

## Применение метода пластической деформации для определения пороговых концентраций криопротекторных веществ при криоконсервировании дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*

UDC 57.043:612.111:536.54

A.I. OSETSKY, A.L. KIRILYUK\*, T.M. GURINA, I.P. VYSEKANTSEV

## Application of Plastic Strain Method to Determine Threshold Concentrations for Cryoprotective Substances During *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cell Cryopreservation

Изучали пластическую деформацию замороженных водных растворов глицерина и ПЭО-1500, установили изменение их пластических характеристик при достижении определенных (пороговых) концентраций криопротекторных веществ. Это изменение связывается с переходом локальных замкнутых жидкофазных включений в сквозные жидкие прослойки, что исключает развитие внутренних давлений и соответствующие механические повреждения криоконсервируемых биологических объектов. Данный вывод подтверждается экспериментами по криоконсервированию дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

**Ключевые слова:** пластическая деформация, предел текучести, кривые напряжение-деформация, глицерин, ДМСО, ПЭО-1500, *Saccharomyces cerevisiae*.

Вивчали пластичну деформацію заморожених водних розчинів гліцерину і ПЕО-1500 та встановили зміну їхніх пластичних характеристик при досягненні певних (порогових) концентрацій криопротекторних речовин. Ця зміна пов'язується з переходом локальних замкнутих рідких включень у наскрізні рідкі прошарки, що виключає розвиток внутрішніх тисків і відповідні механічні ушкодження при криоконсервуванні біологічних об'єктів. Даний висновок підтверджується експериментами з криоконсервування дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*.

**Ключові слова:** пластична деформація, межа текучості, криві напруження-деформація, гліцерин, ДМСО, ПЕО-1500, *Saccharomyces cerevisiae*.

Plastic strain of glycerol and PEO-1500 frozen aqueous solutions has been studied and an alteration in their plastic characteristics when achieving certain (threshold) concentrations of cryoprotective substances has been established. This change is associated to local closed liquid phase inclusion transition into the through liquid interlayers, that excludes an internal pressure development and corresponding mechanical damages in biological objects being under cryopreservation. This conclusion is confirmed by the experiments on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell cryopreservation.

**Key-words:** plastic strain, fluidity threshold, stress-strain curves, glycerol, DMSO, PEO-1500, *Saccharomyces cerevisiae*.

Эмпирическое решение проблемы подбора концентрации криопротекторного вещества, которое бы обеспечивало наибольшую сохранность клеток при криоконсервировании с наименьшим токсическим действием, не всегда эффективно. Учитывая широкое применение в криобиологии многокомпонентных криозащитных сред, нами разработаны новый подход к решению этой проблемы и метод для его реализации [6]. Этот метод позволяет определять пороговые концентрации криопротекторных веществ, обеспечивающих ингибирование механических повреждений криоконсервируемых биологических объектов в диапазоне концентраций с незначительным, токсическим

Using an empirical way to solve the problem of selecting cryoprotective substance concentration, which could provide the highest cell integrity under cryopreservation with the least toxic effect is not always efficient. Taking into account a wide application of polycomponent cryoprotective media in cryobiology, we have designed a new approach to solve this problem and the method for its realisation [6]. This method enables determining the threshold concentrations of cryoprotective substances, providing inhibition of mechanical damages in biological objects under cryopreservation within the concentration range with a slight toxic cryoprotective effect, *i. e.* namely in the area with the highest practical interest for cryobiology

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. Перейславская, 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

действием криопротектора, т. е. именно в той области, которая представляет наибольший практический интерес для криобиологии (0...15%). Первые для реализации этого метода были проведены исследования пластических свойств замороженных водных растворов диметилсульфоксида (ДМСО) в интервале концентраций 0...15% [6], что стало основанием для изучения других криопротекторов.

Цель работы – совершенствование технологий криоконсервирования биообъектов в результате нового подхода к определению оптимальных концентраций криопротекторных веществ.

### Материалы и методы

Исследовали пластическую деформацию замороженных водных растворов глицерина и ПЭО-1500 в области концентраций 0...30%. Образцы охлаждали со скоростью 4°C/мин до температуры на 30°C выше температуры стеклования, стабилизировали при этой температуре в течение 10 мин, затем осуществляли их пластическую деформацию. Регистрацию деформационных кривых образцов проводили при постоянной температуре, которая составила для водных растворов глицерина –70°C, а для ПЭО-1500 –50°C. Деформацию образцов осуществляли с помощью деформационной приставки комплекса для термопластических исследований [2, 5]. При построении кривых напряжение – деформация для деформационной приставки была специально разработана методика последовательных догрузок, прикладываемых к образцу через строго заданные промежутки времени, определяемые условиями эксперимента [6]. Величина внешних напряжений, вызываемых этими догрузками, находилась в интервале 0... $\sigma_{тек}$ , где  $\sigma_{тек}$  – предел текучести замороженных образцов.

Данный метод был применен для определения пороговых концентраций криопротекторных веществ ДМСО, глицерина и ПЭО-1500 при криоконсервировании дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (раса 608, получена из Российского НИИ хлебопекарской промышленности, Санкт-Петербург).

Предварительно проведены исследования по изучению возможного токсического действия различных концентраций ДМСО, глицерина и ПЭО-1500 на клетки *Saccharomyces cerevisiae*. Было установлено, что эти криопротекторные вещества в исследуемом концентрационном интервале не оказывают фунгицидного действия на данный тип клеток.

