Probl Cryobiol Cryomed 2022; 32(1):003–013
https://doi.org/10.15407/cryo32.01.013

оглядова стаття **review article**

УДК 57.086.3:537.533.33

М.В. Рєпін[1]*, Л.М. Марченко[1], Т.П. Говоруха[1], А.М. Гольцев[1,2]

Можливості електронної мікроскопії у вирішенні завдань кріобіології. Ретроспективний аналіз

UDC 57.086.3:537.533.33

N.V. Repin[1] *, L.M. Marchenko[1], T.P. Govorukha[1], A.M. Goltsev[1,2]

Opportunities of Electron Microscopy When Solving Cryobiological Tasks. Retrospective Analysis

Реферат: У роботі представлено історію розвитку і використання низькотемпературних електронно-мікроскопічних методів заморожування-сколювання, заморожування-заміщення та інших в кріобіологічних дослідженнях в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Продемонстровано можливості даних методів у вивченні процесів кристалоутворення в розчинах кріопротекторів, клітинних суспензіях, тканинах за різних умов заморожування. Наведено окремі результати аналізу ультраструктурних змін у біологічних системах різного рівня організації, на різних етапах онтогенезу, під дією охолодження в широкому діапазоні температур (від 37 до –196°С). Застосування високороздільного електронно-мікроскопічного методу у поєднанні з допоміжним технічним устаткуванням і методичними прийомами дозволило отримати важливі для кріобіології фундаментальні результати щодо формування та локалізації кристалів льоду у внутрішньоклітинному просторі, температурозалежного перерозподілу трансмембранних білків, зміни ультраструктури еритроцитів та їх мембран у процесі гіпотермічного зберігання.

Ключові слова: електронна мікроскопія, заморожування-сколювання, заморожування-заміщення, кріофіксація, кристалоутворення, еритроцити, мембрана.

Abstract: The history of the development and use of low-temperature electron microscopic methods of freeze-fracture, freeze-substitution and others in cryobiological research at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine is presented in this article. These methods' possibilities in studying the processes of crystal formation in cryoprotectant solutions, cell suspensions, and tissues under various freezing conditions are demonstrated. Some results of the analysis of ultrastructural changes in biological systems of various organization levels, at different stages of ontogenesis, under the influence of cooling in a wide temperature range (from 37 to –196°C) are presented. The use of a high resolution electron microscopic method in combination with an accessory technical equipment and some methodological techniques allowed to obtain fundamental results important for cryobiology on ice crystals formation and localization in the intracellular volume, the temperature-dependent transmembrane proteins redistribution, changes in the ultrastructure of erythrocytes and their membranes during hypothermic storage.

Key words: electron microscopy, freezing-fracture, freeze-substitution, cryofixation, crystal formation, erythrocytes, membrane.

Важлива роль у становленні кріобіології як науки, вивченні механізмів кріопошкодження біооб'єктів належить електронній мікроскопії. Розвиток і вдосконалення електронно-мікроскопічної техніки значною мірою визначається завданнями, які вирішують науковці, а також розробленням нових методів підготовки та аналізу біологічних об'єктів [23, 25]. Підтвердженням цьому стали успіхи в галузі фундаментальних досліджень, досягнуті завдяки впровадженню методу кріоелектронної мікроскопії. Багато в чому вони пов'язані з розробкою і модифікацією методу кріофіксації, який дозволяє отримати тон-

Electron microscopy plays a crucial role in the development of cryobiology as a science and in studying the mechanisms of cryoinjury of biological specimens. The development and improvement of electron microscopy technique is largely determined by the tasks to be solved by scientists, as well as the development of new methods of managing and analysis of biological objects [7, 12]. This has been evidenced by the progress made in the field of basic research through the introduction of cryo-electron microscopy. They are mainly related to the development and modification of the cryofixation method, which allows the obtaining of a

[1] Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків
[2] ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини» НАН України, АМН України та МОЗ України

[1] Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
[2] Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences of Ukraine and Ministry of Health of Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: 1nvrepin@gmail.com

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.:+380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: 1nvrepin@gmail.com

Надійшла 13.03.2020
Прийнята до друку 14.12.2021

Received 13, March, 2020
Accepted 14, December, 2021

© 2022 N.V. Repin, *et al*. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

кий аморфний вітрифікований шар льоду, що містить біомакромолекули практично в їхньому природному середовищі. Поєднання методу підготовки біооб'єктів, високороздільної електронної мікроскопії та комп'ютерного аналізу зображень із 3D-моделюванням дозволило зробити ряд важливих наукових відкриттів при дослідженні структури біомолекул, вірусів та інших біологічних мікрооб'єктів [2, 19].

Переважна більшість процедур, пов'язаних із заморожуванням біологічного матеріалу, викликають кристалоутворення. У зв'язку з цим одними із першочергових завдань кріобіології є вдосконалення технології кріоконсервування для мінімізації об'єму кристалічної фази, управління процесами кристалоутворення, а також вивчення механізму взаємодії кристалів льоду з біологічними об'єктами.

У 70–80-ті роки минулого століття такі відомі вчені як E. Asahina J. Farrant, S. Fujikawa, A.P. MacKenzie, T. Nei, A. Staehelin та ін. виконали значну кількість робіт, пов'язаних із дослідженням кристалоутворення за допомогою електронно-мікроскопічних методів заморожування-сколювання, заморожування-заміщення, заморожування-висушування, що стало вагомим внеском у кріобіологію [18, 22, 24, 28, 29, 33].

В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) електронна мікроскопія знайшла широке застосування і використовується з перших років його заснування (1972 р.). При цьому прийняті в світовій практиці електронно-мікроскопічні методи підготовки біологічних об'єктів, які використовують хімічну фіксацію, не завжди забезпечують вирішення поставлених завдань [32]. Це спонукало науковців до розроблення нових методичних підходів, пов'язаних із дією холоду на біологічні об'єкти, пошуку оптимальних режимів їх охолодження та аналізу процесів кристалоутворення. У 70–80-ті роки співробітники інституту та дослідного конструкторського бюро при ІПКіК НАН України спільно з фахівцями заводу електронних мікроскопів «SELMI», (м. Суми, Україна) розробили і модифікували прилади, які на той час за своїми технічними можливостями істотно не поступалися зразкам зарубіжних фірм і дозволяли отримувати зображення з високою роздільною здатністю, а також проводити морфометричний аналіз ультраструктури клітин та їхніх мембран [10, 12].

Одним із найбільш інформативних низькотемпературних методів електронної мікроскопії є заморожування-сколювання, який засновано на

thin amorphous vitrified layer of ice containing biomacromolecules almost in their natural environment. The combination of biological sample preparation, high-resolution electron microscopy and computer image analysis with 3D modeling has made a number of important scientific discoveries when investigating the structure of biomolecules, viruses and other biological microobjects [4, 9].

The vast majority of procedures involving the freezing of biological material causes crystal formation. Therefore, one of the priority tasks of cryobiology is to improve cryopreservation technique to minimize the crystalline phase volume, to control the crystal formation, as well as to study the mechanism of interaction of ice crystals with biological objects.

In the 70–80s of the last century, such famous scientists as E. Asahina J. Farrant, S. Fujikawa, A.P. MacKenzie, T. Nei, A. Staehelin, *et al.*, performed numerous studies related to the examining the crystal formation using electron microscopy techniques of freeze-fracture, freeze-substitution, freezing drying, which have greatly contributed to cryobiology [2, 6, 8, 18, 20, 30].

