

# Повреждение криоконсервируемых биообъектов в процессе кластерной кристаллизации криопротекторных растворов

С.С. Севастьянов, А.И. Осецкий

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

## Damage of Cryopreserved Bioobjects in the Process of Cluster Crystallization of Cryoprotective Solutions

S.S. Sevastianov, A.I. Osetsky

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

При изучении механизмов повреждения криоконсервируемых биообъектов современная практическая криобиология основное внимание уделяет температурному интервалу  $-10...-60^{\circ}\text{C}$ , в котором реализуется обычный фазовый переход «вода-лед». Однако анализ показывает, что при использовании наиболее востребованных криопротекторных веществ (ДМСО, глицерин, ЭГ, ПЭО) существенные повреждения биообъектов могут возникать и при более низких температурах (в интервале  $-60^{\circ}\text{C}...T_g$ ), а также при  $T < T_g$ , где  $T_g$  – температура стеклования аморфных фракций. Причины возникновения повреждений в области температур  $T < T_g$ , обусловленных термоупругими напряжениями первого и второго родов, хорошо изучены в физическом материаловедении. Проведенные в этом направлении исследования дают эффективные варианты ингибирования повреждений за счет возникающих термоупругих деформаций. В то же время механизмы повреждения биообъектов в интервале температур  $-60^{\circ}\text{C}...T_g$ , в котором развивается кластерная кристаллизация оставшихся в замораживаемых молекулярных растворах и клеточных суспензиях жидких каналов и включений, практически не изучены. В связи с этим в настоящей работе рассмотрены механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов за счет кластерной кристаллизации криопротекторных растворов.

В работе показано, что наиболее интенсивно это явление протекает в процессе отогрева предварительно замороженных растворов с концентрацией криопротекторных веществ  $C_B$  50...65%. Именно такие концентрации характерны для образующихся в поликристаллических образцах при  $T > T_g$  жидкофазных включений с обычно используемыми в криобиологии исходными значениями  $C_B$  в пределах 10...15%.

На основе полученных с помощью дифференциальной объемной сканирующей тензодилатометрии данных проведена классификация применяемых криопротекторных веществ по особенностям их кластерной кристаллизации. Установлено, что сопровождающие это явление объемные эффекты существенно отличаются по величине и знаку для различных криопротекторов. Именно этот факт может определять криозащитную эффективность используемых криопротекторных веществ. Оценены скачки давления в замкнутых жидкофазных включениях, возникающих при кластерной кристаллизации, удовлетворяющей условию  $\Delta V_d/V_0 > 0$ , где  $\Delta V_{cl} = V_1 - V_0$  – суммарное максимальное изменение объема системы в диапазоне температур кластерной кристаллизации. Впервые проведена оценка локальных скачков давления в сверхвязких жидкофазных каналах вблизи образования кластерных частиц и их влияния на сохранность находящихся в этих каналах клеток и молекул.

The studies of mechanisms of damages in cryopreserved bioobjects conducted by modern applied cryobiology are focused on the temperature range of  $-10...-60^{\circ}\text{C}$ , where the usual ‘water-ice’ phase transition is realized. However, the simple analysis shows that when using the most popular cryoprotective substances such as: DMSO, glycerol, EG, PEO, the substantial injuries in bioobjects could occur even at lower temperatures, namely within the range of  $-60^{\circ}\text{C}...T_g$  and at  $T < T_g$ , where  $T_g$  is vitrification temperature of amorphous fractions. The reasons for occurrence of the damages within the temperature range  $T < T_g$ , stipulated by thermoelastic stress of types I and II, have been thoroughly studied in the physical material science. The studies conducted in this direction provide the efficient options to inhibit damages provoked by thermoelastic tensions. At the same time there is virtually no studies on the mechanisms of damages in biological samples occurring within the temperature range of  $-60^{\circ}\text{C}...T_g$ , where liquid channels and inclusions, remaining in the frozen molecular solutions and cell suspensions, are involved to the cluster crystallization processes. In this regard, this investigation was performed to elucidate the damage mechanisms of cryopreserved bioobjects due to cluster crystallization of cryoprotective solutions.

The study showed that the highest intensity of this phenomenon was found during thawing of pre-frozen solutions with a concentration of cryoprotective substances  $C_B$  of 50...65%. Exactly such concentrations were characteristic for the inclusions formed in polycrystalline samples at  $T > T_g$  in the liquid phase if the initial concentrations  $C_B$  were typical for cryobiology, *i. e.* 10...15%.

Based on the data obtained with differential volumetric scanning tenzodilatometry the used cryoprotective agents were classified by the features of their cluster crystallization. It was found that the volumetric effects, accompanying this phenomenon were substantially different in magnitude and direction for different cryoprotectants. This fact can be used to determine the efficiency of the used cryoprotective substances. We assessed also the pressure surges in the closed liquid-phase inclusions, occurring during cluster crystallization, that satisfied the condition  $\Delta V_d/V_0 > 0$ , where  $\Delta V_{cl} = V_1 - V_0$  was the maximum change in the total volume of the system within temperature range of cluster crystallization. For the first time we evaluated the local pressure surges in the ultra-viscous liquid-phase channels near the place of cluster particles formation as well as their impact on the integrity of cells and molecules being in these channels.