Дрожжевые клетки выращивали в течение 48 ч при 30°C на агаризованной среде Сабуро, затем подращивали в жидкой среде Сабуро в течение 24 ч с аэрацией, осаждали центрифугированием и ре-

(0...15%). For the first time for realising this method the plastic properties of frozen aqueous dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions within 0...15% concentration range were investigated [6], that became the base for studying other cryoprotectants.

The research was targeted to mastering the technologies for bioobject cryopreservation as a result of a new approach to determine optimal concentrations of cryoprotective substances.

### Materials and methods

A plastic strain of glycerol and PEO-1500 frozen aqueous solutions within 0...30% concentration range has been studied. Samples were cooled with 4°C/min rate down to the temperature of 30°C higher than vitrification one, stabilised under this temperature for 10 min with following plastic strain. The samples' strain curves were recorded at constant temperature of –70 and –50°C for glycerol and PEO-1500 aqueous solutions, correspondingly. Sample strain was done using a strain device to thermoplastic research complex [2, 5]. The method of successive uploads, applied to a sample via strictly fixed time intervals, determined by experiment conditions, was especially designed for strain device when plotting stress-strain curves [6]. The value of external tensions, caused by these uploads was within 0... $\sigma_{flu}$  interval, where  $\sigma_{flu}$  is fluidity limit for frozen samples.

This method was applied to detect the threshold concentrations for DMSO, glycerol and PEO-1500 cryoprotective substances under *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells (608 strain, obtained from Production Association of Russian R&D Institute of Baking Industry, St. Petersburg) cryopreservation.

A possible toxic effect of differently concentrated DMSO, glycerol and PEO-1500 on *Saccharomyces cerevisiae* cells was preliminarily investigated. These cryoprotective substances in studied concentration range were established not to cause an anti-fungal effect on this cell type.

Yeast cells were cultivated within 48 hrs at 30°C on an agarised Sabouraud's medium, grown up in a liquid Sabouraud's medium for 24 hrs with aeration, then precipitated with centrifugation and resuspended in preservation media: DMSO (chemically pure grade), glycerol (chemically pure grade) and PEO-1500 (chemically pure grade) aqueous solutions with 3, 5, 6, 7 and 10% concentrations. Yeast cell viability was determined using the Koch dish method [4] by the amount of macrocolonies, formed on agarised media. Serial dilutions of cell suspensions were done in 9% NaCl aqueous solution. Unfrozen cell suspensions in corresponding preservation media were taken as the control. Yeast cells were cryopreserved with programmable freezer "Cryoson" (Germany) in 2 ml plastic "Nunc" cryovials (Germany). Yeast cell suspension was

суспендировали в средах консервирования: водных растворах ДМСО (хч), глицерина (хч) и ПЭО-1500 (хч) с концентрациями 3, 5, 6, 7 и 10%. Жизнеспособность дрожжевых клеток определяли чашечным методом Коха [4] по количеству макроколоний, сформировавшихся на агаризованных средах. Серийные разведения клеточных суспензий проводили в 0,9%-м водном растворе NaCl. Для контроля брали не подвергавшиеся замораживанию суспензии клеток в соответствующих средах консервирования.

Криоконсервировали дрожжевые клетки на программном замораживателе "Cryoson" (Германия) в пластиковых криопробирках фирмы "Nunc" (Германия) объемом 2 мл. Суспензию дрожжевых клеток вносили в криопробирки по 1 мл и охлаждали со скоростью 1°C/мин, которая рекомендуется для данного вида клеток [9], до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 37°C до исчезновения твердой фазы. Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента [3]. Достоверность расчетов составила 95%.

### Результаты и обсуждение

Кривые напряжение – деформация для замороженных водных растворов глицерина и ПЭО-1500 (рис. 1, а, б) строили по экспериментальным зависимостям, которые были получены методом последовательных догрузок. Из полученных кривых определяли предел текучести  $\sigma_{тек}$  замороженных образцов и суммарное приращение их деформации ползучести  $\Delta\epsilon_{\Sigma}$  между последовательными догрузками в зависимости от концентрации криопротекторных веществ (рис. 2, 3). Данные результаты можно использовать для определения пороговых концентраций криопротекторных веществ, так как пластическая деформация замороженных криопротекторных растворов определяется их структурой и фазовым составом [8].

Рассматривая зависимость пластической деформации замороженных водных растворов криопротекторов от их концентрации при температурах выше температуры стеклования криопротектора, можно выделить три области, отвечающие различным пластическим характеристикам исследуемых образцов (рис. 4). В области, где концентрация криопротекторного вещества лежит в пределах  $0...C_n$  ( $C_n$  – пороговая концентрация криопротекторного вещества), в образце образуются жидкие замкнутые включения, располагающиеся по границам кристаллов льда (рис. 4, а). В этой области по мере увеличения концентрации криопротектора объем стеклюющейся фазы растет, что приводит к смыканию жидких микрофаз и образованию на