Electron microscopy has been widely used at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (IPC&C) and has been exploited since the first years of its foundation (1972). At the same time, the electron microscopic methods of preparing the biological specimens that use chemical fixation, accepted in the world practice, did not always solve the tasks set [29]. This prompted scientists to develop new methodological approaches related to the effects of cold on biological objects, finding the optimal modes of their cooling and analysis of crystal formation. In the 70s and 80s, the IPC&C and its Special Constructing and Designing Bureau staff jointly with specialists from the electron microscope plant SELMI (Sumy, Ukraine) developed and modified devices, which at that time were compatible with those of foreign companies and made it possible to obtain the images with high resolution, as well as to perform morphometric analysis of the ultrastructure of cells and their membranes [22, 26].

One of the most informative low-temperature methods of electron microscopy is freeze-fracture, which is based on the physical method of fixing the bioobject, *i. e.* cryofixation state, enabling in hundreds of thousands of seconds to freeze the sample to nitrogen temperatures [27]. This approach proved to be effective for fixing and studying transient processes in cells, their membranes, as well as for the dynamics of extracellular and intracellular crystal formation at different stages of low-temperature

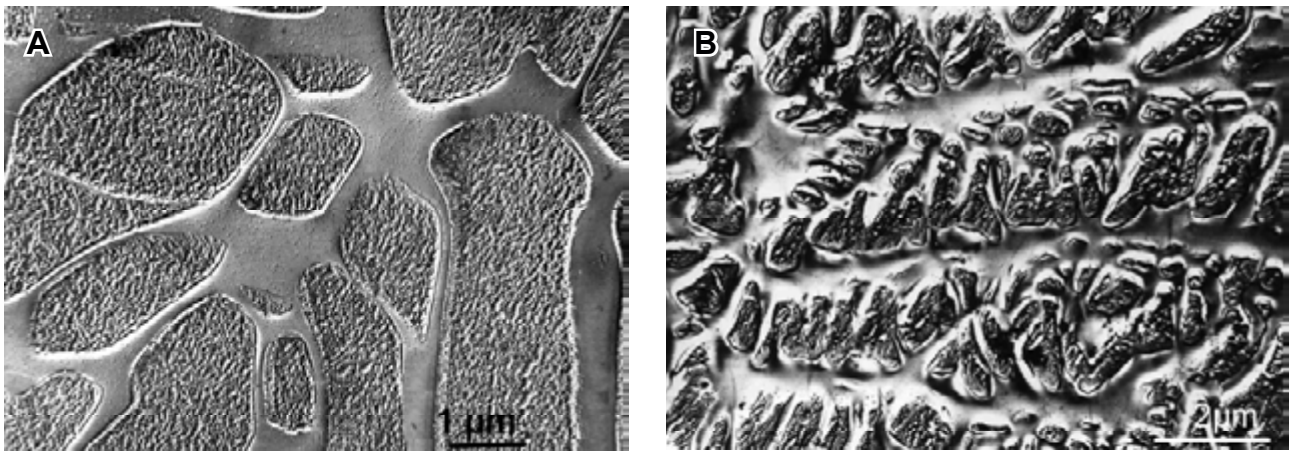

Рис. 1. Характер кристалізації в 20%-му водному розчині гліцерину, охолодженому зі швидкістю 2 × 10^3 град/хв (**A**) і 5 × 10^4 град /хв (**B**).

Fig. 1. Crystallization in 20% glycerol aqueous solution cooled at a rate of 2 × 10^3 deg/min (**A**) and 5 × 10^4 deg/min (**B**).

фізичному способі фіксації стану біооб'єкта — кріофіксації, що дозволяє за соті-тисячні частки секунди заморозити зразок до азотних температур [13]. Даний підхід виявився ефективним для фіксації та вивчення швидкоплинних процесів у клітинах, їхніх мембранах, а також для дослідження динаміки поза- та внутрішньоклітинного кристалоутворення на різних етапах низькотемпературного консервування [4, 11]. За допомогою цього методу на розробленому нами пристрої для сколювання біологічних об'єктів у вакуумі на базі промислового приладу ВУП-2К, (SELMI) [13] було досліджено процес кристалізації після заморожування розчинів деяких кріопротекторів (рис. 1) і клітинних суспензій (рис. 2). Показано, що за швидкого заморожування відбувається неоднорідна деформація поверхні клітин кристалами позаклітинного льоду

preservation [23, 35]. Using this method with the developed by us equipment for fracturing of biological specimens in vacuum, based on an industrial device VUP-2K (SELMI), the crystallization after freezing the solutions of some cryoprotectants (Fig. 1) and cell suspensions (Fig. 2) was investigated [27]. Non-uniform deformation of the cell surface by extracellular ice crystals resulted from the reduced ratio of the width of the 'channel' of the eutectic to the cell size was shown to occur at rapid freezing (Fig. 2). Taking into account this effect, the concept of cell damage during rapid freezing was proposed [33].

For the first time ever, we investigated the recrystallization of extracellular and intracellular ice and dehydration of human erythrocytes at the stage of temperature arrest (–20... –30°C) under the two-stage freezing mode (Fig. 3) [24].

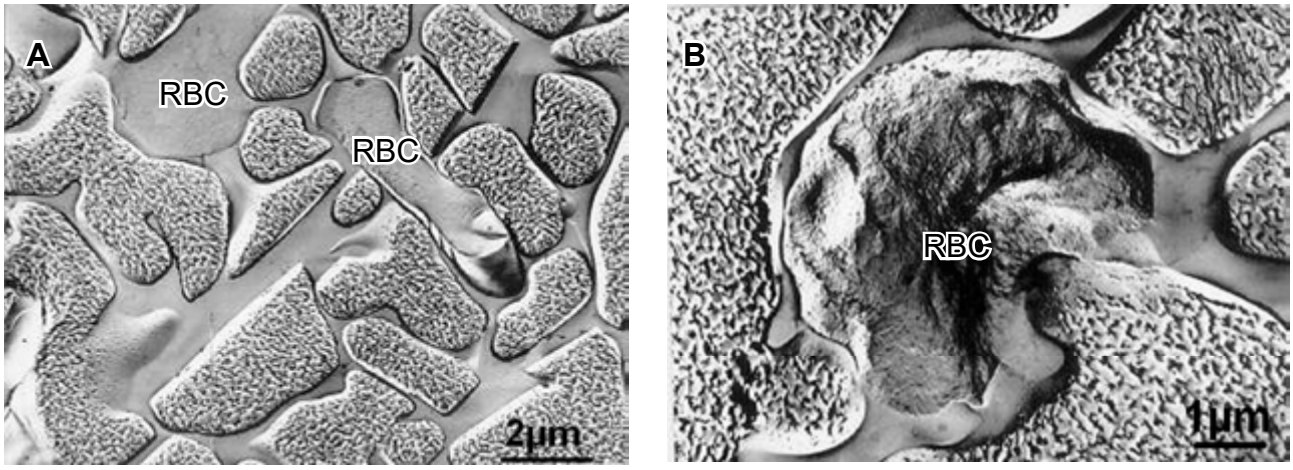

Рис. 2. Характер кристалізації в суспензії еритроцитів, заморожених зі швидкістю 2 × 10^3 град/хв у присутності 20%-го розчину гліцерину (**A**). Деформація поверхні еритроцитів (RBC) кристалами позаклітинного льоду (**B**).

