

О возможном механизме повреждения криоконсервируемых биологических объектов за счет пластической релаксации давлений в замкнутых жидкофазных включениях

UDC 57.043:612.111:536.54

A.I. OSETSKY*, A.L. KIRILYUK, T.M. GURINA

On Possible Mechanism of Damage in Frozen-Thawed Biological Objects Due to Pressure Plastic Relaxation in Closed Liquid Phase Inclusions

Рассмотрена одна из возможных причин повреждений клеточных суспензий, тканей и органов при субэвтектических температурах. Кинетику процессов, протекающих при охлаждении и нагреве водных растворов криопротекторных веществ, исследовали тензодилатометрическим методом и методом термопластической деформации. Определены температурные интервалы для водных растворов диметилсульфоксида, глицерина и полиэтиленоксида с м. м. 1500, в которых возможно образование микрокристаллов льда в замкнутых включениях, что может являться причиной значительных механических повреждений при криоконсервировании биологических объектов. Особенно активно такие повреждения реализуются при малых концентрациях криопротекторов (до 10%). Механическое повреждение биологических объектов при криоконсервировании, которое, возможно, связано с пластической релаксацией давлений в замкнутых жидких включениях, рассматривали на примере криоконсервирования клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Ключевые слова: замкнутые включения, пластическая деформация, релаксация давлений, предел текучести, криопротекторы.

Розглянуто одна з можливих причин пошкоджень клітинних суспензій, тканин і органів при субевтектичних температурах. Кінетику процесів, які протікають при охолодженні та відігріві водяних розчинів криопротекторних речовин, досліджували методами тензодилатометрії та термопластичної деформації. Визначено температурні інтервали для водяних розчинів диметилсульфоксиду, гліцерину та поліетиленоксиду з м. м. 1500, у яких можливе утворення мікрокристалів льоду, замкнутих включень, що може бути причиною значних механічних пошкоджень при криоконсервуванні біологічних об'єктів. Особливо активно такі пошкодження реалізуються при малих концентраціях (до 10%) криопротекторів. Механічне пошкодження біологічних об'єктів при криоконсервуванні, яке, можливо, пов'язане з пластичною релаксацією тиску в замкнутих рідких включеннях, розглядали на прикладі криоконсервування клітин *Saccharomyces cerevisiae*.

Ключові слова: замкнуті включення, пластична деформація, релаксація тисків, межа текучості, криопротектори.

One of the possible causes of damages of cell suspensions, tissues and organs under sub-eutectic temperatures has been considered. Kinetics of the processes, proceeding during cooling and heating of aqueous solutions of cryoprotective agents was studied with tensodilatometric method and the one of thermoplastic deformation. There have been established temperature intervals for aqueous solutions of dimethyl sulfoxide, glycerol and polyethylene oxide with molecular weight of 1500 where the formation of ice single crystals in closed inclusions is possible, that may be the cause of significant mechanical impairments during cryopreservation of biological objects. These damages are quite actively realized under low concentrations of cryoprotectants (to 10%). Mechanical damage of biological objects during cryopreservation which is likely associated to plastic relaxation of pressures in closed liquid inclusions were exemplified with cryopreservation of *Saccharomyces cerevisiae* cells.

Key-words: closed inclusions, plastic deformation, relaxation of pressures, limit of stretching strain, cryoprotectants.

В настоящее время в криобиологии все больший интерес представляет изучение вопроса о возможных повреждениях криоконсервируемых биологических объектов в эвтектическом интервале температур и ниже вплоть до температур стеклования [1, 4, 14, 17-19, 21]. В процессе замораживания в биосистемах возникают значительные градиенты температур, при которых наряду с неоднородностью системы возникают внутренние термомеханические напряжения [4, 6]. Эти факторы

Now in cryobiology the studying of the question on possible damages of biological objects under cryopreservation within an eutectic temperature interval and lower up to vitrification temperatures gains more interest [1, 4, 14, 17-19, 21]. During freezing in biological systems there are notable temperature gradients, under which together with the irregularity of the system inner thermomechanical tensions appear [4, 6]. These factors result in such physical phenomena as electric polarization of the substance, generation of

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-11, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4111, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

приводят к таким физическим явлениям, как электрическая поляризация вещества, генерация импульсных электромагнитных полей и т.д. Индикатором внутренних термомеханических напряжений является акустическая эмиссия [4, 8, 22]. В криозащитных растворах наблюдается интенсивная акустическая эмиссия при охлаждении ниже температуры стеклования, что указывает на образование в них трещин в твердофазном состоянии [6]. Кроме того, под действием возникающих в системе термоупругих напряжений, возможно зарождение дислокаций, играющих роль носителей пластической деформации, за счет которой осуществляется релаксация термоупругих напряжений [16]. Эти явления вызывают значительные нарушения структуры биологических объектов и приводят к их повреждению и гибели [4, 8].

Внутренние термомеханические напряжения могут достигать разрушающих значений на уровне отдельных клеток, заключенных между кристаллами льда [6]. В работах [18, 19] на основании теоретического анализа было показано, что такие напряжения могут быть причиной разрушения замораживаемых органов. Температурные градиенты при охлаждении и отогреве крупных объектов часто приводят к механическим деформациям и трещинам [21]. Механические повреждения вследствие многочисленных микротрещин на поверхностях ткани наблюдали при криоконсервировании сердечных клапанов человека [17].

Было высказано предположение, что при замораживании клеточной суспензии отдельные клетки захватываются кристаллами льда [2]. При этом в результате замерзания образца образуются замкнутые объемы, в которых может развиваться гидростатическое давление до 2×10^8 Па. Также предполагается, что такие давления являются дополнительным повреждающим фактором при замораживании биообъектов.

Таким образом, при криоконсервировании таких гетерогенных систем, как клеточные суспензии, ткани и органы с добавлением консервантов могут происходить сложные процессы пластических и упругих деформаций, которые становятся источником повреждений биологических объектов. В связи с этим изучение процессов, происходящих при замораживании биологических объектов в диапазоне температур $-40 \dots -100^\circ\text{C}$, позволит расширить представления о механизмах их протекания и снизить повреждающее действие биообъектов за счет учета этих факторов для усовершенствования технологии их криоконсервирования.

Цель работы – изучение одного из возможных механизмов повреждений биообъектов при криоконсервировании, который реализуется с помощью пластической релаксации давлений в замкнутых включениях.

impulse electromagnetic fields etc. The indicator of inner thermomechanical tensions is acoustic emission [4, 8, 22]. In cryoprotective solutions there is an intensive acoustic emission during cooling lower than vitrification temperature, that points to the formation of cracks in them in a solid-phase state [6]. In addition, under the effect of appearing in the system thermoelastic tensions it is possible the origination of dislocations playing the role of carriers of plastic deformation under which the relaxation of thermoelastic tensions is accomplished [16]. These phenomena cause significant disorders of the structure of biological objects and result in their damage and death [4, 8].