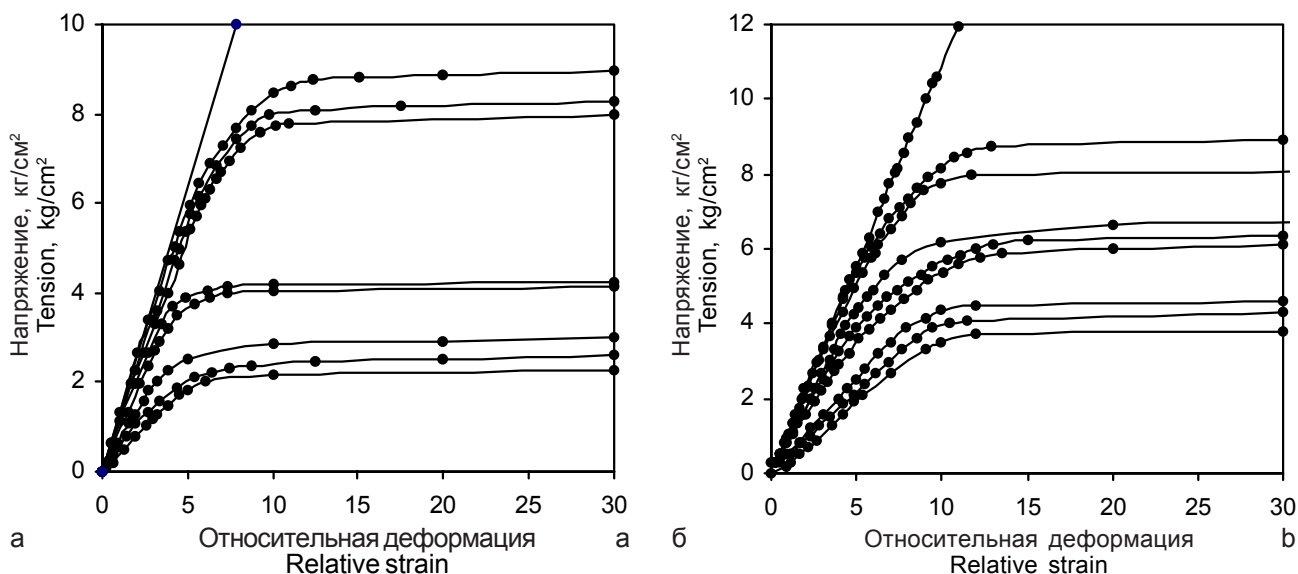
introduced into cryovials by 1 ml and cooled with the recommended for this cell type 1°C/min rate [9] down to -40°C with following immersion into liquid nitrogen. Samples were thawed on 37°C water bath up to a solid phase disappearance. The results obtained were statistically processed with Student's method [3]. Statistical significance of calculations made 95%.

### Results and discussion

Stress-strain curves for glycerol and PEO-1500 frozen aqueous solutions (Fig. 1 a, b) were plotted by the experimental dependencies, obtained by the method of successive additional loadings. Proceeding from the curves obtained there was determined the  $\sigma_{flu}$  fluidity threshold of frozen samples and a total increment of their  $\Delta\epsilon_{\Sigma}$  creep strain between successive uploads depending on cryoprotective substance concentration (Fig. 2, 3). These results may be used to find-out the threshold concentrations of cryoprotective substances, because a plastic strain of frozen cryoprotective solutions is determined by their structure and phase composition [8].

When considering the plastic strain dependency of frozen aqueous cryoprotective solutions on their concentration under temperatures higher than cryoprotectant vitrification one we can emphasise three ranges, corresponding to different plastic characteristics of studied samples (Fig. 4). In the range, where cryoprotective substance concentration is within the  $0...C_t$  limits ( $C_t$  is a threshold concentration of cryoprotective substance), the fluid closed inclusions, located on ice crystal interface are formed (Fig. 4, a). In this range with an increase in cryoprotective concentration there is the augmentation of vitrifying phase volume, resulting in the liquid microphase closing and thin liquid interlayer formation on grain interface under  $C_t$  threshold concentration. Following growth of cryoprotective concentration within the range of  $C_t...C_f$  values ( $C_f$  is the viscous flow concentration) results in the liquid interlayers extension between ice crystals (Fig. 4, b). Under concentration values higher than  $C_f$  the ice crystals of different form and value will be suspended in a non-vitrified liquid solution (Fig. 4, c).

It is reasonable that the nature of plastic strain of frozen samples, being in the described states, will significantly differ. Thus, in the range of up to threshold  $0...C_t$  concentrations (Fig. 4, a) the frozen sample's strain is mostly determined by mechanical properties of ice crystals. In this case the strain curves of studied samples are characterised with the presence of plastic strain stage, highly manifested fluidity limit and strain strengthening stage, that corresponds to a classic strain curve image for solid bodies [1]. Therefore under  $\sigma < \sigma_{flu}$  stress the uploads will cause only elastic strain, described by the expression:  $\Delta\epsilon_{elast} = \Delta\sigma/G$ , where  $G$  is the elasticity modulus. In their turn the  $\Delta\sigma$  stresses are