Fig. 2. Crystallization in suspension of red blood cells frozen at a rate of 2 × 10^3 deg/min in the presence of 20% glycerol solution (**A**). Deformation of red blood cell (RBC) surface by extracellular ice crystals (**B**).

в результаті зменшення співвідношення ширини «каналу» евтектики до розміру клітини (рис. 2). З урахуванням цього ефекту була запропонована концепція пошкодження клітин за умов використання швидкого режиму заморожування [16].

Методом заморожування-сколювання ми вперше у світі дослідили процеси рекристалізації поза- і внутрішньоклітинного льоду та зневоднення еритроцитів людини на етапі температурної зупинки (–20…–30°С) за двоступінчастого режиму заморожування (рис. 3) [30].

На основі розробленої в ІПКіК НАН України теоретичної моделі було запропоновано метод оцінки чисельних значень коефіцієнта фільтрації клітинних мембран для води при негативних температурах із урахуванням експериментальних значень часу «розчинення» кристалів внутрішньоклітинного льоду і зневоднення клітин. Для еритроцитів людини цей коефіцієнт склав

Based on the theoretical model developed at IPC&C NAS of Ukraine, a method was proposed to estimate the numerical values of the filtration coefficient of cell membranes for water at negative temperatures, taking into account the experimental values of 'dissolution' time of intracellular ice crystals and cell dehydration. For human red blood cells this coefficient was 0.5×10^{-13} m^3 $N^{-1}s^{-1}$ [10, 24] and for red blood cells of hibernating ground squirrel – 10^{-13} m^3 $N^{-1}s^{-1}$ [10, 24].

The freeze-fracture method has been widely used in many electron microscopy laboratories around the world to study the ultrastructure of cells and their membranes [8, 18, 20]. For cryobiology, the examining of temperature-dependent structural changes in biological membranes is important. We have shown that the redistribution of intramembrane particles (IMP), formed by transmembrane proteins, is largely determined by the cell cytoske-

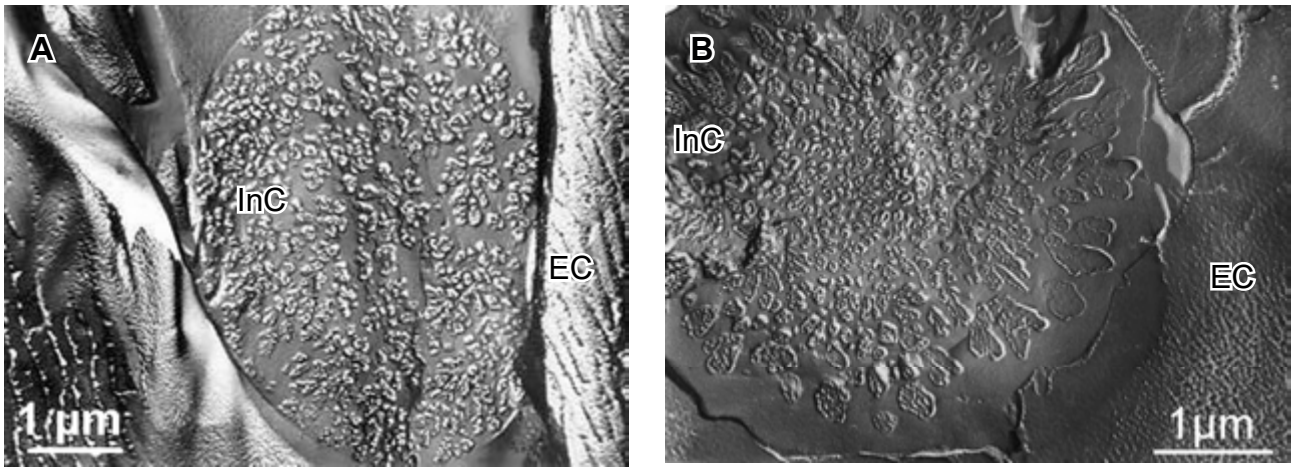

Рис. 3. Розподіл кристалів внутрішньоклітинного льоду в еритроцитах людини на етапі температурної зупинки (–20°С; 10 хв) за двоступінчастого режиму заморожування (**А**) та в еритроцитах, заморожених за одноетапною програмою зі швидкістю 4–5 тис град/хв (**В**). InC – внутрішньоклітинні кристали; EC – позаклітинні кристали.

Fig. 3. Distribution of intracellular ice crystals in human red blood cells at the stage of temperature arrest (–20°C; 10 min) under two-stage freezing mode (**A**) and in red blood cells frozen with a one-stage program at a rate of 4–5 thousand deg/min (**B**). InC – intracellular crystals; EC – extracellular crystals.

$0{,}5 \times 10^{-13}$ $м^3$ $Н^{-1}с^{-1}$ [3, 30], а для еритроцитів ховраха у стані гібернації – 10^{-13} $м^3$ $Н^{-1}с^{-1}$[30].

Метод заморожування-сколювання широко застосовувався в багатьох електронно-мікроскопічних лабораторіях світу для вивчення ультраструктури клітин та їхніх мембран [24, 28, 29]. Для кріобіології важливого значення набуває дослідження температурозалежних структурних перебудов у біологічних мембранах. Ми показали, що перерозподіл внутрішньомембранних частинок (ВМЧ), які утворюються трансмембранними білками, значною мірою визначається станом цитоскелета клітин і залежить від температури (рис. 4, 5) [12, 31].

leton state and depends on temperature (Fig. 4, 5) [25, 26].

In 1986, at the IPC&C NAS of Ukraine on the base of SCDB with experimental unit there was developed and manufactured an equipment for the implementation of electron microscopic method of ice replacement in a frozen state (freeze-substitution), capable of visualization of the shape and location of ice crystals formed in cells and tissues under low temperature exposure. Fig. 6 represents a typical picture of the distribution of ice crystals in liver cells [14].

In recent decades, the practice of low-temperature preservation of biological specimens has