Inner thermomechanical tensions may reach destroying values at the level of separate cells, enclosed between ice crystals [6]. In the papers [18, 19] basing on theoretical analysis it has been shown that these tensions may result in the destruction of the organs being frozen. Temperature gradients during cooling and thawing of large objects frequently lead to mechanical stresses and cracks [21]. Mechanical damages due to numerous microcracks on the surface of tissue were observed during cryopreservation of human cardiac valves [17].

There was supposed that during freezing of cell suspension certain cells were captured by ice crystals [2]. Herewith as a result of sample freezing the closed volumes where hydrostatic pressure may develop up to 2×10^8 Pa are formed. Also it is supposed that such pressures are additional damaging factor during freezing of biological objects.

Thus during cryopreservation of such heterogeneous systems as cell suspensions, the tissues and organs with adding preservatives the complicated processes of plastic and elastic deformations, getting the source of damages of biological objects may occur. In this connection the investigation of the processes proceeding during freezing of biological objects within the temperature range of $-40 \dots -100^\circ\text{C}$ enables the extending of the notions about the mechanisms of their proceeding and reducing the damaging effect of biological objects due to the accounting these factors for improving the technology of their cryopreservation.

The research aim was the studying of one of the possible mechanisms of damage of biological objects during cryopreservation which is realized using plastic relaxation of tensions in the closed inclusions.

Materials and methods

The kinetics of processes of crystallization and melting taking place during cooling and warming of aqueous solutions of cryoprotective substances was studied with tensodilatometric [15] and thermoplastic deformation methods [3, 10].

Using the method of volumetric scanning tensodilatometry the aqueous solutions of glycerol with mass concentrations of 52 and 58% of cryoprotective

Материалы и методы

Кинетику процессов кристаллизации и плавления, протекающих при охлаждении и нагреве водных растворов криопротекторных веществ, исследовали тензодилатометрическим методом [15] и методом термопластической деформации [3, 10].

С помощью метода объемной сканирующей тензодилатометрии исследовали водные растворы глицерина с массовыми концентрациями 52 и 58% криопротекторного вещества. При регистрации тензодилатометрических кривых образцы охлаждали от комнатной температуры до -125°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Методом термопластической деформации исследовали водные растворы диметилсульфоксида (ДМСО), глицерина и полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) в области массовых концентраций 0...40%. Образцы охлаждали со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -150°C , стабилизировали при конечной температуре охлаждения в течение 10 мин. Далее к замороженному образцу прикладывали внешнее деформирующее напряжение σ . Для определения температур расстеклования T_g водных растворов криопротекторов применяли $\sigma=400 \text{ г}/\text{мм}^2$ [3, 10]. Выше температуры расстеклования аморфная фаза образцов переходит в вязкоупругое, а затем и в вязкотекучее состояние и для исследования кинетики процессов, происходящих при таких температурах, необходимы значительно меньшие внешние напряжения. Их значение также зависело от вида криопротекторных веществ и его концентрации в растворе. Это связано с тем, что криопротекторы обладают различными упруго-пластическими свойствами [11, 13]. Поэтому для водных растворов ДМСО внешнее деформирующее напряжение составляло 200...400 $\text{г}/\text{мм}^2$, а для водных растворов глицерина и ПЭО-1500 – 100...200 $\text{г}/\text{мм}^2$, в зависимости от концентрации криопротектора. Регистрацию термопластических кривых образцов проводили при нагреве с постоянной скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены тензодилатометрические кривые охлаждаемых водных растворов глицерина. Видно, что при температуре T_{c1} для раствора с концентрацией глицерина 52% и температуре T_{c2} для раствора с концентрацией глицерина 58% объем образца увеличивается при его охлаждении. Это является следствием того, что в образце начинается процесс кристаллизации воды, сопровождающийся увеличением его объема на 8,3% [7]. Если учесть частичную компенсацию роста объема охлаждаемых образцов за счет сжатия остающейся жидкой фазы, можно сделать вывод, что

substance were studied. When recording the tensodilatometric curves the samples were cooled from room temperature down to -125°C with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

With the method of thermoplastic deformation aqueous solutions of dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol and polyethylene oxide with molecular weight of 1500 (PEO-1500) were investigated within the interval of mass concentrations 0...40%. The samples were cooled with the rate of $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ down to -150°C , stabilized at final cooling temperature for 10 min. Later to the frozen sample the outer deforming tension σ was applied. To examine the temperatures of devitrification T_g of aqueous solutions of cryoprotectants σ was assumed as equal to $400 \text{ г}/\text{мм}^2$ [3, 10]. Higher than the devitrification temperature amorphous phase of the samples transits to visco-elastic and then to viscous-flow state and for studying the kinetics of the processes occurring at these temperatures, quite less outer tensions are necessary. Their value also depended on the type of cryoprotective substance due to the fact that they possess different elastic-plastic properties [11, 13]. Therefore for aqueous DMSO solutions an outer deforming tension made $200 \text{ г}/\text{мм}^2$ and for those for glycerol and PEO-1500 it made $100 \text{ г}/\text{мм}^2$. Thermoplastic curves of the samples were recorded during heating with a constant rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Results and discussion

Fig. 1 shows tensodilatometric curves of glycerol aqueous solutions under cooling. Its is evident that at T_{c1} temperature for the solution with 52% glycerol concentration and the T_{c2} temperature for the one with 58% glycerol concentration the sample volume increases during its cooling. This is the consequence of the fact that in the sample the process of water crystallization, accompanying with the rise of its volume by 8.3%, starts [7]. When taking into account a partial compensation of the growing volume of the samples under cooling due to the shrinking of the remaining liquid phase, one may conclude that the water crystallization process continues up to T_g vitrification temperature, *i.e.* it proceeds within the interval of ΔT_c temperatures. There was also experimentally established that in cryoprotective solutions under cooling and being cryopreserved with these solutions biological systems, water crystallization does not terminate at achieving the eutectics temperature T_{eut} , that is characteristic for the systems described with classic diagrams of eutectic type and continues at lower temperatures up to the T_g vitrification temperature [12, 20]. So, at tensodilatometric studies of DMSO and PEO-1500 aqueous solutions under cooling within the concentration range of 0...50% there was revealed that water transition into ice is observed up to the temperatures of -130°C and -80°C , correspondingly [12].