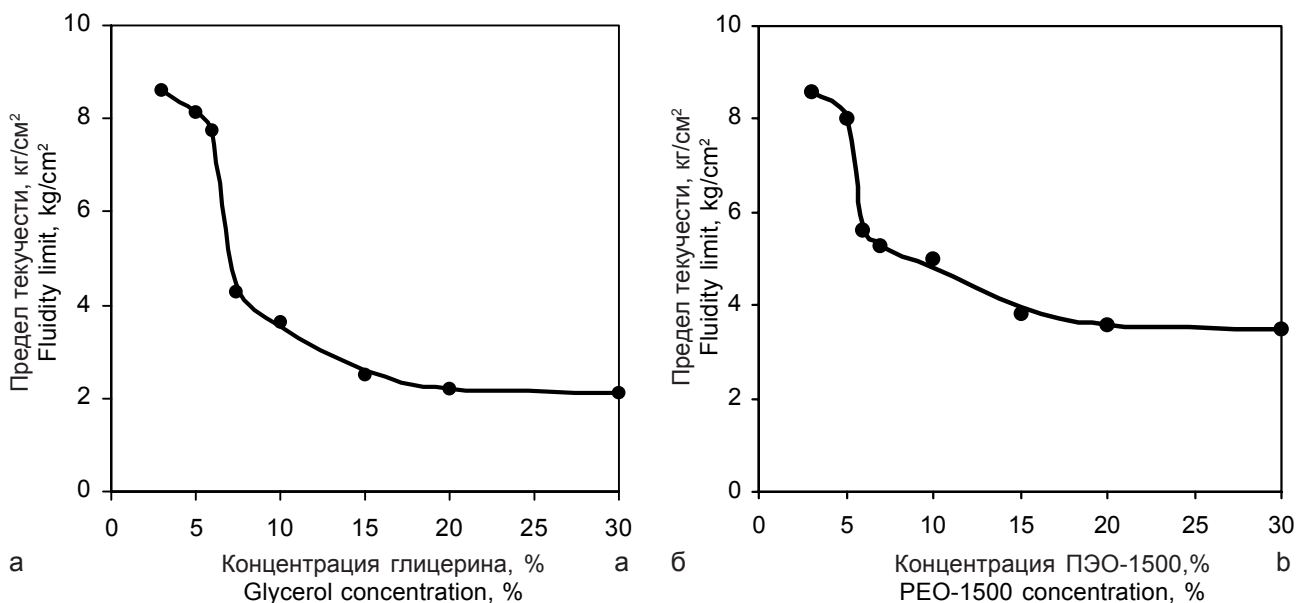
**Рис. 1.** Кривые напряжения - деформация замороженных водных растворов глицерина (а) и ПЭО-1500 (б) различной концентрации: 1 – дистиллированная вода; 2 – 3%-го водного раствора глицерина и ПЭО-1500; 3 – 5%-го; 4 – 6%-го; 5 – 7%-го; 6 – 10%-го; 7 – 15%-го; 8 – 20%-го; 9 – 30%-го.

**Fig. 1.** Stress-strain curves of differently concentrated glycerol (a) and PEO-1500 (b) frozen aqueous solutions: 1 – distilled water; 2 – 3% glycerol and PEO-1500 aqueous solution; 3 – 5%; 4 – 5%; 5 – 7%; 6 – 10%; 7 – 15%; 8 – 20%; 9 – 30%.

границах зерен тонких жидких прослоек при пороговой концентрации  $C_n$ . Дальнейший рост концентрации криопротектора в области значений  $C_n \dots C_T$  ( $C_T$  – концентрация вязкого течения) приводит к расширению жидких прослоек между кристаллами льда (рис. 4, б). При значениях концентраций выше  $C_T$  кристаллы льда различной формы и величины будут взвешены в незастеклованном жидком растворе (рис. 4, в).

Естественно, что природа пластической деформации замороженных образцов, находящихся в

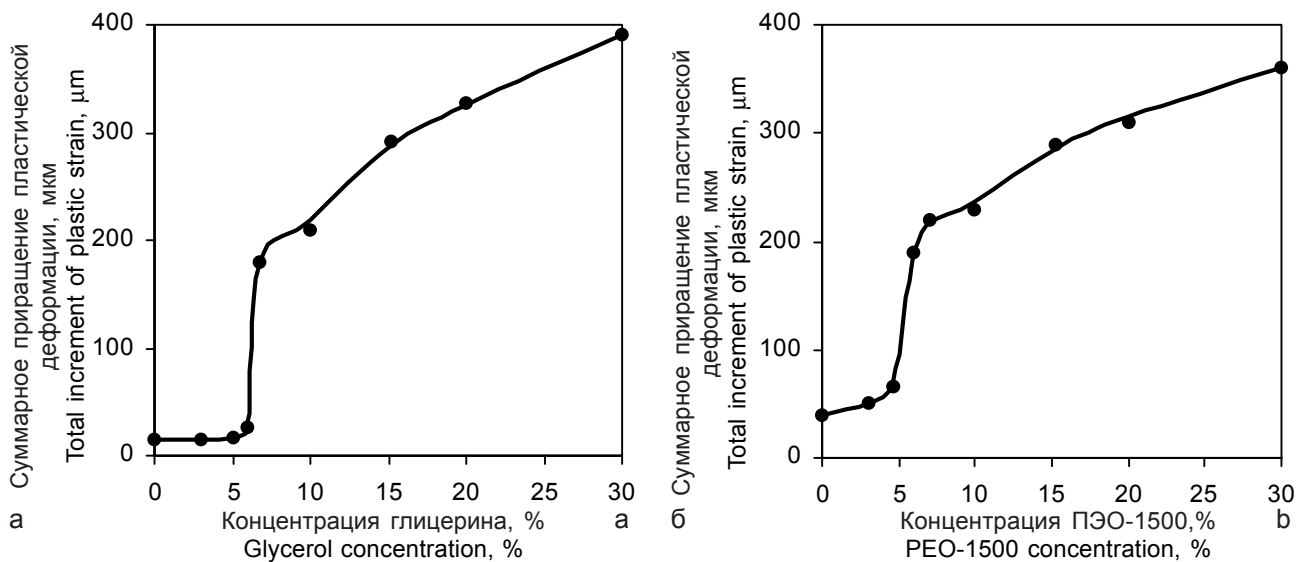
related to uploads by the ratio:  $\Delta\sigma = \Delta P/S$ , where  $\Delta P$  is the upload value;  $S$  is the cross-section area in shift plane. The creep strain, *i.e.* that after applying  $\Delta P$  uploads and proceeding in time under constant external stresses is practically equal to zero. In this case the effect of liquid closed microphases on separate ice crystal boundary is actually reduced to a decrease in sample's efficient cross-section area in shear plane that results in fluidity limit reduction. This increase in the given range is insignificant due to a low value of closed inclusions, but it should be taken into account



**Рис. 2.** Зависимость предела текучести замороженных водных растворов глицерина (а) и ПЭО-1500 (б) от концентрации криопротектора.

