

## Определение температурных интервалов фазовых преобразований в компонентах криозащитных сред методом термопластической деформации

UDC 57.043:612.111:536.54

T.M. GURINA\*, A.L. KIRILYUK

## Temperature Ranges of Phase Transformations in the Cryoprotective Media Components Determined by Thermoplastic Deformation Method

В представленной работе методом термопластической деформации изучали фазовые превращения, происходящие в многокомпонентных криозащитных средах и их составляющих при замораживании-оттаивании. Исследованы криопротекторный раствор ДМСО (10%) и компоненты криозащитных сред, наиболее часто используемых в качестве растворителя при криоконсервировании биообъектов (дистиллированная вода, физиологический раствор и культуральные среды: среда 199, раствор Хенкса, среда ДМЕМ). Определены температурные интервалы кристаллизации (плавления) смеси эвтектической концентрации раствора ДМСО (от  $-87$  до  $-67^{\circ}\text{C}$ ), эвтектической кристаллизации (плавления) физиологического раствора и культуральных сред (от  $-37$  до  $-21^{\circ}\text{C}$ ), рекристаллизации перед плавлением основной массы льда (от  $-21$  до  $-15^{\circ}\text{C}$ ) и далее непосредственно плавление основной массы льда (от  $-15$  до  $-4,5^{\circ}\text{C}$ ).

**Ключевые слова:** пластическая деформация, предел текучести, рекристаллизация, эвтектическая кристаллизация (плавление), криопротектор.

У представленій роботі методом термопластичної деформації вивчали фазові перетворення, що відбуваються у багатокомпонентних криозахисних середовищах та їх складових при заморожуванні-відтаванні. Досліджено криопротекторний розчин ДМСО (10%) і компоненти криозахисних середовищ, які найчастіше використовуються у якості розчинника при криоконсервуванні біоб'єктів (дистильована вода, фізіологічний розчин і культуральні середовища: середовище 199, розчин Хенкса, середовище ДМЕМ). Визначені температурні інтервали кристалізації (плавлення) суміші евтектичної концентрації розчину ДМСО (від  $-87$  до  $-67^{\circ}\text{C}$ ), евтектичної кристалізації (плавлення) фізіологічного розчину і культуральних середовищ (від  $-37$  до  $-21^{\circ}\text{C}$ ), рекристалізації перед плавленням основної маси льоду (від  $-21$  до  $-15^{\circ}\text{C}$ ) і далі безпосередньо плавлення основної маси льоду (від  $-15$  до  $-4,5^{\circ}\text{C}$ ).

**Ключові слова:** пластична деформація, межа текучості, рекристалізація, евтектична кристалізація (плавлення), криопротектор.

Phase transformations in multicomponent cryoprotective media and their components were investigated during freeze-thawing using the method of thermoplastic deformation. The research objects included solution of cryoprotectant DMSO (10%) and the components of cryoprotective media being often utilized as a solvents for biologicals' cryoprotective media (distilled water, physiological saline and the culture media: medium 199, Hanks' solution, DMEM). The paper represents the temperature ranges of crystallization (melting) of eutectic concentration mixture for DMSO solution (from  $-87$  to  $-67^{\circ}\text{C}$ ), eutectic crystallization (melting) of physiological solution and the culture media (from  $-37$  to  $-21^{\circ}\text{C}$ ), recrystallization before melting of bulk ice (from  $-21$  to  $-15^{\circ}\text{C}$ ) and following melting of bulk ice (from  $-15$  to  $-4.5^{\circ}\text{C}$ ).

**Key words:** thermoplastic deformation, fluidity limit, recrystallization, eutectic crystallization (melting), cryoprotectant.

Для разработки эффективных протоколов криоконсервирования и обеспечения максимальной сохранности деконсервированного биоматериала необходимо всесторонне и глубоко исследовать процессы, сопровождающие процедуру замораживания-оттаивания, изучить их природу и кинетику развития, поскольку они непосредственно связаны с повреждением и гибелью клеток.

Существует ряд современных методов, позволяющих исследовать фазовые и физические состояния замораживаемых образцов: рентгеноструктурный анализ [18], криомикроскопия [20, 21], радиоспектроскопия (ЯМР и ЭПР) [6, 9, 10, 13],

Development of effective cryopreservation protocols and providing the maximum survival of thawed biologicals should be accompanied with a thorough investigation of the processes accompanying the process of freeze-thawing, as well as with assessment of their nature and development kinetics, as they are directly associated with cell damages and death.

There is a number of modern techniques to study phase and physical states of freezing samples: X-ray analysis [18], cryomicroscopy [20, 21], radio spectroscopy (NMR and EPR) [6, 9, 10, 13], differential scanning calorimetry [8, 15, 28], the volumetric dilatometry [12, 19, 27].

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: gladiolus\_@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4111, fax: +380 57 373 3084, e-mail: gladiolus\_@mail.ru

дифференциальная сканирующая калориметрия [8, 15, 28], объемная дилатометрия [12, 19, 27].

