75^{\circ}\text{C}$ , поэтому в наших экспериментах полное отвердевание раствора не происходило.

С увеличением содержания криопротектора до 10 об. % изменился характер замораживания растворов. Образование твердой фазы в растворах с 10 об. % этиленгликоля начиналось в объеме жидкости без возникновения поверхностного льда. Первые дендритоподобные кристаллы появлялись на боковой поверхности отсека барокамеры (рис. 5а). Микропузырьки или трещины в твердой фазе отсутствовали (рис. 5б). Дальнейший рост содержания этиленгликоля вызвал снижение температуры кристаллизации переохлажденной капли до  $-40^{\circ}\text{C}$ . Характер кристаллизации в растворах с 45 об. % этиленгликоля отличался от кристаллизации более разбавленных растворов. Образование твердой фазы начиналось на стенках отсека или вблизи них. Твердая фаза образовывалась в виде крупного массива, который имел слоистую структуру, образованную тонкими плоскими дендритами (рис. 5в).





**Рис. 5.** Фотографические изображения капель 10%-го (а, б) и 45%-го (в) водного раствора этиленгликоля, охлаждаемых в кювете-барокамере в атмосфере воздуха. (а) – Появление первых дендритоподобных кристаллов льда при температуре  $-7^{\circ}\text{C}$ ; (б) – отвердевший 10%-й раствор при температуре  $-15^{\circ}\text{C}$ ; (в) – структура дендритов, образованных в процессе кристаллизации 45%-го раствора этиленгликоля; изображение получено при температуре  $-45^{\circ}\text{C}$ .

Массив имел однородное строение без трещин и включений микропузырьков газа или жидкости. В серии наблюдений в течение 1 ч с охлаждением до  $-50^{\circ}\text{C}$  целостность массива сохранялась неизменной.

Известно, что крипротекторы оказывают существенное влияние на структуру замороженных водных растворов. Введение крипротекторов в раствор снижает соотношение кристаллического льда относительно остеклованного криогидрата в отвердевших растворах [24, 25], изменяет морфологию льда [21, 26], в отдельных случаях может менять тип образующихся кристаллов льда, способствуя образованию метастабильного кубического льда вместо гексагонального даже при умеренных скоростях охлаждения [27]. Крипротекторы также повышают эластичность остеклованного криогидрата [21]. Наше исследование подтверждает сильное влияние этиленгликоля на структуру отвердевшего раствора. При этом газовая составляющая оказывает тем меньшее влия-

ние на структуру криогидрата, чем выше содержание крипротектора.

Уже 1 об. % этиленгликоля предотвращает выделение газа в виде наблюдаемых в световой микроскоп микропузырьков. Однако применяемые нами методы исследования не позволяют с уверенностью утверждать об отсутствии наноразмерных пузырьков, не фиксируемых световым микроскопом. Более высокие концентрации этиленгликоля предотвратили как образование видимых микропузырьков, так и растрескивание криогидрата при охлаждении до  $-50^{\circ}\text{C}$ . В то же время нельзя исключить, что растрескивание будет происходить в более низкой температурной зоне, как это показано для некоторых витрифицирующих растворов с крипротекторами [28], так как применяемая нами система не позволяла проводить наблюдения при более низких температурах.

## ВЫВОДЫ

1. Кристаллизация капли воды (объем  $\approx 200$  мкл, диаметр  $\approx 12$  мм; высота  $\approx 1.7$  мм) в атмосфере воздуха происходит с нарушением целостности структуры льда. В замороженных образцах наблюдается образование газовых микропузырьков диаметром до 250 мкм. Продувка над поверхностью капли воды аргона, ксенона или гексафторида серы перед замораживанием позволяет снизить максимальный размер микропузырьков до 100 мкм.

2. Продувка гелия над поверхностью воды, растворов ДМЕМ и «ЕвроКоллинз» перед замораживанием позволяет устранить или значительно уменьшить образование газовых микропузырьков в процессе кристаллизации. Для формируемого при этом массива льда характерна тенденция к снижению вероятности растрескивания при охлаждении до  $-50^\circ\text{C}$ , что может способствовать выживаемости биологического материала при консервации. Данный феномен позволяет объяснить механизм криозащитного эффекта гелия, отмеченного при замораживании некоторых клеточных линий млекопитающих [8].

3. Добавление в раствор криопротектора — этиленгликоля — в концентрации 1–10 об. % позволяет снизить или полностью предотвратить выделение газов в виде микропузырьков при замораживании. Механизм, с помощью которого реализуется данный феномен, остается неясным. Добавление этиленгликоля в концентрации 10 об. % и более предотвращает растрескивание растворов при охлаждении до  $-50^\circ\text{C}$ .