**Fig. 2.** Dependency of fluidity limit of glycerol (a) and PEO-1500 (b) frozen aqueous solutions on cryoprotectant concentration.





**Рис. 3.** Зависимость суммарного приращения пластической деформации  $\Delta\epsilon_{\Sigma}$  образцов между последовательными догрузками замороженных водных растворов глицерина (а) и ПЭО-1500 (б) от концентрации криопротектора.

**Fig. 3.** Dependency of total increment of plastic  $\Delta\epsilon_{\Sigma}$  strain of samples between gradual uploads of glycerol (a) and PEO-1500 (b) frozen aqueous solutions on cryoprotectant concentration.

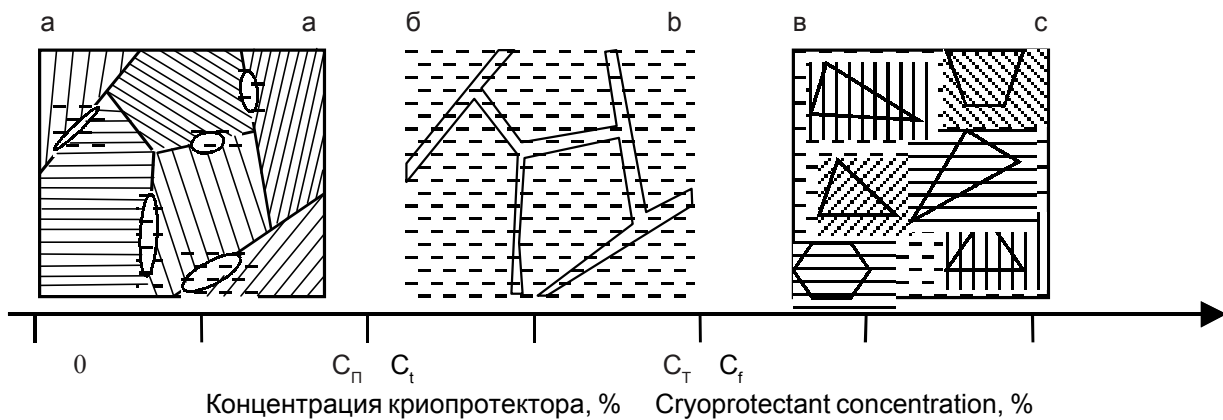
описанных состояниях, будет существенно отличаться. Так, в области до пороговых концентраций  $0 \dots C_n$  (рис. 4, а) деформация замороженных образцов в основном определяется механическими свойствами кристаллов льда. В этом случае деформационные кривые исследуемых образцов характеризуются наличием стадии упругой деформации, ярко выраженного предела текучести и стадии деформационного упрочнения, что соответствует классическому виду деформационной кривой твердых тел [1]. Поэтому при напряжениях  $\sigma < \sigma_{\text{тек}}$  догрузки будут вызывать только упругую деформацию, описываемую выражением:  $\Delta\epsilon_{\text{упр}} = \Delta\sigma/G$ , где  $G$  – модуль сдвига. В свою очередь напряжения  $\Delta\sigma$  связаны с догрузками соотношением:  $\Delta\sigma = \Delta P/S$ , где  $\Delta P$  – величина догрузки;  $S$  – площадь поперечного сечения образца в плоскости сдвига. Деформация ползучести, т.е. деформация после

when performing experiment and analysing the results obtained.

Ice crystal shifts relative to each other on the formed along their interface liquid interlayers will much more affect the frozen samples' plastic strain under  $\sigma < \sigma_{\text{flu}}$  external tensions when transferring into the range, corresponding to the  $C_t \dots C_f$  (Fig. 4, b). In this case the  $\dot{\epsilon}$  rate of plastic strain is determined either by solution viscosity in liquid interlayers or value and form of shearing ice crystals:

$$\dot{\epsilon} = \varphi \cdot \frac{\sigma \cdot \langle a \rangle}{\eta \cdot h},$$

where  $\varphi$  is the coefficient, considering ice crystal form in a shear plane;  $\sigma$  – is a value of applied external stress;  $\langle a \rangle$  – is an average thickness of liquid interlayer between crystals;  $h$  – is width of sample's shear area;  $\eta$  is a dynamic viscosity.



**Рис. 4.** Схематическое изображение изменения структуры замороженных водных растворов с ростом концентрации криопротекторного вещества.

**Fig. 4.** Scheme of change in frozen aqueous solution structure with concentration growth of cryoprotective substance.

приложения догрузки  $\Delta P$  и протекающая во времени при постоянных внешних напряжениях, практически равна нулю. В данном случае влияние жидких замкнутых микрофаз на границах отдельных кристаллов льда фактически сводится к уменьшению эффективной площади поперечного сечения образца в плоскости сдвига, что приводит к уменьшению предела текучести. Это уменьшение в данном интервале незначительно из-за малой величины замкнутых включений, но его следует учитывать при проведении экспериментов и анализе полученных результатов.