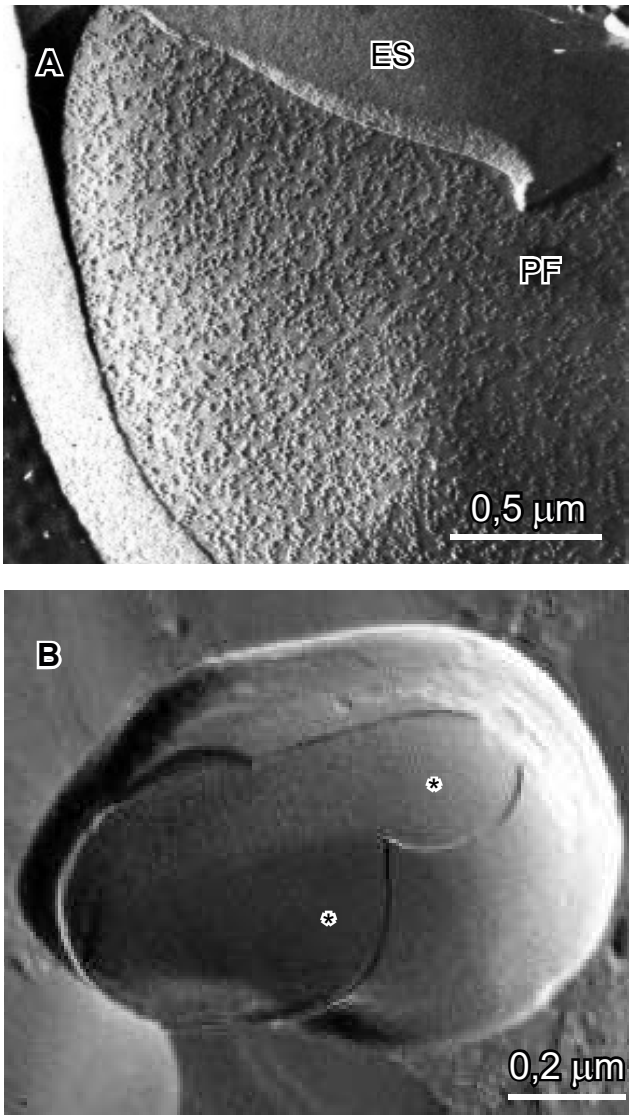

Рис. 4. Відмінність в морфологічній картині поверхні сколювання мембрани еритроцита (**A**) та ліпідної (безбілкової) везикули (**B**), яку виявлено за допомогою методу заморожування-сколювання. PF – внутрішня прилегла до цитоплазми поверхня мембрани еритроцита (inner membrane surface adjacent to the cytoplasm) з характерним розподілом трансмембранних білків і гладка поверхня ліпідної везикули (*), яка не містить частинок. ES – зовнішня поверхня еритроцита (extracellular surface).

Fig. 4. Difference in morphology of fracturing surface of red blood cell membrane (**A**) and lipid (protein-free) vesicle (**B**), detected using the freeze-fracture method. PF is the inner membrane adjacent to cytoplasm with a characteristic distribution of transmembrane proteins and a smooth, lipid-free surface of lipid vesicle (*). ES – outer surface of red blood cell (extracellular surface).

У 1986 р. в ІПКіК НАН України на базі СКТБ з дослідним виробництвом розроблено і виготовлено апаратуру для реалізації електронно-мікроскопічного методу заміщення льоду в замороженому стані, за допомогою якого удалося візуалізувати форму і локалізацію кристалів льо-

successfully used ‘vitrification solutions’, which avoid crystallization by reducing the freezing point when using mixtures of cryoprotectants of high concentrations. As the temperature decreases, the liquid solution becomes more viscous and at a relatively low temperature and high concentration of substance solidifies in the vitreous state. A similar result, *i. e.* vitrification state can be obtained by ultra-rapid cooling, which is realized, as a rule, for thin films and micro-objects.

The described method has been widely applied in development and implementation in clinical practice of cryopreservation of human and animal reproductive cells, for which the preservation of ultrastructure and genetic apparatus is extremely important (Fig. 7) [5, 21].

The combined use of scanning and transmission electron microscopies has allowed a comprehensive investigation of the effect of protective media of different composition, ionic strength and pH values on structure and functions of biological samples of

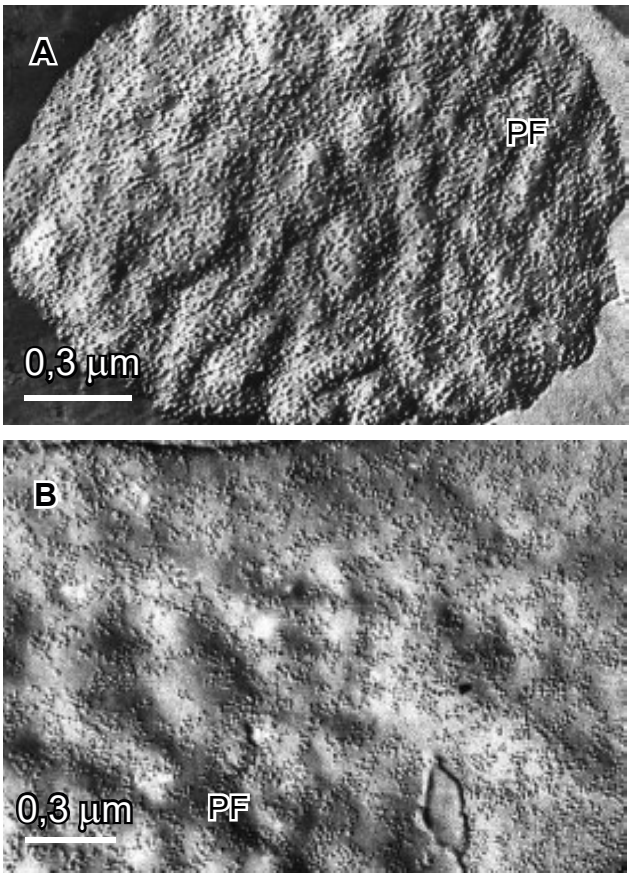

Рис. 5. Відмінності в ультраструктурі PF-поверхонь мембран еритроцитів ховраха в стані глибокої гібернації (температура тіла 4°C) за кріофіксації зразків крові від 4°C (**A**) та від 20°C (**B**).

Fig. 5. Differences in ultrastructure of PF surfaces of ground squirrel red bood cell membranes in deep hibernation state (body temperature 4°C) with cryofixation of blood samples from 4°C (**A**) and from 20°C (**B**).

ду, що формуються в клітинах і тканинах за низькотемпературного впливу. На рис. 6 представлено типову картину розподілу кристалів льоду в клітинах печінки [5].

В останні десятиліття в практиці низькотемпературного консервування біологічних об'єктів успішно застосовуються «вітрифікувальні розчини», які дозволяють уникнути кристалізації за рахунок зниження точки замерзання під час використання сумішей кріопротекторів із високою концентрацією. За умов зниження температури рідкий розчин стає більш в'язким і при досить низькій температурі та високій концентрації речовини твердне в склоподібному стані. Аналогічний результат — стан вітрифікації — можна отримати за рахунок надшвидкого охолодження, яке реалізується, як правило, для тонких плівок і мікрооб'єктів.

Описаний метод знайшов широке застосування в розробленні та впровадженні в клінічну практику кріоконсервування репродуктивних клітин людини і тварин, для яких надзвичайно важливе збереження ультраструктури та генетичного апарату (рис. 7) [9, 20].

Спільне використання растрової і трансмісійної електронної мікроскопії дозволило провести комплексне дослідження впливу захисних середовищ різного складу, іонної сили і значень pH на структурно-функціональний стан біологічних об'єктів різного рівня організації (клітина-орган) [14, 21]. Встановлено, що слабоелектролітні середовища із зниженим значенням pH забезпечують високий рівень збереження ультраструктури і макроергів клітин. Зокрема, результати моделювання умов гіпотермічного зберігання еритроцитів

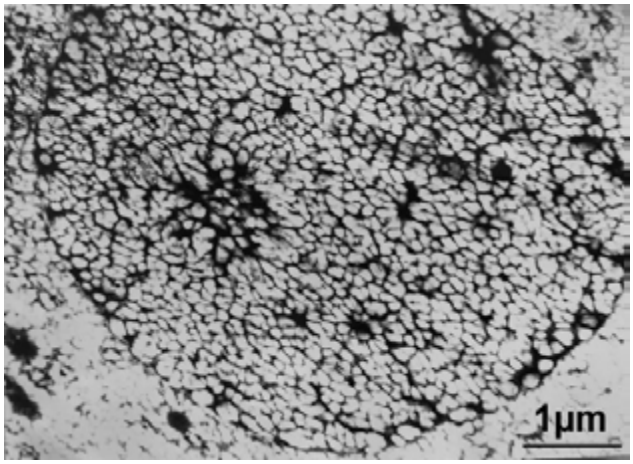

Рис. 6. Розподіл кристалів льоду в ядрі гепатоцита щура. Охолодження до –180°С. Метод заморожування-заміщення.