процесс кристаллизации воды продолжается вплоть до температуры стеклования T_g , т. е. происходит в интервале температур ΔT_c . Также экспериментально установлено, что в охлаждаемых криопротекторных растворах и криоконсервируемых с такими растворами биологических системах кристаллизация воды не завершается при достижении температуры эвтектики T_{eut} , что характерно для систем, описываемых классическими диаграммами эвтектического типа, а продолжается и при более низких температурах вплоть до температуры стеклования T_g [12, 20]. При тензодилатометрических исследованиях охлаждаемых водных растворов ДМСО и ПЭО-1500 в области концентраций 0...50% было обнаружено, что переход воды в лед наблюдается в них вплоть до температур -130 и -80°C соответственно [12].

Необходимо отметить, если начальная концентрация криопротекторного вещества в растворе лежит в пределах 3...8%, то к моменту достижения температурного интервала ΔT_c образец представляет собой монолитную ледяную матрицу с жидкофазными включениями, концентрация раствора в которых лежит в пределах 40...60%. Тот факт, что в этих включениях в интервале температур ΔT_c протекают процессы кристаллизации, сопровождающиеся увеличением объема, дает основание выдвинуть гипотезу: если эти включения будут замкнутыми, в них неизбежно должны возникать избыточные давления, пропорциональные массе закристаллизованной воды.

Интервал температур ΔT_c при нагреве образцов с достаточно высокой точностью ($\pm 1,5...2^\circ\text{C}$) можно определить с помощью термопластических кривых $\epsilon = \epsilon(T)$, типичный вид которых приведен на рис. 2. Интервал ΔT_c определяется как

$$\Delta T_c = T_c - T_g,$$

где T_c – температура окончания первого перегиба на термопластической кривой, который связан с теплопоглощением при плавлении микрокристаллов льда, образовавшихся в интервале ΔT_c при предварительном охлаждении. В данном случае температура расстеклования T_g определяется по биссектрисе угла, который образуют касательные, проведенные к участкам термопластической кривой с постоянной скоростью нарастания пластической деформации. Ширина плато ΔT_c (рис. 2) пропорциональна массе плавящихся микрокристаллов. Это связано с тем, что после пересечения температуры расстеклования T_g при нагреве образца скорость его пластического течения зависит от двух конкурирующих процессов: уменьшения вязкости раствора при нагреве, приводящего к увеличению скорости пластического течения, и охлаждения

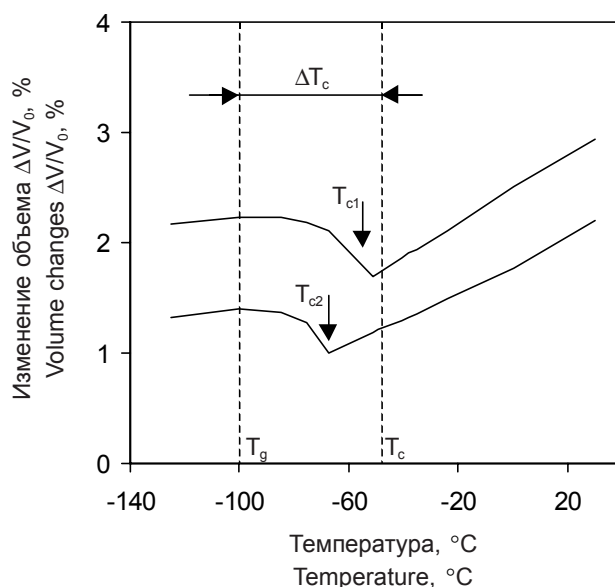


Рис. 1. Изменение объема охлаждаемых водных растворов глицерина различной концентрации, %: 1 – 52; 2 – 58. Пояснения в тексте.

Fig. 1. Change of the volume of aqueous glycerol solutions of various concentrations under cooling, %, 1 - 52, 2 - 58. Explanations are in the text.

It is necessary to note that if initial concentration of cryoprotective substance is within the limits of 3...8%, then to the moment of achieving the temperature interval ΔT_c the sample represents solid ice matrix with liquid phase inclusions, the concentrations of which is within the limits of 40...60%. This fact that in these inclusions within the temperature interval ΔT_c the crystallization processes, accompanying with the increase in the volume, proceed, enables the hypothesizing: if these inclusions will be closed the surplus pressure proportional to the mass of crystallized water should appear inevitably.

Temperature interval ΔT_c during heating of the samples with quite a high accuracy ($\pm 1.5...2^\circ\text{C}$) may be found using thermoplastic curves $\epsilon = \epsilon(T)$, typical appearance of which is given in Fig. 2. The interval ΔT_c here is determined as

$$\Delta T_c = T_c - T_g,$$

where T_c is the temperature of the first bend on thermoplastic curve, which is related to heat absorption during melting of ice crystals formed within the interval ΔT_c during preliminary cooling. In this case devitrification temperature T_g is found with the bisectrix of the angle, formed with the tangent line drawn to the sites of thermoplastic curve with constant flow rate. The plateau width ΔT_c (Fig. 2) is proportional to the mass of melting crystals. This is related to the fact that after crossing the vitrification temperature during heating the sample the rate of its plastic flow depends

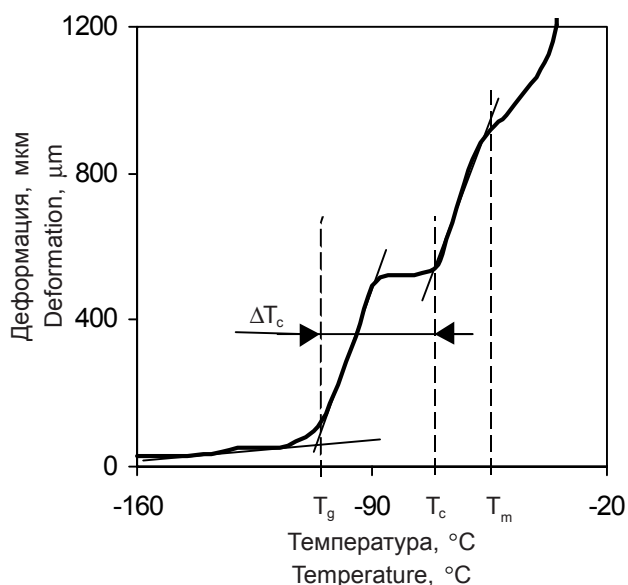


Рис. 2. Типичный вид термопластической кривой замороженного водного раствора криопротектора. Пояснения в тексте.

Fig. 2. Typical appearance of thermoplastic curve of frozen aqueous solution of a cryoprotectant. Explanations are in the text.