При переходе в область, соответствующую  $C_n \dots C_t$  (рис. 4, б), на пластическую деформацию замороженных образцов при внешних напряжениях  $\sigma < \sigma_{тек}$  все большее влияние будут оказывать сдвиги кристаллов льда друг относительно друга по образовавшимся вдоль их границ жидким прослойкам. В этом случае скорость пластической деформации  $\dot{\epsilon}$  определяется как вязкостью раствора в жидких прослойках, так и величиной и формой смешивающихся кристаллов льда:

$$\dot{\epsilon} = \varphi \cdot \frac{\sigma \cdot \langle a \rangle}{\eta \cdot h},$$

где  $\varphi$  – коэффициент, учитывающий форму кристаллов льда в плоскости сдвига;  $\sigma$  – величина приложенных внешних напряжений;  $\langle a \rangle$  – средняя толщина жидкой прослойки между кристаллами;  $h$  – ширина области сдвига образца;  $\eta$  – динамическая вязкость.

В результате возникающих под действием внешних напряжений микросдвигов по жидким прослойкам в данной области концентраций будут наблюдаться отличная от нуля и возрастающая с ростом концентрации криопротектора деформация ползучести, а также резкое уменьшение предела текучести.

В области вязкого течения, т. е. при концентрациях выше  $C_t$  (рис. 4, в), пластическая деформация исследуемых образцов определяется вязкостью жидкой фазы, а скорость пластической деформации:

$$\dot{\epsilon} = \varphi' \cdot \frac{\sigma}{\eta},$$

где  $\varphi'$  – коэффициент, учитывающий форму и размер кристаллов, взвешенных в незастеклованной жидкости с динамической вязкостью  $\eta$ . Для этой области характерна существенная зависимость деформации ползучести от температуры и концентрации жидкой фазы.

Такие отличия в природе пластической деформации замороженных криопротекторных растворов в выделенных концентрационных областях позволяют идентифицировать эти интервалы с помощью

As a result of microshears on liquid interlayers within this concentration range, occurred under external stress effect, a creep strain other than zero and increasing with cryoprotectant concentration growth, as well as a sharp reduction of fluidity limit will be observed.

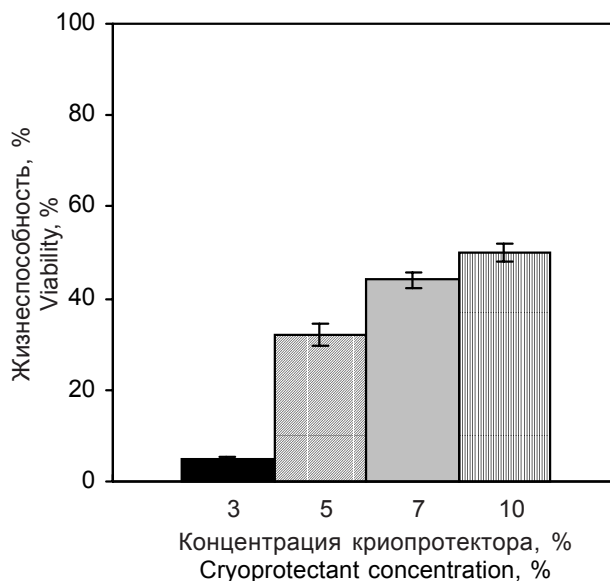
Within the viscous flow area, *i.e.* under concentrations higher than  $C_t$  (Fig. 4, c) a plastic strain of studied samples is determined by the liquid phase viscosity but the rate of plastic strain is:

$$\dot{\epsilon} = \varphi' \cdot \frac{\sigma}{\eta},$$

where  $\varphi'$  is the coefficient, considering form and dimension of crystals, suspended in a non-vitrified liquid with  $\eta$  dynamic viscosity. Significant dependency of creep strain on the liquid phase temperature and concentration is typical for this area.

These differences in plastic strain nature of frozen cryoprotective solutions in isolated concentration ranges enable to identify these intervals using plastic strain experiments. It is much more important that in each range the own specific damage mechanisms of cooled bioobject act.

Within the range of up to  $0 \dots C_t$  threshold concentrations (Fig. 4, a) the damage mechanisms of biological objects under temperatures higher than vitrification one



**Рис. 5.** Жизнеспособность дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (% от контроля) после замораживания и отогрева в зависимости от концентрации водного раствора ДМСО. ■ – 3%-го; ▨ – 5%-го; ▩ – 7%-го; □ – 10%-го. Представлены средние значения с учетом стандартных отклонений, вычисленных из 6 независимых определений.

**Fig. 5.** *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells viability (% of the control) after freeze-thawing depending on DMSO aqueous solution concentration. ■ – 3%; ▨ – 5%; ▩ – 7%; □ – 10%. Average values taking into account the standard deviations, calculated from 6 independent determinations are represented.

экспериментов по пластической деформации. Это тем более важно, что в каждой области действуют свои специфические механизмы повреждения охлаждаемых биообъектов.

В области до пороговых концентраций  $0 \dots C_n$  (рис. 4, а) механизмы повреждения биологических объектов при температурах выше температуры стеклования обусловлены, с одной стороны, пластической релаксацией термоупругих напряжений, которые вызваны неравномерностью температурного поля в объеме образца при нагреве или охлаждении и анизотропией теплового расширения кристаллов льда [7], с другой – пластической релаксацией давлений, возникающих в замкнутых жидкофазных включениях в процессе эвтектического расслоения раствора [6].

В области концентраций  $C_n \dots C_T$  (рис. 4, б) повреждения могут возникать только при релаксации термоупругих напряжений в относительно крупных кристаллах льда. При мелкокристаллической структуре льда механические повреждения практически не развиваются.

В области концентраций выше  $C_T$  (рис. 4, в) механические повреждения практически исключены. При данных концентрациях они могут наблюдаться только при температурах ниже температуры стеклования при высоких скоростях охлаждения – нагрева, приводящих к возникновению и пластической релаксации термоупругих напряжений.