Fig. 6. Distribution of ice crystals in nucleus of rat hepatocytes. Cooling to –180°C. Freeze-substitution.

different levels of organization (cell-organ) [11, 28]. Low-electrolyte media with low pH was found to provide a high rate of preservation of ultrastructure and macroergs of cells. In particular, the results of modeling the conditions of hypothermic storage of red blood cells showed that morphological changes (cell size and shape, formation of membrane vesicles, state of glycocalyx, partial loss and aggregation of transmembrane proteins) were directly related to ultrastructural organization of membrane-cytoskeletal complex (Fig. 8) [25, 28].

The results of studying the ultrastructure of cells, their organelles after exposure to low temperatures, hypothermia and hypobiosis have greatly contributed to understanding the nature of adap-

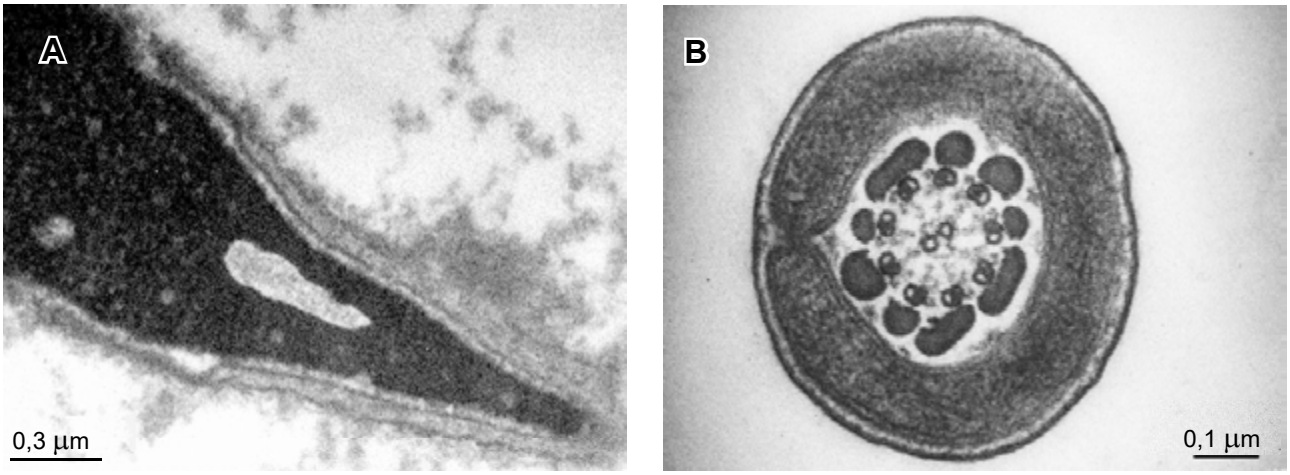

Рис. 7. Збереження ультраструктури голівки (**A**) і хвоста (**B**) сперматозоїда людини після кріоконсервування методом вітрифікації.

Fig. 7. Preserved ultrastructure of human spermatozoa head (**A**) and tail (**B**) after cryopreservation by vitrification.

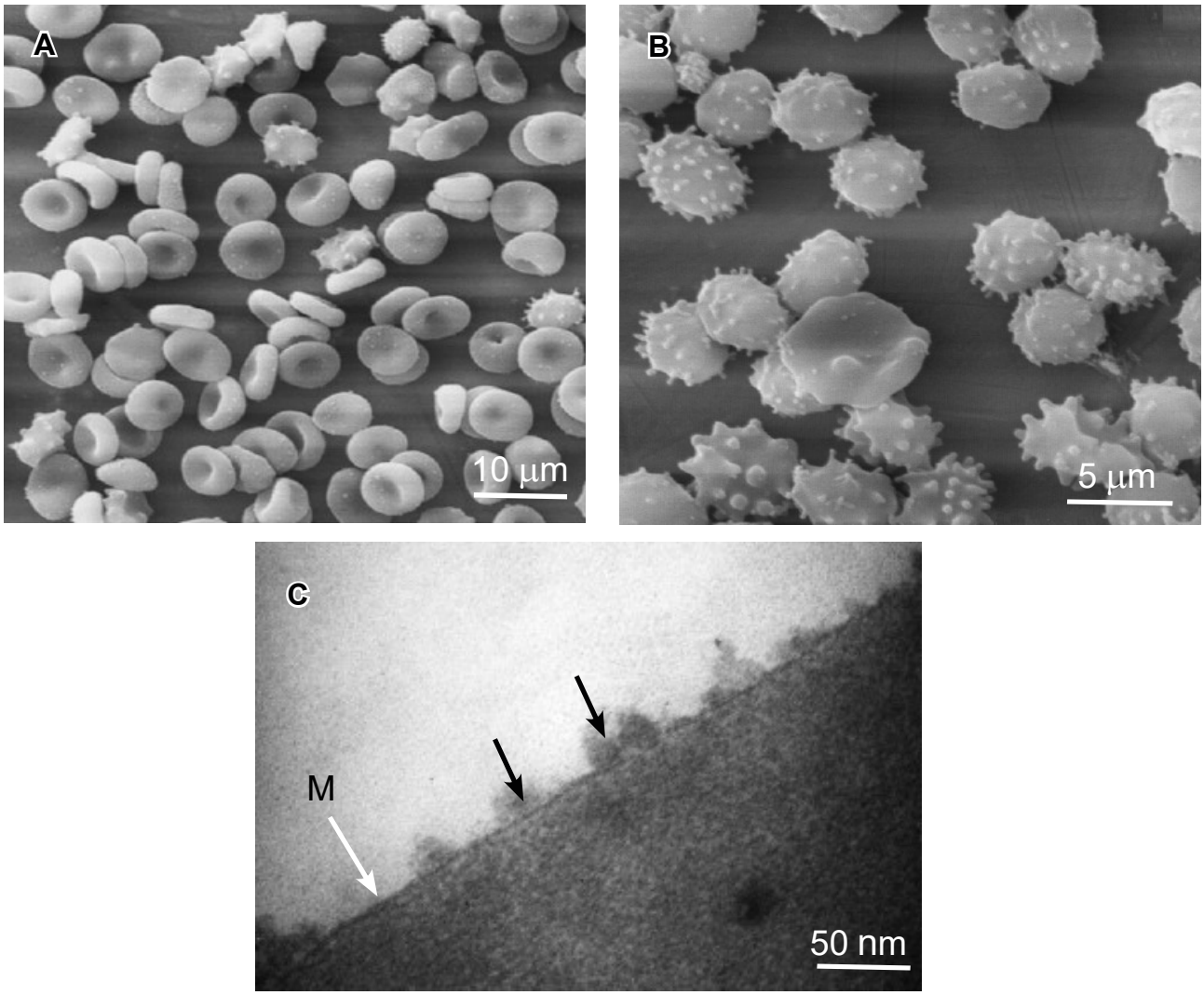

Рис. 8. Морфологічний стан еритроцитів після 7 діб гіпотермічного зберігання в електролітних, pH 5,4 (**A**) і неелектролітних, pH 8,6 (**B**) середовищах. Деградація ультраструктури глікокаліксу мембран еритроцитів до 10–14-ї доби зберігання (**C**) в середовищі з нейтральним pH. Темні стрілки – фрагменти глікокаліксу; M – мембрана еритроцита. Фіксація рутенієм червоним.