раствора за счет теплопоглощения, сопровождающегося плавлением микрокристаллов. Конкуренция этих процессов может приводить к резкому уменьшению скорости пластического течения, о чем свидетельствует образование плато на термопластической кривой. После окончания процесса плавления микрокристаллов скорость пластического течения образца начинает возрастать. Это позволяет по моменту восстановления скорости пластического течения определять интервал температур ΔT_c . Второй перегиб на термопластической кривой, соответствующий температуре T_m , определяет пересечение кривой ликвидуса на диаграмме фазового состояния. Типичные термопластические кривые замороженных водных растворов ДМСО, глицерина и ПЭО-1500 с концентрацией криопротектора 5% представлены на рис. 3. Видно, что температурный интервал, в котором происходит процесс расстеклования образца, а также интервал температур ΔT_c сильно зависят от вида криопротектора.

Зависимости величин интервалов ΔT_c для водных растворов ДМСО, глицерина и ПЭО-1500 от концентрации криопротектора, полученные по термопластическим кривым, показаны на рис. 4. Процесс образования микрокристаллов льда и их рост при столь низких температурах могут быть причиной значительных механических повреждений криоконсервируемых биообъектов. Повреждающий эффект за счет этого фактора особенно

on two competitive processes: reduction in the solution viscosity during heating, resulting in the rise in the plastic flow rate and cooling of the solution due to heat adsorption, accompanying the melting of microcrystals. Competition of these processes may lead to a sharp decrease in the rate of plastic flow, that is confirmed with the formation of the plateau on thermoplastic curve. After finishing the processes of microcrystal melting the plastic flow rate of the sample starts its increase. This allows on the moment of recovery of plastic flow rate to determine the interval ΔT_c . The second bend on thermoplastic curve, corresponding to the temperature T_m determines the liquidus curve crossing. Typical thermoplastic curves of frozen aqueous solutions of DMSO, glycerol and PEO-1500 with 5% concentration of cryoprotectants are presented in Fig. 3. Apparently temperature interval wherein the process of sample vitrification takes place as well as the one of ΔT_c temperatures is strongly dependent on the type of cryoprotectants.

Dependences of the values of ΔT_c values for aqueous solutions of DMSO, glycerol and PEO-1500 on the concentration of cryoprotectant obtained with thermoplastic curves are shown in Fig. 4. The formation process of ice microcrystals and their growth at such low temperatures may be the cause of significant mechanical damages of biological objects under cryopreservation. Damaging effect due to this factor is very strongly manifested under low concentrations of cryoprotective substances (up to 10%) which are applied in cryobiological practice. As it has been already noted

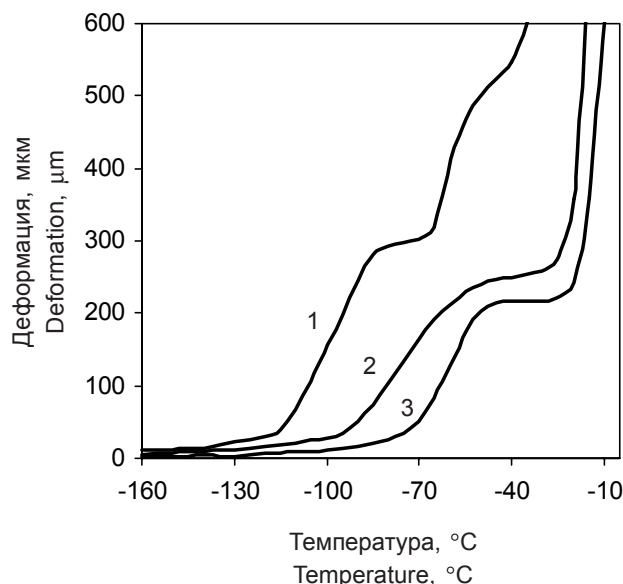


Рис. 3. Типичные термопластические кривые замороженных водных растворов: 1 – ДМСО; 2 – глицерина; 3 – ПЭО-1500 с концентрацией криопротектора 5%.

Fig. 3. Typical appearance of thermoplastic curves of frozen aqueous solutions: 1 – DMSO; 2 – glycerol; 3 – PEO-1500 with a cryoprotectants concentration of 5%.

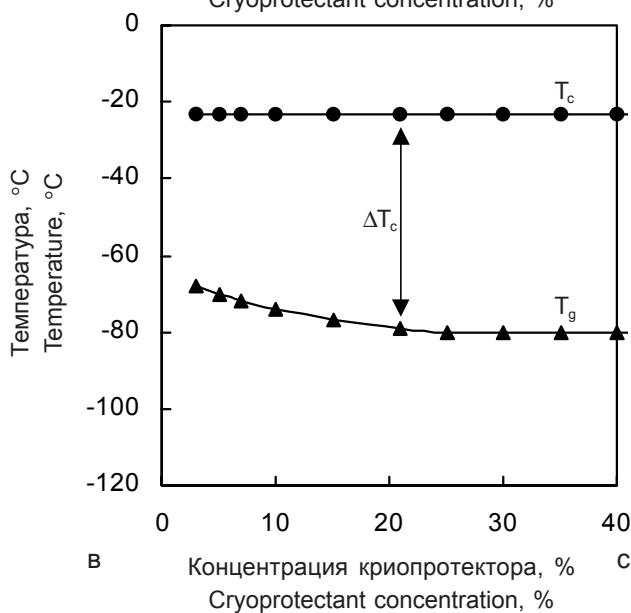
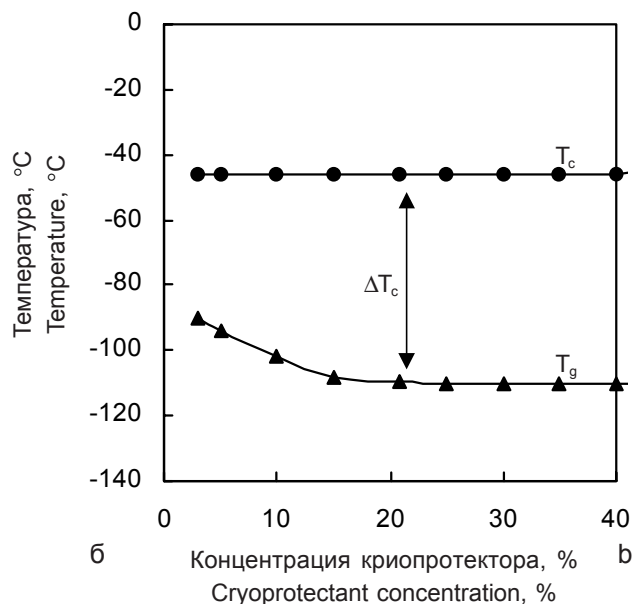
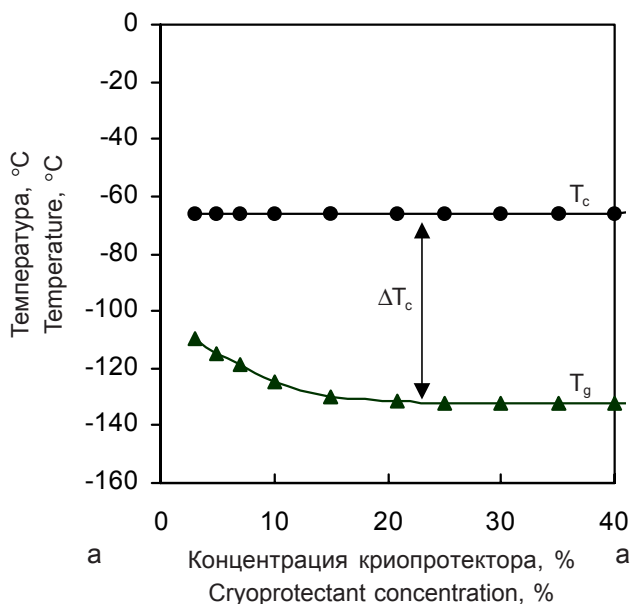