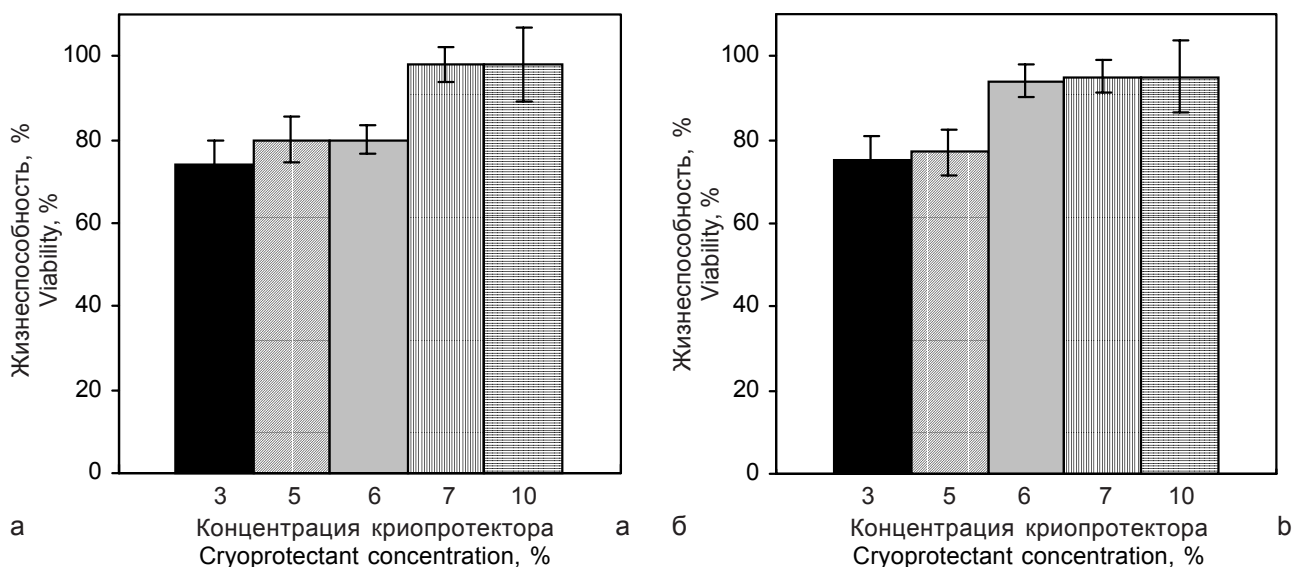
Таким образом, идентификация отмеченных концентрационных областей позволяет оптимизировать технологии криоконсервирования биообъек-

are stipulated by plastic relaxation of thermoelastic stress, caused by the temperature field non-uniformity in a sample volume under heating or cooling and anisotropy of heat extension of ice crystals, on one hand [7] and by plastic relaxation of stresses, appearing in closed liquid-phase inclusions during eutectic stratification of the solution, on another hand [6].

Within  $C_n \dots C_T$  (Fig. 4, b) concentration range the damages may occur only under thermoelastic stress relaxation in relatively large ice crystals. Under fine-crystal ice structure the mechanical damages do not practically develop.

Within the concentrations range higher than  $C_T$  (Fig. 4, c) the mechanical damages are practically excluded. Under these concentrations they may be observed only under temperatures lower than the vitrification one under high rates of cooling-heating, resulting in appearance of thermoelastic stress plastic relaxation as well.

Thus, the identification of the noted concentration ranges enables to optimise technologies for bioobject cryopreservation, that is confirmed by experiment results on studying the effect of differently concentrated cryoprotective substances on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell viability under cryopreservation. There was an uneven increase in cell viability after freeze-thawing in DMSO, PEO-1500 and glycerol presence when achieving their threshold 5, 6 and 7% concentrations, correspondingly (Fig. 5, 6). This fact may be explained by bioobject damage due to a plastic relaxation of tensions, occurring in closed liquid-phase inclusion. At the same time if the main part of damages was determined by osmotic or chemical mechanisms,



**Рис. 6.** Жизнеспособность дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (% от контроля) после замораживания и отогрева водного раствора глицерина (а) и ПЭО-1500 (б) в зависимости от концентрации криопротектора. ■ – 3%-го; ▨ – 5%-го; ▩ – 6%-го; ▪ – 7%-го; ▫ – 10%-го.

**Fig. 6.** *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell viability (% of the control) after freeze-thawing of glycerol (a) and PEO-1500 (b) aqueous solutions depending on cryoprotectant concentration. ■ – 3%; ▨ – 5%; ▩ – 6%; ▪ – 7%; ▫ – 10%.

тов, что подтверждается результатами экспериментов по изучению влияния различных концентраций криопротекторных веществ на жизнеспособность дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* при криоконсервировании. Жизнеспособность клеток после замораживания и отогрева в присутствии ДМСО, ПЭО-1500 и глицерина скачкообразно повышается при достижении их пороговых концентраций 5, 6 и 7% соответственно (рис. 5, 6). Этот факт можно объяснить повреждением биообъектов за счет пластической релаксации давлений, возникающих в замкнутых жидкофазных включениях. В то же время, если бы основная часть повреждений определялась осмотическими или химическими механизмами, обусловленными концентрационными эффектами в результате кристаллизации воды, то жизнеспособность клеток повышалась бы монотонно с увеличением концентрации криопротекторных веществ. Это связано с тем, что масса воды, переходящей в лед, а также вероятность возникновения соответствующих механизмов повреждения уменьшаются пропорционально росту концентрации криопротектора. Такое монотонное увеличение жизнеспособности клеток *Saccharomyces cerevisiae* наблюдается в присутствии ДМСО в интервале концентраций от 5% и выше (рис. 5), а глицерина и ПЭО-1500 она выходит на плато в пределах исследуемых концентраций после достижения пороговых значений. Скачкообразное же увеличение жизнеспособности клеток можно объяснить только качественно новым состоянием охлаждаемой системы, которое наступает при достижении пороговых концентраций криопротектора и обусловлено переходом от замкнутых жидкофазных включений к сквозным жидким прослойкам по границам образующихся кристаллов льда.