Fig. 8. Morphology of erythrocytes after 7 days of hypothermic storage in electrolytic, pH 5.4 (**A**) and non-electrolytic, pH 8.6 (**B**) media. Degradation of ultrastructure of the glycocalyx of red blood cell membranes by days 10–14 of storage (**C**) in a medium with neutral pH. Dark arrows – fragments of the glycocalyx; M – red blood cell membrane. Fixation with ruthenium red.

показали, що морфологічні зміни (розмір і форма клітин, утворення мембранних везикул, стан глікокаліксу, часткова втрата та агрегація трансмембранних білків) безпосередньо пов'язані з ультраструктурною організацією мембрано-цитоскелетного комплексу (рис. 8) [14, 31].

Результати дослідження ультраструктури клітин, їхніх органел після дії низьких температур в умовах гіпотермії та гіпобіозу внесли істотний вклад в уявлення про характер адаптації та регенерації клітинних і субклітинних структур, а також у вивчення механізмів терморегуляції [1, 6, 8]. За допомогою класичних методів електронної мікроскопії в ІПКіК НАН України вивчено структурно-функціональні зміни в біологічних

tation and regeneration of cellular and subcellular structures, as well as discovering the mechanisms of thermoregulation [3, 15, 19]. Using classical methods of electron microscopy at the IPC&C the structural and functional changes in biological systems of different levels of organization and at various stages of ontogenesis after cooling at temperatures from 37 to –196°C were studied. Many publications of the IP&C team are devoted to investigation of morphological parameters of biological objects (blood cells, bone marrow, reproductive tissues, *etc.*) after *in vitro* cold and low-temperature preservation. Important attention is paid to changes in the ultrastructure of individual compartments of cells, the degree

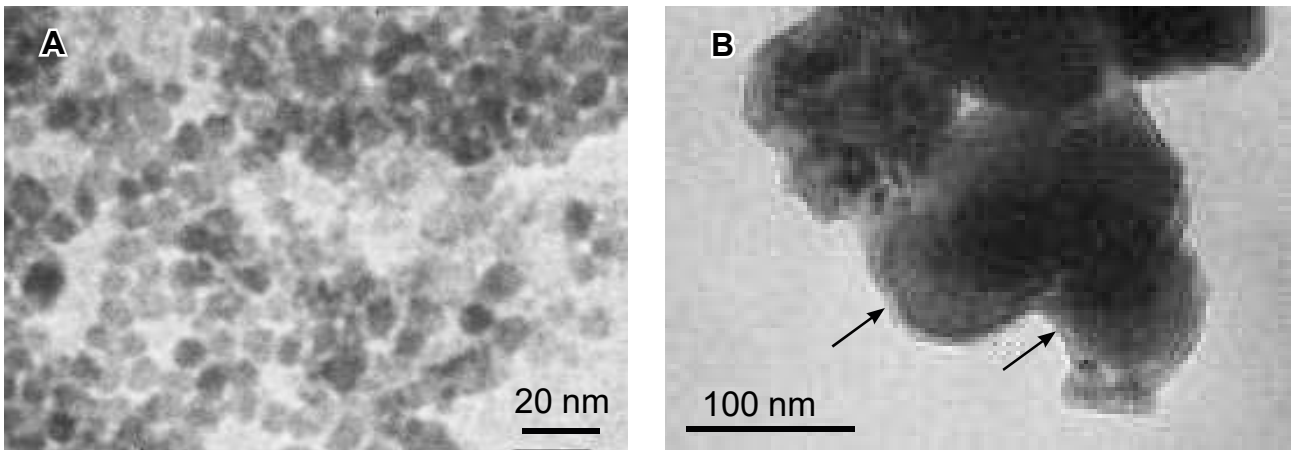

Рис. 9. Ультраструктура і характер розподілу наночастинок Fe_3O_4 у середовищах різного складу після 10-хвилинної обробки ультразвуком і висушування на формваровій підкладці (**A**); утворення навколо наночастинок тонкої оболонки (стрілки) (**B**).

Fig. 9. Ultrastructure and nature of distribution of Fe_3O_4 nanoparticles in media of different composition after 10-min sonication and drying on a molding substrate (**A**); formation of a thin shell around the nanoparticles (arrows) (**B**).

системах різного рівня організації та на різних етапах онтогенезу після охолодження за температури від 37 до –196°С. Багато робіт учених ІПКіК НАН України присвячено дослідженню морфологічних показників біологічних об'єктів (клітин крові, кісткового мозку, репродуктивних тканин та ін.) після дії холоду *in vitro* та низькотемпературного консервування. Важлива увага приділяється вивченню змін ультраструктури окремих компартментів клітин, ступеня та зворотності процесів їхнього пошкодження під час розроблення методів і технологій довгострокового зберігання [9, 16, 20, 35].

Застосування електронної мікроскопії в дослідженні елементів гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) охолодженого мозку дозволило встановити структурні механізми підвищення його проникності для термокомпетентних нейромедіаторів за рахунок активації процесів піноцитозу та рецептор-індукованого трансцитозу. Виявлено, що ультраструктурні перебудови ендотеліоцитів кровоносних капілярів мають різну спрямованість і відповідають різним рівням проникності ГЕБ. Результати фрактального аналізу електронно-мікроскопічних зображень кори і гіпоталамуса показали, що елементи ГЕБ за періодичних холодових впливів на організм тварин низькою позитивною (10°С) і наднизькою (–120°С) температурами мають різні структурно-функціональні особливості реагування, які значуще виявляються за показниками фрактальної розмірності функціональної геометрії структур головного мозку [1, 8].

Електронна мікроскопія — практично єдиний метод одержання однозначної інформації не лише про розподіл і локалізацію наночастинок у

and reversibility of their damage when developing the methods and technologies for long-term storage [5, 21, 33, 34].

The use of electron microscopy in the study of elements of the blood-brain barrier (BBB) of cooled brain has established structural mechanisms to increase its permeability to thermocompetent neurotransmitters by activating the pinocytosis and receptor-induced transcytosis. Ultrastructural rearrangements of endothelial cells of blood capillaries was found to have different orientation and to correspond to different levels of BBB permeability. The results of fractal analysis of electron microscopic images of the cortex and hypothalamus showed that the elements of BBB under periodic cold exposure to low positive (10°C) and ultralow (–120°C) temperatures had different structural and functional features of the response, which were significantly detected by indices of the fractal dimension of the functional geometry of brain structures [3, 19].

Electron microscopy is virtually the only method of obtaining unambiguous information not just about the distribution and localization of nanoparticles in the intracellular volume, but also about the mechanism of their penetration into a cell [1, 16, 17]. The main physical index of nanoscale objects is the high ratio of surface area to volume, which ensures their reactivity [16, 31, 32]. Biocompatibility and ability to penetrate a cell are the main criteria for the effectiveness of using the nanoparticles for biological and medical purposes [13, 16]. In our studies, the addition of fetal bovine serum to the equilibration medium was shown to contribute to the formation of a thin shell (4–5 nm) around the nanoparticles, which increased biocompatibility (Fig. 9).