Рис. 4. Зависимость температур T_g и T_c для водных растворов ДМСО (а), глицерина (б) и ПЭО-1500 (в) от концентрации криопротектора.

Fig. 4. Dependence of the temperatures T_g and T_c for aqueous solutions of DMSO (a), glycerol (b) and PEO (c) on cryoprotectant concentration.

this is related to the fact that under these concentrations of cryoprotectants the frozen sample within the temperature interval ΔT_c represents a solid ice matrix, having a high elastic modulus. With built-in into this matrix liquid phase inclusions of relatively small on a volume and not connected with each other [11, 13]. Since these inclusions are closed ones, then the formation in them of additional ice amount is accompanied with the growth of liquid pressure in the inclusions. The pressure created inside the located in ice matrix spherical inclusion with the volume of V_0 due to the formation of additional ice, accompanying with volumetric effect ΔV may be estimated on the formula [12]:

$$p = \frac{3 \cdot \Delta V / V_0 + P_{\text{atm}} \cdot \frac{3 \cdot (1-\nu)}{2 \cdot E}}{\frac{1+\nu}{2 \cdot E} + \frac{\chi}{3}}, \quad (1)$$

where P_{atm} – an outer pressure; E – elastic modulus (for ice $E = 9 \times 10^{14}$ Pa [9]); ν – the Poisson ratio (for ice $\nu = 0.31$ [9]); χ – compressibility of the solution filling the liquid inclusion. $\chi \approx 3 \times 10^{-10}$ Pa⁻¹ [7] (for “water-glycerol” mixture in 1:1 ratio) will be assumed for calculation; V_0 – volume of closed volume ($\Delta V/V=0.01$).

Herewith that during water transition into ice the volume of the system increases by 8.3% [7], then in those cases when 10...15% water containing in liquid phase inclusions, transits into ice in the process of

сильно проявляется при малых значениях концентраций криопротекторных веществ (до 10%), которые применяются на практике в криобиологии. Как уже отмечалось, это связано с тем, что при таких концентрациях криопротекторов замороженный образец в интервале температур ΔT_c представляет собой монолитную матрицу льда с жидкофазными включениями, относительно небольшими по объему и не связанными друг с другом [11, 13]. Поскольку эти включения являются замкнутыми, то образование в них дополнительного количества льда сопровождается ростом давления жидкости во включениях. Давление, создаваемое внутри расположенного в ледяной матрице сферического включения с объемом V_0 , за счет образования дополнительного льда, сопровождающегося объемным эффектом ΔV , можно оценить по формуле [12]:

$$P = \frac{3 \cdot \Delta V / V_0 + P_{\text{атм}} \cdot \frac{3 \cdot (1-\nu)}{2 \cdot E}}{\frac{1+\nu}{2 \cdot E} + \frac{\chi}{3}}, \quad (1)$$

где $P_{\text{атм}}$ – внешнее давление; E – модуль упругости (для льда $E=9 \cdot 10^{14}$ Па [9]); ν – коэффициент Пуассона (для льда $\nu=0,31$ [9]); χ – сжимаемость раствора, заполняющего жидкое включение. Для расчета возьмем $\chi \approx 3 \times 10^{-10}$ Па⁻¹ [7] (для смеси «вода-глицерин» в соотношении 1:1); V_0 – объем замкнутой полости ($\Delta V/V_0=0,01$).

В связи с тем, что при переходе воды в лед объем системы увеличивается на 8,3% [7], то в тех случаях, когда 10...15% воды, содержащейся в жидкофазных включениях, переходит в лед в процессе образования микрокристаллов в интервале температур ΔT_c , величина $\Delta V/V_0$ будет лежать в пределах 0,008...0,012.

Для избыточного давления во включении получаем $P - P_{\text{атм}} = 16$ МПа.

Аналогичные значения ΔP при $\Delta V/V_0=0,01$ можно получить из выражения, определяющего коэффициент сжимаемости раствора χ во включении:

$$\chi = - \frac{\Delta V}{V_0 \cdot \Delta P}, \quad (2)$$

где ΔV – изменение объема жидкости при изменении давления на величину ΔP . Согласно (2) имеем:

$$|\Delta P| = \frac{\Delta V}{V_0} \cdot \frac{1}{\chi},$$

откуда при $\Delta V/V_0=0,01$ следует, что $|\Delta P| \approx 35$ МПа.

Естественно, что в ледяных матрицах, предел текучести которых $\sigma_{\text{тек}} \approx 4$ МПа [9], такие большие давления возникнуть не могут, так как давление во включении будет релаксировать за счет пластической деформации льда.

Пластическая деформация льда, как и многих других кристаллических тел, происходит в результате зарождения и движения по кристаллу разнообразных несовершенств структуры: вакансий, межузельных атомов, межзеренных границ и, что существенно всего, дислокаций. Именно наличие последних предопределяет резкое снижение сопротивления кристаллических твердых тел пластической деформации (в $10^2 \dots 10^4$ раз по отношению к сопротивлению идеальной решетки).

Влияние скорости деформации на механические свойства монокристаллического льда представ-

formation of microcrystals in temperature intervals ΔT_c , the $\Delta V/V_0$ value will be in the limits of 0.008...0.012.

For surplus pressure in the inclusion we receive $P - P_{\text{атм}} = 16$ МПа.

