

# Дифференциальная сканирующая тензодилатометрия в изучении процессов кристаллизации и плавления криопротекторных растворов

С.С. Севастьянов, А.И. Осецкий

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Differential Scanning Tensodilatometry in Study of Crystallization and Melting 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

В настоящее время установлено, что при охлаждении водных растворов с концентрацией глицерина, ДМСО, этиленгликоля, ПЭО-1500 в диапазоне 5–15% весовых образуются две кристаллические фазы (лёд и фаза  $\beta_c$ ), окруженные прослойками из застекловывшейся жидкой фракции. Этот факт хорошо подтверждается термограммами и термопластическими кривыми, получаемыми при последующем отогреве замороженных растворов. На них чётко фиксируются процессы расстеклования аморфных фракций и отдельные пики плавления обеих кристаллических фаз. Однако природа фазы  $\beta_c$ , возникающей в охлаждаемых водных растворах криопротекторных веществ, до сих пор не определена. В то же время без установления природы второй твёрдой фазы нельзя сформулировать принципы построения диаграмм состояния криопротекторных растворов, что не позволяет определить возможные механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов, связанных с возникновением этой фазы.

Очевидно, что для решения данной проблемы необходимо привлекать дополнительные методы исследования, позволяющие регистрировать температурные зависимости наиболее важных термодинамических параметров, одним из которых является объём системы  $V$ . Объёмные эффекты – объективные показатели происходящих в системе фазовых превращений. Кроме того, образование (плавление) кристаллов льда сопровождается увеличением (уменьшением) объёма системы, а образование (плавление) кристаллической или аморфной матрицы из молекул криопротекторного вещества, напротив, – его уменьшением (увеличением). Этот факт даёт дополнительные возможности для изучения природы образующейся фазы  $\beta_c$ .

В связи с этим была исследована кинетика кристаллизации-плавления водных растворов глицерина и ПЭО-1500 с помощью объёмной сканирующей дилатометрии. На основании экспериментально полученных для этих растворов в диапазоне 20...–150°C зависимостей  $V = V(T)$  сделаны следующие выводы:

– образование второй твёрдой фазы в охлаждаемых криопротекторных растворах имеет двухстадийный характер, что ингибирует её образование в процессе охлаждения и приводит к выраженному эффекту докристаллизации при последующем отогреве;

– у криопротекторных веществ, склонных к стеклованию (глицерин), докристаллизация в жидких фракциях сопровождается значительным увеличением суммарного объёма, что может приводить к механическому повреждению криоконсервируемых биообъектов [A.I. Osetsky *et al.*, 2007].

Nowadays It is established that cooling of aqueous solutions of glycerol, DMSO, ethylene glycol, PEO-1500 in the range of 5–15% (w/w) is accompanied by formation of two crystal phases (ice and  $\beta_c$  phase) surrounded by layers of vitrified liquid fraction. This fact is properly supported by thermograms and thermoplastic curves obtained by subsequent heating of frozen solutions. They clearly reflect devitrification processes in amorphous fractions and individual melting peaks of both crystal phases. However, it should be stated that the nature of the  $\beta_c$  phase appeared in the cooled aqueous solutions of cryoprotective substances has not been identified. At the same time, the principles of obtaining phase diagrams for cryoprotective solutions are not complete without determining the nature of the second solid phase. In addition, this does not allow to determine the possible mechanisms of freeze-thawing caused injury in biological objects, associated with the appearance of this phase.

It is obvious that to solve this problem there is a need of additional research methods allowing to register the temperature dependences of the most important thermodynamic parameters, one of which is the volume of system  $V$ . Volumetric effects are an objective indicator of phase transformations occurring in the system. Moreover, formation (melting) of ice crystals is accompanied by increase (decrease) of the system volume, and formation (melting) of crystal or amorphous matrix consisting of cryoprotectant molecules, on the contrary, by its decrease (increase). This fact provides additional possibilities in the study of the nature of  $\beta_c$  phase.

In this regard, we studied crystallization-melting kinetics of water solutions of glycerol and PEO-1500 using volumetric scanning dilatometry. On the basis of dependences  $V = V(T)$  experimentally obtained for these solutions within the range of 20...–150°C the following conclusions were made:

– formation of the second solid phase in cooled cryoprotective solutions has two-stage character, which inhibits its formation during cooling and leads to a significant additional crystallization effect during subsequent heating;

– if the cryoprotective agents are able to vitrification (e.g. glycerol), in the liquid fractions, additional crystallization is accompanied by a significant increase in their total volume which may result in mechanical damage of cryopreserved bioobjects [A.I. Osetsky *et al.*, 2007].