внутрішньоклітинному об'ємі, але й про механізм їх проникнення в клітину [7, 17, 27]. Основним фізичним показником нанорозмірних об'єктів є високе відношення площі поверхні до об'єму, що саме і забезпечує їхню реакційну здатність [7, 15, 34]. Біосумісність і здатність проникати в клітину — це основні критерії ефективності застосування наночастинок у біологічних і медичних цілях [7, 26]. У наших дослідженнях було показано, що додавання ембріональної телячої сироватки в середовище еквілібрації сприяло утворенню тонкої оболонки (4–5 нм) навколо наночастинок, яка саме і підвищувала біосумісність (рис. 9).

Таким чином, наведені в роботі окремі результати аналізу ультраструктурних змін у біологічних системах різного рівня організації під дією охолодження в широкому діапазоні температур, дані щодо формування та локалізації кристалів льоду у внутрішньоклітинному просторі, характер взаємодії кристалів з клітинною поверхнею, температурозалежного перерозподілу трансмембранних білків та ін., які були одержані вченими ІПКіК, зробили вагомий внесок у розуміння механізмів кріопошкодження та кріозахисту біологічних об'єктів. Електронна мікроскопія як високороздільний метод дослідження у поєднанні з допоміжним технічним устаткуванням і методичними прийомами дозволила отримати важливі для кріобіології фундаментальні дані. На теперішній час перспективним є застосування кріоелектронної мікроскопії для оцінки стану біологічних об'єктів під час розроблення новітніх методів кріоконсервування.

Література

1. Бабийчук ВГ, Марченко ВС, Бабийчук ГА, и др. Структурно-функциональные механизмы действия экстремального охлаждения на терморегуляторные центры гипоталамуса. Проблемы криобиологии. 2004; (2): 62–70.
2. Гольцев АМ. Кріобіологічний постамент Нобелівської премії з хімії 2017 р. Вісник НАН України. 2018; (6): 75–85.
3. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наукова думка; 1994. 144 с.
4. Зинченко АВ, Манк ВВ, Овчаренко ФД, и др. Строение и фазовые состояния водно-глицериновых растворов. Доклады АН УССР Серия Б. 1982; (8): 38–42.
5. Капрельянц АС, Марченко ЛН, Матяш ИП. Ультраструктурный анализ методом замораживания-замещения деструкции ткани печени при локальном замораживании. Криобиология. 1986; (3): 36–9.

Thus, the results of analysis of ultrastructural changes in biological systems of different levels of organization under the influence of cooling within a wide range of temperatures, data on the formation and localization of ice crystals in the intracellular space, nature of the interaction of crystals with cell surface, temperature-dependent redistribution of transmembrane proteins, obtained by the IPC&C scientists, significantly contributed to understanding the mechanisms of cryoinjury and cryoprotection of biological specimens. Electron microscopy as a high-resolution research method in combination with auxiliary equipment and methodological techniques allowed to obtain fundamental data important for cryobiology. At present, the use of cryoelectron microscopy to assess the state of biological specimens in developing new methods of cryopreservation is promising.

References

1. Apopa PL, Qian Y, Shao R. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling Part Fibr Toxicol. [Internet] 2009; Jan 9 [cited 2019 Nov 18]; 6:1. Available from: https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-6-1
2. Asahina E, Shimada K, Hisada J. A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling. Exp Cell Res. 1970; 59(2): 349–58.
3. Babiychuk VG, Marchenko VS, Babiychuk GA, et al. Structural and functional effect mechanisms of extreme cooling on hypothalamus thermoregulatory centers. Problems of Cryobiology. 2004; (2): 62–70.
4. Beck M, Baumeister W. Cryo-electron tomography: can it reveal the molecular sociology of cells in atomic detail? Trends Cell Biol. 2016; (26): 825–37.
5. Drokin SI, Stain H, Govorukha TP. Ultrastructure of carp Cyprinus carpio spermatozoa after cooling, dilution and freeze-thawing. CryoLetters. 2002; (24): 49–55.
6. Farrant J, Walter CA, Heather L, McGann LE. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. Cryobiology. 1977; 14(3): 273–86.
7. Fleck RA. Low-temperature electron microscopy: techniques and protocols. Methods Mol Biol . 2015; 1257: 243–74.
8. Fujikawa S. Freeze-fracture and etching on membrane damage on humane erythrocytes caused by formation of intracellular ice. Cryobiology. 1980; (12): 351–62.
9. Goltsev AM. [Cryobiological pedestal of the Nobel Prize in chemistry for 2017]. Visn Nac Akad Nauk Ukr. 2018. (6): 75–85. Ukrainian.
10. Gordienko EA, Pushkar. NS. [Physical foundations of low-temperature preservation of cell suspensions]. Kyiv: Naukova Dumka, 1994. 144 p. Russian.