The same values ΔP at $\Delta V/V_0=0.01$ one may receive the expressions determining the coefficient of compressibility χ of the solution in the inclusion:

$$\chi = - \frac{\Delta V}{V_0 \cdot \Delta P}, \quad (2)$$

where ΔV – the change of the volume of liquid during the pressure variation by ΔP .

According to (2) we have:

$$|\Delta P| = \frac{\Delta V}{V_0} \cdot \frac{1}{\chi},$$

wherefrom at $\Delta V/V_0=0.01$ it proceeds that $|\Delta P| \approx 35$ МПа.

It is obvious that in ice matrices where the limit of fluidity makes $\sigma_{\text{пл}} \approx 4$ МПа [9], these high pressures can not appear, since the pressure in the inclusion will relax due to ice plastic deformation.

Ice plastic deformation as well as of many others crystalline cells occurs as a result of origination and movement on the crystal of various imperfections of the structures: vacancies, inter-node atoms, inter-grain limits and that is more significant dislocations. Namely the presence of latter destines a sharp decrease of the resistance of crystalline solid bodies of plastic deformation (in $10^2 \dots 10^4$ times in respect to the resistance of ideal lattice).

The effect of deformation rate on mechanical properties of single crystal ice is presented in Fig. 5 [9]: the sliding was accomplished along the basis plane, orientated under 45° angle to the compression axis. The figures on the curve mean the value of the rate of relative deformation

$$\dot{\alpha} = \frac{\dot{\Delta}L}{L \cdot \dot{\Delta}\delta},$$

where ΔL – the change on the sample length L during the time τ in units $10^{-7} \times c^{-1}$.

Single ice crystals from the point of view of plastic properties possess strongly manifested anisotropy. Polycrystal ice represents the complex of single crystal grains. Thus plastic properties of polycrystal ice occur to be strongly dependent on the value of forming it crystal grains and orientation of their axes, *i.e.* crystalline texture.

Fig. 5. shows that with an increased deformation rate the mechanical tensions σ necessary for plastic flux rapidly enhances and on the dependence of relative deformation on tension a significant fluidity tooth appears. This testifies to the fact that in non-deformed

лено на рис. 5 [9]: скольжение осуществлялось вдоль базисной плоскости, ориентированной под углом 45° к оси сжатия. Цифры на кривой означают величину скорости относительной деформации

$$\dot{a} = \frac{\Delta L}{L \cdot \Delta t}$$

где ΔL – изменение длины образца L за время Δt в единицах $10^{-7} \times c^{-1}$.

Монокристаллы льда с точки зрения пластических свойств обладают сильно выраженной анизотропией. Поликристаллический лед представляет собой совокупность монокристаллических зерен. Таким образом, пластические свойства поликристаллического льда оказываются сильно зависящими от величины образующих его кристаллических зерен и от ориентации их осей, т.е. от кристаллической текстуры.

Из рис. 5 видно, что при увеличении скорости деформации механические напряжения σ , необходимые для пластического течения, быстро нарастают и на зависимости относительной деформации от напряжения появляется значительный зуб текучести. Это свидетельствует о том, что в недеформированных кристаллах льда практически отсутствуют подвижные дислокации. В результате прикладываемые к кристаллу льда напряжения могут достигать максимальных значений σ_{max} , при которых образуются источники подвижных дислокаций. Образующиеся после этого в кристалле подвижные дислокации оказываются под действием достаточно высоких эффективных напряжений:

$$\sigma = \sigma_{max} - \sigma_{\mu}$$

где σ_{μ} – средняя амплитуда далекодействующих внутренних напряжений в кристалле. Если считать, что $\sigma_{\mu} = \sigma_{min}$ (рис. 5), то $\sigma \approx 3$ МПа. Под действием таких эффективных напряжений дислокации в кристаллах льда могут двигаться почти с околосвуковыми скоростями, что служит причиной фрагментации биомолекул и клеток дислокационными ансамблями. Более того, при выходе такого дислокационного ансамбля на границу раздела «лед-жидкая фаза» на поверхность раздела с околосвуковой скоростью выбрасываются ступеньки высотой $h = n \times b$, где n – число дислокаций в ансамбле; b – вектор Бюргерса. Обычно среднее значение n колеблется в пределах от 100 до 1000 [17], а вектор Бюргерса для краевых дислокаций в базисных плоскостях кристаллов льда, имеющих гексагональную решетку, $b \approx 10^{-7}$ Å [9]. Поэтому высота ступенек h может достигать десятых долей микрона, что, вероятно, позволяет им пробивать мембраны клеток, контактирующих с границей

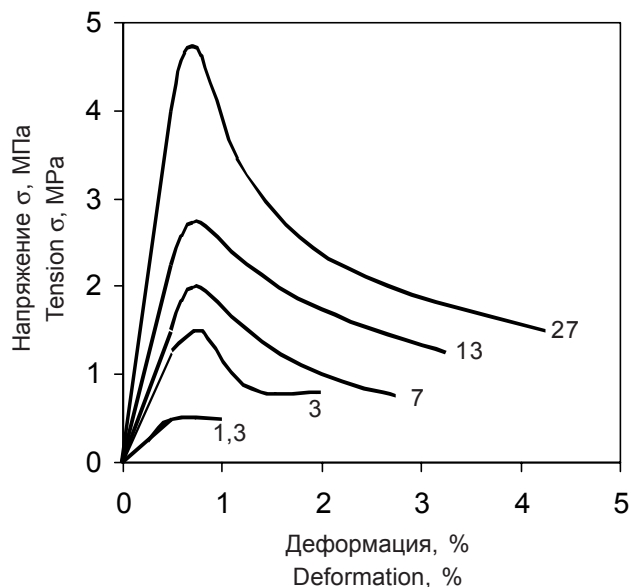


Рис. 5. Кривые напряжение-деформация для монокристалла льда I_h при $-15^\circ C$ по [9]. Пояснения в тексте.