### Выводы

Впервые проведены исследования пластических свойств замороженных водных растворов таких криопротекторов, как глицерин и ПЭО-1500 выше температур стеклования и определены характерные концентрационные интервалы для них. Установлено, что при достижении пороговых концентраций криопротекторов изменяется структура замороженных объектов. Это изменение связано с переходом локальных замкнутых жидких включений, образующихся в области до пороговых концентраций  $0 \dots C_p$ , в жидкие прослойки. Такой переход исключает развитие внутренних давлений и ингибирует механические повреждения криоконсервируемых биообъектов. Предложенный новый подход к определению пороговых концентраций криопротекторных веществ был применен при криоконсервировании дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*. При этом наблюдалось скачко-

стипулированное концентрацией эффекты как результат воды кристаллизации, жизнеспособность клеток увеличилась бы монотонно с увеличением концентрации криопротекторных веществ. Это связано с тем, что масса воды, переходящая в лед, а также вероятность возникновения соответствующих механизмов повреждения уменьшаются пропорционально росту концентрации криопротектора. Это монотонное увеличение жизнеспособности дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* наблюдается в присутствии ДМСО в интервале концентраций от 5% и выше (рис. 5), а глицерина и ПЭО-1500 она выходит на плато в пределах исследуемых концентраций после достижения пороговых значений. Однако неравномерное увеличение жизнеспособности клеток может быть объяснено только качественно новым состоянием охлажденной системы, которое наступает при достижении пороговых концентраций криопротектора и обусловлено переходом от замкнутых жидкофазных включений к сквозным жидким прослойкам по границам образующихся кристаллов льда.

### Conclusions

For the first time there were investigated the plastic properties for frozen aqueous solution of such cryoprotectants as glycerol and PEO-1500 under temperatures higher than vitrification one and the typical concentration intervals were established for them. When achieving the threshold cryoprotectant concentrations the structure of frozen objects was established to change. This alteration is associated to transition of local closed liquid inclusions, formed within the range of up to threshold  $0 \dots C_t$  concentrations into liquid interlayers. This transition excludes development of internal pressures and inhibits mechanical damages of cryopreserved bioobjects. The proposed new approach to determine threshold concentrations for cryoprotective substances was applied during *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells cryopreservation. At the same time there was an uneven augmentation of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability after freeze-thawing with DMSO, glycerol and PEO-1500, that indicated to a general character of found phenomenon. The results obtained are important from practical point of view when optimising the cryopreservation technologies and they are of great importance for cryobiology in a whole.

### References

1. Whigley D.A. Mechanical properties of materials at low temperatures.- Moscow: Mir, 1974.- 373 p.
2. Gurina T.M. Study of phase state for frozen solutions of cryoprotectants, cell suspensions and tissues using the method of thermoplastic deformation: Author's abstract of thesis of cand. of biol. sciences.- Kharkov, 1993.- 18 p.
3. Lapin G.F. Biometry.- Moscow: Vyschaya shkola, 1989.- 239 p.



образное повышение жизнеспособности клеток *Saccharomyces cerevisiae* после замораживания и отогрева с ДМСО, глицерином и ПЭО-1500, что указывает на общий характер обнаруженного явления. Полученные результаты важны с практической точки зрения при оптимизации технологий криоконсервирования и имеют существенное значение для криобиологии в целом.

### Литература

1. *Вигли Д.А.* Механические свойства материалов при низких температурах.– М.: Мир, 1974.– 373 с.
2. *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.
3. *Лалин Г.Ф.* Биометрия.– М.: Высш. школа, 1989.– 239 с.
4. *Луста К.А., Фихте Б.А.* Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пущино, 1990.– 186 с.
5. *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.
6. *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.
7. *Павлушкин Н.М.* Химическая технология стекла и ситаллов.– М.: Стройиздат, 1983.– 432 с.
8. *Фридель Ж.* Дислокации.– М.: Мир, 1967.– 643 с.
9. *Smentek P., Windisch S.* Zur Frage des Überlebens von Hefestämmen unter flüssigem Stickstoff // Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. C.– 1982.– Vol. 3, N3.– S. 432-439.
4. *Lusta K.A., Fikhte B.A.* Methods for microorganisms' viability determination.– Puschino, 1990.– 186 p.
5. *Osetsky A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M.* Study of devitrification kinetics of cryoprotectant aqueous solutions using thermo-plastic deformation method // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N2.– P. 137-146.
6. *Osetsky A.I., Kirilyuk A.L.* Experimental determination of threshold concentrations of cryoprotective substances, providing inhibition of mechanical damages in cryopreserved bioobjects // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 245-247.
7. *Pavlushkin N.M.* Chemical technology of glass and glass-ceramics.– Moscow: Strojizdat, 1983.– 432 p.
8. *Fridel J.* Dislocations.– Moscow: Mir, 1967.– 643 p.
9. *Smentek P., Windisch S.* Zur Frage des Überlebens von Hefestämmen unter flüssigem Stickstoff // Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. C.– 1982.– Vol. 3, N3.– S. 432-439.

*Accepted in 24.02.2007*

*Поступила 24.02.2007*