6. Капрельянц ОС, Марченко ЛМ, Мігунова РК. Структура ендотеліальних клітин синусоїдів печінки за умов загального охолодження щурів. Проблемы криобиологии. 2003; (4): 70–6.
7. Кирошка ВВ, Репин НВ, Тищенко ЮО, и др. Синтез, биологическая активность и цитотоксичность нанопорошков на основе Fe_3O_4. Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. 2010; 8(4): 787–98.
8. Марченко ВС, Бабийчук ГА, Марченко ЛН. К фрактальным механизмам структурно-функционального состояния центров терморегуляции при гипотермии и гибернации. Проблемы криобиологии. 2005; 15(3): 503–8.
9. Павлович ОВ, Гапон ГО, Юрчук ТО, та ін. Ультраструктурні та функціональні характеристики сперміїв людини після кріоконсервування методом вітрифікації. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30(1): 24–33.
10. Пушкарь НС, Капрельянц АС, Панков ЕЯ. Ультраструктура клетки при низких температурах. Киев: Наукова думка; 1978. 144 с.
11. Репин НВ. Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных условиях охлаждения. Криобиология. 1986; (3): 31–6.
12. Репин НВ, Репина СВ. Ультраструктурные и динамические характеристики мембран эритроцитов. Влияние физиологического состояния и температуры. Цитология. 1990; 32(11): 1094–8.
13. Репин НВ, Скорняков БА. Методические особенности и техническое обеспечение метода замораживания-скалывания. Криобиология и криомедицина. 1982; 10: 89–92.
14. Репин НВ, Юрченко ТН. Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4°С в сохранении формы эритроцитов и их мембраны. Механизм везикулообразования. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии криомедицины. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2012. с. 165–206.
15. Суздалев ИП. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. Москва: КомКнига; 2006. 592 с.
16. Юрченко ТН, Козлова ВФ, Скорняков БА, и др. Влияние криопротекторов на биологические системы. Киев: Наукова. Думка; 1989. 240 с.
17. Apopa PL, Qian Y, Shao R. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling Part Fibr Toxicol. [Internet] 2009; Jan 9 [cited 2019 Nov 18]; 6:1. Available from: https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-6-1
18. Asahina E, Shimada K, Hisada J. A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling. Exp Cell Res. 1970; 59(2): 349–58.
19. Beck M, Baumeister W. Cryo-electron tomography: can it reveal the molecular sociology of cells in atomic detail? Trends Cell Biol. 2016; (26): 825–37.
20. Drokin SI, Stain H, Govorukha TP. Ultrastructure of carp Cyprinus carpio spermatozoa after cooling, dilution and freeze-thawing. CryoLetters. 2003; 24 (1): 49–55.
21. Gulevskyy AK, Repin NV, Schenyavsky II. Impairment of barrier properties of erythrocyte membranes caused by low temperatures is a result of disorganization of hemoglobin supramolecular structure. CryoLetters. 2016; 37(5): 357–64.
22. Farrant J, Walter CA, Heather L, McGann LE. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. Cryobiology. 1977; 14(3): 273–86.
23. Fleck RA. Low-temperature electron microscopy: techniques and protocols. Methods Mol Biol. 2015; 1257: 243–74.
24. Fujikawa S. Freeze-fracture and etching on membrane damage on humane erythrocytes caused by formation of intracellular ice. Cryobiology. 1980; (12): 351–62.
11. Gulevskyy AK, Repin NV, Schenyavsky II. Impairment of barrier properties of erythrocyte membranes caused by low temperatures is a result of disorganization of hemoglobin supramolecular structure. CryoLetters. 2016; 37(5): 357–64.
12. Hurbain I, Sachse M. The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. Biol Cell. 2011;103(9):405–20.
13. Ignatyeva TA, Voyevodin VN, Goltsev AN, *et al*. Perspectives of constant gradient magnetic fields applications in biotechnology. Am J Biosci Bioeng. 2014; 2(6): 72–7.
14. Kaprelyants AS, Marchenko LN, Matyash IP. [Ultrastructural analysis of liver destruction using freeze-substitution upon cryoapplication]. Kriobiologiya. 1986; (3): 36–9. Russian.
15. Kaprelyants OS, Marchenko LN, Migunova RK. Structure of liver sinusoid endothelial cells under the conditions of general cooling of rats. Problems of Cryobiology. 2003; (4): 70–6.
16. Kiroshka VV, Repin NV, Nadutov VM et al. [Synthesis, biological activity and cytotoxicity nanopowders based on Fe_3O_4]. Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies. 2010; 8(4): 787–98. Russian.
17. L'Azou B, Jorly J, Dinhill, *et al. In vitro* effects of nanoparticles on renal cells. Part Fibr Toxicol. [Internet] 2008; Dec 19 [cited 2019 Sep 21]; 5:22. Available from: http://www.particleandfibretoxicology.com/content/5/1/22
18. MacKenzie AP, Luyet BJ. Electron microscope study of recrystallization in rapidly frozen gelatin gels. Biodynamica. 1967; 10(206): 95–122.
19. Marchenko VS, Babiychuk GA, Marchenko LN. To fractal mechanisms of the structural and functional state of thermoregulation centers under hypothermia and hibernation. Problems of Cryobiology. 2005; 15(3): 503–8.
20. Nei T. Growth of ice crystals in frozen specimens. J Micros. 1973; 22 (3): 227–33.
21. Pavlovych OV, Hapon HO, Yurchuk TO, *et al.* Ultrastructural and functional characteristics of human spermatozoa after cryopreservation by vitrification. Probl Cryobiol Cryomed. 2020; 30 (1): 24–33.
22. Pushkar NS, Kaprelyants AS, Pankov EYa. [Cell ultrastructure at low temperatures]. Kyiv: Naukova Dumka, 1978. 144 p. Russian.
23. Repin NV. [Study of extra- and intracellular crystallization in human erythrocytes under different cooling conditions]. Kriobiologiya. 1986. (3): 31–6. Russian.
24. Repin NV. To the question about two-step rapid freezing method. Estimation of aqueous membrane permeability in erythrocytes at temperature exposure stage. CryoLetters. 2009; (4): 251–61.
25. Repin NV, Bobrova EN, Repina SV. Temperature-induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia. J Bioelectrochemistry. 2008; 73 (2): 101–5.
26. Repin NV, Repina SV. [The ultrastructural and dynamic characteristics of erythrocyte membranes. The effect of the physiological status and temperature]. Tsitologiia. 1990. 32(11): 1094–8. Russian.
27. Repin NV, Skornyakov BA. [Methodological features and technical support of the method of freeze-fracturing]. Kriobiologiya i Kriomeditsina. 1982; (10): 89–92. Russian.
28. Repin NV, Yurchenko TN. [The role of environmental factors and the duration of exposure at 4°C in maintaining the shape of erythrocytes and their membranes. The mechanism of vesicle formation]. In: Goltsev AN, editor. [Actual problems of cryobiology and cryomedicine.] Kharkiv; 2012. p. 165–206. Russian.
29. Robards AW, Sleytr UB. Low temperature methods in biological electron microscopy (Practical methods in electron microscopy). Amsterdam-New York-Oxford: Elsevier, 1985. 551 p.

25. Hurbain I, Sachse M. The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. Biol Cell. 2011; Sep;103(9):405–20.
26. Ignatyeva TA, Voyevodin VN, Goltsev AN, *et al*. Perspectives of constant gradient magnetic fields applications in biotechnology. Am J Biosci Bioeng. 2014; 2(6): 72–7.
27. L'Azou B, Jorly J, Dinhill *et al*. *In vitro* effects of nanoparticles on renal cells. Part Fibr Toxicol. [Internet] 2008; Dec 19 [cited 2019 Sep 21]; 5: 22. Available from: http://www.particleandfibretoxicology.com/content/5/1/22
28. MacKenzie AP, Luyet BJ. Electron microscope study of recrystallization in rapidly frozen gelatin gels. Biodynamica. 1967; 10(206): 95–122.
29. Nei T. Growth of ice crystals in frozen specimens. J Micros. 1973; 22 (3): 227–33.
30. Repin NV. To the question about two-step rapid freezing method. Estimation of aqueous membrane permeability in erythrocytes at temperature exposure stage. CryoLetters. 2009; (4): 251–61.
31. Repin NV, Bobrova EN, Repina SV. Temperature-induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia. J Bioelectrochemistry. 2008; 73 (2): 101–5.
32. Robards AW, Sleytr UB. Low temperature methods in biological electron microscopy (Practical methods in electron microscopy). Amsterdam-New York-Oxford: Elsevier; 1985. 551 p.
33. Staehelin A, Bertaud WS. Temperature and contamination dependent freeze-etch images of frozen water and glycerol solutions. J Ultrastr Research. 1971; 37 (1–2): 146–68.
34. Watari F, Takashi N, Yokoyama A, *et al*. Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. J R Soc Interface. 2009; 6: 371–88.
35. Zagnojko VI, Nardid OA, Lugovoj VI, Govorukha TP. Relationship between the degree of lysosome and mitochondria structural changes on freeze-thawing and the release of protein synthesis inhibitor. CryoLetters. 1985; 6 (3): 151–62.
30. Staehelin A, Bertaud WS. Temperature and contamination dependent freeze-etch images of frozen water and glycerol solutions. J Ultrastr Research. 1971; 37 (1–2): 146–68.
31. Suzdalev IP. [Nanotechnology: physical-chemistry of nanoclusters, nanostructures and nanomaterials]. Moscow: KomKniga, 2006. 592 p. Russian.
32. Watari F, Takashi N, Yokoyama A, *et al*. Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. J R Soc Interface. 2009; 6: 371–88.
33. Yurchenko TN, Kozlova VF, Skornyakov BA, *et al*. [Influence of cryoprotectants on biological systems]. Kyiv: Naukova Dumka, 1989. 240 p. Russian.
34. Zagnojko VI, Nardid OA, Lugovoj VI, Govorukha TP. Relationship between the degree of lysosome and mitochondria structural changes on freeze-thawing and the release of protein synthesis inhibitor. CryoLetters 1985; (6): 151–62.
35. Zinchenko AV, Mank VV, Ovcharenko FD, *et al*. [Structure and phase states of water-glycerol solutions]. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. Ser B. 1982; (8): 38–42. Russian.