Fig. 5. Tension-deformation curves for ice single crystal I_h at $-15^\circ C$ according to [9]. Explanations are in the text.

ice crystals the mobile dislocations are virtually absent. In the result the tensions applied to an ice crystal may reach maximal values σ_{max} under which the sources of mobile dislocations are formed. The forming afterwards in a crystal mobile dislocation occurs under the effect of quite high effective tensions.

$$\sigma = \sigma_{max} - \sigma_{\mu}$$

where σ_{μ} is an average amplitude of distantly acting inner tensions in crystals. If to consider that $\sigma = \sigma_{min}$ (Fig. 5), then $\sigma \approx 3$ MPa. Under the effect of such effective tensions the dislocations in ice crystals may move almost with transonic velocities, that may be the cause of fragmentation of biological molecules and cells by dislocation ensembles. Moreover when such an ensemble comes out to the “ice-liquid phase” interface on the division surface with transonic velocity the steps of $h = n \times b$ height are thrown, where n is the number of dislocations in an ensemble; b is Burgers vector. Usually mean value n varies within the limits from 100 to 1,000 [17] and the Burgers vector for margin dislocations in basis planes of ice crystals having a hexagonal lattice $b \approx 10^{-7}$ Å [9]. Therefore the height of the steps h may reach the deciles of micron, that probably allows them to break membrane of cells, contacting with ice phase interface. This damage mechanism in particular well explains the experimental fact that the degree of cell damage occurred in the moment of crystallization in liquid phase channels increase with their narrowing and increasing the cells concentration in them [5].

ледяной фазы. Данный механизм повреждения, в частности, хорошо объясняет тот экспериментальный факт, что степень повреждения клеток, оказавшихся в момент кристаллизации в жидкофазных каналах, увеличивается по мере сужения каналов и увеличения концентрации клеток в них [5].

О возможном механическом повреждении биологических объектов за счет пластической релаксации давлений в жидких включениях свидетельствуют и эксперименты по замораживанию клеток *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии ДМСО, ПЭО-1500 и глицерина в диапазоне концентраций 3...10% [13]. В этих экспериментах наблюдалось скачкообразное повышение жизнеспособности клеток при достижении пороговых концентраций криопротекторных веществ 5, 6 и 7% соответственно. При этих концентрациях происходит переход замкнутых жидкофазных включений в сквозные жидкие прослойки [11, 13], что может приводить к резкому уменьшению эффективности рассмотренного механизма повреждения.

Выводы

Полученные результаты расширяют существующие представления о возможных механизмах повреждения биологических объектов в интервале субэвтектических температур. В этом интервале температур при малых значениях концентраций криопротекторных веществ (до 10%), обычно применяемых в практической криобиологии, образец представляет собой монолитную матрицу льда с жидкофазными включениями. Даже незначительное увеличение массы льда в этих включениях будет приводить к резкому снижению жизнеспособности биоматериала за счет пластической релаксации возникающих в них давлений. С увеличением концентрации криопротектора до некоторого порогового значения большая часть замкнутых жидких включений переходит в жидкие прослойки. Такой переход исключает развитие внутренних давлений и ингибирует механические повреждения криоконсервируемых биообъектов. В связи с этим необходимо определять не только пороговые концентрации криопротекторных веществ, но и такие параметры, как температура стеклования и интервал температур, в котором может происходить образование микросталлов льда, что позволит оптимизировать технологии криоконсервирования.

Авторы выражают свою признательность д.б.н., профессору Зинченко А.В. за помощь при обсуждении полученных результатов.

On possible mechanical damage of biological objects due to plastic relaxation of pressures in liquid inclusions testify also the experiments on freezing the *Saccharomyces cerevisiae* cells in the presence of DMSO, PEO-1500 and glycerol within the concentration range of 3...10% [13]. In these experiments there was observed an abrupt rise in cell viability when approaching threshold concentrations of cryoprotective substances 5,6 and 7%, correspondingly. Under these concentrations the transition of closed liquid phase inclusions may lead to a sharp decrease of efficiency of the considered mechanisms of damage.

Conclusion

The obtained results extend the existing notions about possible mechanisms of damaging the biological objects within the interval of sub-eutectic temperatures. Within this temperature interval at low concentrations of cryoprotective substances (up to 10%) usually applied in cryobiological practice, the sample represents the solid matrix of ice with built-in into this matrix liquid phase inclusions. Even insignificant increase of ice mass in these inclusions will result in a sharp reduction of biological material viability due to plastic relaxation of appearing in them pressures. With a rise in the cryoprotectant concentration up to some threshold value the major part of closed liquid inclusions transit into liquid inter-layers. This transition excludes the development of inner pressures and inhibits mechanical damage of cryopreserved biological objects. In this connection it is necessary to determine not only the threshold concentrations of cryoprotective substances, but also such parameters as vitrification and temperature interval wherein the formation of single crystals of ice may occur, that enables the optimization of cryopreservation techniques.

The authors acknowledge doctor of biological sciences, Prof. Zinchenko A.V. for the discussion of the obtained results.

References

1. Anenko V.N. Effect of mechanical factors on cell damage during heating // *Kriobiologiya* – 1988. – N3. – P. 31-35.
2. Bronstein V.L., Itkin Yu.A., Shudra G.G., Iserovich P.G. Mechanism of damage of lactic streptococcus *S. cremoris* T18₁₅ during freezing // *Kriobiologiya i Kriomeditsyna*. – 1983. – Issue 12. – P. 35-38.
3. Gurina T.M. Studying of phase state of frozen solutions of cryoprotectants, cell suspensions and tissues by the method of thermoplastic deformation: Author's abstract of the thesis of cand. of biol. sci. – Kharkov. – 1993. – 18 p.
4. Zinchenko O.V. Physical and chemical processes in cryobiological systems during vitrification and in a solid state: Author's abstract of the thesis of doctor of biol. sci. – Kharkov. – 1997. – 44 p.

