

# Влияние ряда криопротекторов на механизмы роста внеклеточных кристаллов льда

Л.Г. КУЛЕШОВА

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Influence of Several Cryoprotectants on Mechanisms of Extracellular Ice Crystal Growth

L.G. KULESHOVA

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Как показали проведенные нами ранее криомикроскопические исследования в зависимости от режима охлаждения и состава внеклеточной среды в суспензии, а также в результате фазового перехода в ней формируется внеклеточный лед различной морфологии. При этом сохранность замороженных клеток зависит от формы и размера внеклеточных кристаллов, поскольку структура внеклеточного льда оказывает влияние на характер массообмена между клетками и окружающей их средой. В свою очередь, формирующаяся при замораживании морфологическая структура льда определяется механизмом ее роста. Отличительным признаком известных механизмов роста кристаллов является различная зависимость линейной скорости роста грани кристалла  $v$  от переохлаждения системы  $\Delta T$ .

В работе линейная скорость роста кристаллов льда как функция переохлаждения изучена на модели внеклеточной среды, который представляет собой раствор лиофилизированной плазмы крови человека, содержащий криопротекторы ЭГ, ДМСО, ПЭГ м.м. 1500 и ПВП м.м. 12000. Установлено, что независимо от вида криопротектора, его концентрации и величины переохлаждения внеклеточного раствора аналитическая зависимость линейной скорости роста кристаллов льда преимущественно представлена двумя слагаемыми. Это указывает на реализацию в системе одновременно двух механизмов роста: нормального ( $v \sim \Delta T$ ) и дислокационного ( $v \sim \Delta T^2$ ). Увеличение концентрации криопротектора в растворе приводит к ингибированию как нормальной, так и дислокационной составляющих роста. При этом дислокационная составляющая более чувствительна к наличию криопротекторов в растворе, чем нормальная. По степени ингибирования нормальной составляющей роста криопротекторы располагаются в ряд ЭГ > ПЭГ-1500 > ДМСО > ПВП-12000, а дислокационной составляющей – в ряд ЭГ > ДМСО > ПВП-12000 > ПЭГ-1500. Оценены величины критических переохлаждений  $\Delta T_c$ , при которых вклад в линейную скорость роста кристаллов льда обоих механизмов одинаков, и определены те области переохлаждений, где превалирует один из них. Преобладание того или иного механизма формирования внеклеточной морфологической структуры льда оказывает влияние на сохранность биологических объектов. Поскольку при дислокационном механизме линейная скорость роста кристаллов льда больше, чем при нормальном, быстрое увеличение градиента осмотического давления на мембране, обусловленное вымораживанием внеклеточной воды, может привести к гибели клетки уже в температурной зоне формирования первичной кристаллической структуры. Отсюда следует целесообразность максимального ингибирования этой составляющей роста, что, как установлено, наиболее эффективно достигается при содержании во внеклеточной среде ЭГ.

As cryomicroscopic investigations which were carried out by us showed, depending on a mode of cooling and structure of extracellular environment in suspension, and also as a result of phase transition in it extracellular ice of various morphology was formed. Moreover the survival of frozen-thawed cells depends on a form and size of extracellular crystals as the structure of extracellular ice influences the character of mass transfer between cells and environment. In its turn, the morphological structure of ice which was formed during freezing was determined by the mechanism of its growth. The distinctive feature of the known mechanisms of growth of crystals is various dependence of linear growth rate of a crystal face  $v$  from system supercooling  $\Delta T$ .

In the research a linear growth rate of ice crystals as the function of supercooling is studied in the model of extracellular environment, which represents the solution of lyophilized human blood, containing cryoprotectants EG, DMSO, PEG m.w. 1500 and PVP m.w. 12000. It is established that irrespective of cryoprotectant type, its concentration and value of extracellular solution supercooling, analytical dependence of linear growth rate of ice crystals is mainly presented by two components. It indicates the realization in the system of two mechanisms of growth simultaneously: normal ( $v \sim \Delta T$ ) and dislocational ( $v \sim \Delta T^2$ ). The increase in concentration of cryoprotectant in solution leads to inhibition of both normal and dislocational growth components. Thus the dislocational component is more sensitive to existence of cryoprotectant in solution, than normal one. By degree of inhibition of normal growth component, cryoprotectants are in a row EG > PEG-1500 > DMSO > PVP-12000 and dislocational component in a row EG > DMSO > PVP-12000 > PEG-1500. The values of critical supercoolings  $\Delta T_c$  at which the contribution to linear growth rate of ice crystals of both mechanisms is identical are estimated and the areas of supercoolings where one of them prevails are found. Prevalence of this or that mechanism of formation of extracellular morphological ice structure influences the safety of biological objects. As at the dislocational mechanism a linear growth rate of ice crystals is more than at normal one, the fast increase of osmotic pressure gradient on a membrane caused by freezing-out of extracellular water, can cause the death of a cell even in temperature zone of primary crystal structure formation. Herewith the expediency of maximum inhibition of this growth component, as it was established, is most effectively achieved, when an extracellular environment contains EG.