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №АААА-А20-120101390069-4) (блоки 2 и 3 раздела «Результаты»), а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90187 (блок 1 раздела «Результаты»).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Polge, A. U. Smith, and A. S. Parkes, *Nature* **164**, 666 (1949).
2. S. Sheleg, H. Nixon, B. L. Cohen, et al., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **1** (5), 440 (2008).
3. S. V. Sheleg, H. L. Nixon, S. A. Svarovsky, and B. Cohen, Patent US8124329B2 (2012).
4. P. Shannon, *J. Dairy Sci.* **48**, 1357 (1965).
5. P. Shannon, *N. Z. Dairy Board.* **47**, 16 (1971).
6. А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. И. Зверева и др., в сб. *Материалы III межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии — практическому здравоохранению»* (Екатеринбург, 2014), сс. 78–83.
7. А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. И. Зверева и др., *Вестн. Урал. мед. академ. науки* **5**, 98 (2014).
8. С. В. Уграицкая, Н. В. Шишова, Е. Л. Гагаринский и др., *Биофизика* **63** (3), 510 (2018).
9. М. Н. Буслаева и О. Я. Самойлов, *Журн. структурной химии* **4** (4), 502 (1963).
10. S. S. Bari and J. Hallett, *J. Glaciol.* **13** (69), 489 (1974).
11. G. Kletetschka and J. Hrubá, *BioRes. Open Access* **4** (1), 209 (2015).
12. G. J. Morris, E. Acton, B. J. Murray, et al., *Cryobiology* **64**, 71 (2012).
13. В. И. Косяков, В. А. Шестаков, *Ж. физ. химии* **76** (5), 815 (2002).
14. E. A. Smelik and H. E. King Jr., *Amer. Mineralogist* **82**, 88 (1997).
15. S. Takeya, T. Uchida, J. Nagao, et al., *Chem. Eng. Sci.* **60** (5), 1383 (2005).
16. H. Shimizu, S. Hori, T. Kume, et al., *Chem. Phys. Lett.* **368**, 132 (2003).
17. A. Kobelev, V. Yashin, N. Penkov, et al., *Crystals* **9** (4), 215 (2019).
18. T. Koop and B. Zobrist, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11** (46), 10839 (2009).
19. А. Ю. Намиот, *Растворимость газов в воде. Справочное пособие* (Недра, М., 1991).
20. В. И. Косяков и В. А. Шестаков, *Журн. физ. химии* **76** (5), 815 (2002).
21. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова и Н. А. Ивличева, *Биофизика* **62** (2), 213 (2017).
22. P. S. Steif, M. C. Palastro, and Y. Rabin, *Med. Eng. Phys.* **29** (6), 661 (2007).
23. D. P. Eisenberg, P. S. Steif, and Y. Rabin, *Cryogenics (Guildf)* **64**, 86 (2014).
24. G. M. Fahy, *Cryobiology* **17** (4), 371 (1980).
25. S. Zhang, X. Yu, Z. Chen, et al., *Cryobiology* **66** (2), 186 (2013).
26. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Э. Н. Гахова и др., *Биофизика* **54** (5), 869 (2009).
27. P. Boutron, P. Mehl, A. Kaufmann, et al., *Cryobiology* **23** (5), 453 (1986).
28. Y. Rabin, P. Steif, K. Hess, et al., *Cryobiology* **53** (1), 75 (2006).

## **Influence of Gases on the Structural Integrity of Ice Formed During the Freezing of Water and Cryoprotective Solutions: an Optical-Microscopic Study**

**A.V. Kobelev, N.V. Shishova, S.V. Ugraitzkaya, L.V. Zalomova, V.A. Yashin,  
N.V. Penkov, and E.E. Fesenko (Jr.)**

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

Using optical microscopy, the influence of air, helium, argon, xenon and sulfur hexafluoride on the integrity of the ice, formed during the freezing of water and a number of cryoprotective solutions in the temperature range from 0 to  $-50^{\circ}\text{C}$ , was investigated. It is shown that crystallization of a water droplet with a volume of  $\approx 200\ \mu\text{l}$  in the ambient air leads to a change in the structural integrity of ice. In frozen samples, the formation of gas microbubbles up to  $250\ \mu\text{m}$  in diameter is observed. The process of blowing with argon, xenon, or sulfur hexafluoride over the surface of a water droplet before freezing gives the possibility to decrease the maximum size of microbubbles to  $100\ \mu\text{m}$ . The helium blowing over the surface of water, DMEM and Euro-Collins solutions can completely eliminate or significantly reduce the formation of gas microbubbles during crystallization. As a result, there is a tendency of the ice mass formed to become more resistant to cracking when the temperatures down to  $-50^{\circ}\text{C}$ . This effect may contribute to survival of the biological material following cryopreservation. Addition of a cryoprotectant ethylene glycol at a concentration of 1–10 vol. % to the solution reduces or completely prevents the release of gas microbubbles during freezing. The mechanism underlying this phenomenon remains unclear. Also, addition of ethylene glycol at a concentration of 10 vol. % or more keeps ice from cracking when cooled to  $-50^{\circ}\text{C}$ .

*Keywords: cryopreservation, ice crystals, ethylene glycol, inert gases, helium, microbubbles, cracking*