Литература

1. *Аненко В.Н.* Влияние механических факторов на повреждение клеток при нагреве // Криобиология.– 1988.– №3.– С. 31-35.
2. *Бронштейн В.Л., Иткин Ю.А., Шудра Г.Г., Исерович П.Г.* Механизм повреждения молочнокислого стрептококка *S. cremoris* T18₁₅ при замораживании // Криобиология и криомедицина.– 1983.– Вып. 12.– С. 35-38.
3. *Гурина Т.М.* Исследование фазового состояния замороженных растворов криопротекторов, клеточных суспензий и тканей методом термопластической деформации: Автореф. дис...канд. биол. наук. – Харьков, 1993. – 18 с.
4. *Зинченко О.В.* Фізико-хімічні процеси в криобіологічних системах при склуванні і в твердій фазі: Автореф. дис...д-ра біол. наук.– Харків, 1997.– 44 с.
5. *Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф.* Роль структуры внеклеточного льда в процессе криоповреждения клеток // Сб. научн. трудов "Моделирование криобиологических процессов".– Харьков, 1988.– С.25-34.
6. *Куракса В.М.* Исследование метастабильных состояний водных растворов 1,2-пропандиола и их влияние на повреждение эритроцитов и почки при криоконсервировании: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1987.– 20 с.
7. *Кухлина Х.* Справочник по физике.– М.: Мир, 1983.– 519 с.
8. *Лебединский А.С., Зинченко А.В., Петренко А.Ю.* Влияние циклического изменения температуры в твердой фазе на сохранность криоконсервированных гепатоцитов крыс // Пробл. криобиологии.– 2002.– №3.– С. 48-51.
9. *Маэно Н.* Наука о льде.– М.: Мир, 1988.– 231 с.
10. *Осецкий А.И., Кирилюк А.Л., Гурина Т.М.* Изучение кинетики расстеклования водных растворов криопротекторов методом термопластической деформации // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №2.– С. 137-146.
11. *Осецкий А.И., Кирилюк А.Л.* Экспериментальное определение пороговых концентраций криопротекторных веществ, обеспечивающих ингибирование механических повреждений криоконсервируемых биообъектов // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 245-247.
12. *Осецкий О.И.* Особливості уповільнення процесів активаційного типу в охолоджених конденсованих середовищах: Автореф. дис...д-ра. фіз.-мат. наук.– Харків, 1997.– 38 с.
13. *Осецкий А.И., Кирилюк А.Л., Гурина Т.М., Высеканцев И.П.* Применение метода пластической деформации для определения пороговых концентраций криопротекторных веществ при криоконсервировании *Saccharomyces cerevisiae* // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №1.– С. 71-79.
14. *Пушкар М.С., Гордієнко Е.О.* Ушкодження біологічних об'єктів при низьких температурах внаслідок термічних напруг // Вісник Академії наук УРСР.– 1987.– №5.– С. 26-31.
15. *Пушкар Н.С., Осецкий А.И., Аненко В.И., Макаренко Б.И.* Тензодилатометрия охлаждаемых растворов криопротекторов и тканей // Докл. АН УССР, Сер. Б.– 1990.– №3.– С. 74-78.
16. *Фридель Ж.* Дислокации.– М.: Мир, 1967.– 644 с.
17. *Rajotte R.V., Mazur P.* Survival of frozen-thawed fetal rat pancreases as a function of the permeation of dimethylsulfoxide and glycerol, warming rate and fetal ege // Cryobiology.– 1981.– Vol. 18, N1. – P. 17-31.
18. *Rubinsky B., Cravalho E.G.* An analytical method to estimate the range of cooling rates in frozen organs // Cryobiology.– 1980.– Vol. 17, N6.– P. 602-610.
19. *Rubinsky B., Cravalho E.G.* Mikis B. Thermal stresses in frozen organs // Cryobiology.– 1980.– Vol. 17, N1.– P. 66-73.
20. *Rasmussen D.H., MacKenzie A.P.* Phase diagram for the system water-dimethylsulphoxide // Nature.– 1968.– Vol. 220, N4.– P. 1315-1317.
5. *Kuleshova L.G., Rozanov L.F.* Role of structure of intracellular ice during cryodamage of cells. Coll. of Scientific papers. Modeling of cryobiological processes: Kharkov, 1988.– P. 25-34.
6. *Kuraksa V.M.* Study of metastable states of aqueous solutions of 1,2-prpane diol and their effect on damage of erythrocytes and kidneys during cryopreservation: Author's abstract of the thesis of cand. of biol. sci.- Kharkov. – 1987. - 20p.
7. *Kuchling H.* Physics. Reference book.– Moscow: Mir, 1983.– 519 p.
8. *Lebedinsky A.S., Zinchenko A.V., Petrenko A.Yu.* Effect of cyclic change in temperature in solid phase on the viability of cryopreserved rat's hepatocytes // Problems of Cryobiology.– 2002.– N3.– P. 48-51.
9. *Maeno N.* Science about ice.– Moscow: Mir, 1988.– 231 p.
10. *Osetsky A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M.* Studying the kinetics of devitrification of aqueous solutions of cryoprotectants by thermoplastic deformation method // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N2.– P. 137-146.
11. *Osetsky A.I., Kirilyuk A.L.* Experimental determination of threshold concentrations of cryoprotctive substances providing the inhibiting of mechanical damages of cryopreserved biological objects // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 245-247.
12. *Osetsky O.I.* Peculiarities of slowing-down of the processes of activating type in cooled condensed media: Author's abstract of the thesis of doctor of physical and mathematical sciences, Kharkov, 1997.– 38p.
13. *Osetsky A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M., Vysekantsev I.P.* Application of the method plastic deformation for determining of threshold concentrations of cryoprotective substances during cryopreservation of *Saccharomyces cerevisae* // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N1.– P. 71-79.
14. *Pushkar M.S., Gordienko E.O.* Damage of biological objects under low temperatures due to thermal tensions // Visnyk Akademii Nauk URSR.– 1987.– N5.– P. 26-31.
15. *Pushkar N.S., Osetsky A.I., Anenko V.I., Makarenko B.I.* Tensodilatometry of cooled solutions of cryoprotectants and tissues // Dokl. AN USSR, Ser. B.– 1990. – N3. – P. 74-78.
16. *Fridel J.* Dislocations.– Moscow: Mir, 1967.– 644 p.
17. *Rajotte R.V., Mazur P.* Survival of frozen-thawed fetal rat pancreases as a function of the permeation of dimethylsulfoxide and glycerol, warming rate and fetal ege // Cryobiology.– 1981.– Vol. 18, N1. – P. 17-31.
18. *Rubinsky B., Cravalho E.G.* An analytical method to estimate the range of cooling rates in frozen organs // Cryobiology.– 1980.– Vol. 17, N6.– P. 602-610.
19. *Rubinsky B., Cravalho E.G.* Mikis B. Thermal stresses in frozen organs // Cryobiology.– 1980.– Vol. 17, N1.– P. 66-73.
20. *Rasmussen D.H., MacKenzie A.P.* Phase diagram for the system water-dimethylsulphoxide // Nature.– 1968.– Vol. 220, N4.– P. 1315-1317.
21. *Wusteman M., Robinson M., Pegg D.* Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution // Cryobiology.– 2004.– Vol. 48, N1.– P. 179-189.
22. *Zinchenko V.D., Zinchenko A.V.* Acoustic emission during cooling and heating of aqueous solutions of polyethylene glycols of molecular masses from 300 to 3000 // Cryobiology.– 2003.– Vol. 47, N1.– P. 40-43.

Accepted in 17.07.2007

21. *Wusteman M., Robinson M., Pegg D.* Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution // *Cryobiology.*– 2004.– Vol. 48, N1.– P. 179-189.
22. *Zinchenko V.D., Zinchenko A.V.* Acoustic emission during cooling and heating of aqueous solutions of polyethylene glycols of molecular masses from 300 to 3000 // *Cryobiology.*– 2003.– Vol. 47, N1.– P. 40-43.

Поступила 17.07.2007