В последние годы для исследования фазово-структурных превращений в растворах, наряду с калориметрией и дилатометрией, используется термомеханический анализ, который также является разновидностью термического анализа [2, 5, 22–24, 29, 33, 34]. Термомеханический анализ (ТМА) возник как метод исследования состояний полимеров при наблюдении их деформации с одновременным силовым и тепловым воздействием. Метод чаще всего применяется для наблюдения процесса перехода полимеров из стеклообразного в высокоэластическое состояние, а затем – в вязкотекучее [22], однако этим далеко не исчерпываются его возможности. Указанный метод используется также для изучения фазовых и структурных преобразований, которые происходят в исследуемых образцах при изменении температуры [22, 34]. При этом изменение температуры образца вызывает в нем процессы, характер, кинетика и степень неравновесности которых определяются, с одной стороны, заданным режимом изменения температуры, а с другой – молекулярной структурой, термической предысторией образца и релаксационной природой возникающих в нем процессов [22].

Метод термопластической деформации (метод ТПД) является частным случаем ТМА, который предполагает большее разнообразие в выборе режимов приложения нагрузки к образцам (импульсного или при постоянной нагрузке), температурного режима (при постоянной температуре или при строго регулируемых скоростях охлаждения-нагрева), временного фактора (времени действия внешней силы при определенной температуре) [22].

Цель работы – методом ТПД исследовать фазовые преобразования в криопротекторном растворе ДМСО (10%) и в наиболее часто используемых компонентах криозащитных сред (дистиллированная вода, физиологический раствор и культуральные среды) при криоконсервировании биообъектов.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили дистиллированная вода, физиологический раствор (0,9% NaCl), 10%-й раствор ДМСО (ОАО «Лубныфарм», Украина), приготовленный на дистиллированной воде и физиологическом растворе, а также наиболее часто используемые в практической криобиологии культуральные среды: среда 199 («Sigma», США), раствор Хенкса (ГУП ИПВЭ им. М.П.Чумакова РАМН), среда ДМЕМ («РАА», Австрия).

Для исследования фазовых превращений в вышеперечисленных растворах применяли метод ТПД [4, 11, 16]. Установка для его реализации

Recently, the studies of phase and structure transitions in solutions have been involved along with calorimetry and dilatometry the thermomechanical analysis, which is also a kind of thermal analysis [2, 5, 22–24, 29, 33, 34]. Thermomechanical analysis (TMA) has emerged as a method for studying the states of polymers by observing their deformation with simultaneous application of force and heat. The method is most often used to monitor the transition of polymers from the glassy in highly elastic state, and thereafter in a thick-flowing state [22], but this is far from being the limits of its potential. The mentioned method is also used for the study of phase and structure changes occurred in the samples along with changing the temperature [22, 34]. The changes in the temperature of the sample induce the processes, which nature, kinetics and degree of non-equilibrium are determined, on the one hand, by given regime of changes in temperature, and on the other hand, by molecular structure, thermal pre-history of the sample and the relaxation nature of the occurring processes [22].

Thermoplastic deformation method (TPD method) is a special case of TMA, which involves a greater variety in the choice of modes to apply the load to the samples (impulse or constant load), temperature regimen (constant temperature or a strictly controlled rate of cooling and heating), temporal factor (duration of the external force application at a certain temperature) [22].

The aim of this investigation was to study using TPD method the phase transformations in the cryoprotective solution of DMSO (10%) and the components of cryoprotective media (distilled water, physiological saline, and culture media) being most frequently used in cryopreservation of biologicals.

### Materials and methods

The objects under study were distilled water, physiological saline (0,9% NaCl), 10% solution of DMSO (Lubnyfarm, Ukraine) prepared on the base of distilled water or physiological saline, and the culture media, being most frequently used in applied cryobiology: medium 199 (Sigma, USA), Hank's solution (Chumakov Institute for Polymyelitis and Viral Encephalitis of Russian Academy of Medical Sciences), DMEM (PAA, Austria).

For the study of phase transformations in the above mentioned solution we used TPD method [4, 11, 16]. The device for its implementation was developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [25, 26]. In 1993, the complex underwent the internal certification, and in 2008 it was certified by Institute of Metrology (Attestation Certificate Nr. 435 of 28.01.2008). According to these documents, the absolute error of temperature measurement by the TPD method does not exceed 2.2°C.

разработана в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [25, 26]. В 1993 году комплекс прошел внутреннюю аттестацию, а в 2008 году – государственную метрологическую аттестацию в ННЦ «Институт метрологии» (аттестационное свидетельство № 435 от 28.01.2008 г.). Согласно этим документам абсолютная погрешность измерения температур методом ТПД не превышает 2,2°C.

По экспериментальным термопластическим кривым (в дальнейшем – ТПД-кривые) определяли характерные точки или температурные интервалы, соответствующие тем или иным фазовым превращениям в изучаемых образцах.

Образец объемом  $0,5 \times 10^{-6} \text{ м}^3$  помещали в деформирующее устройство, охлаждали с заданной постоянной скоростью до конечной температуры  $-160 \dots -180^\circ\text{C}$  и выдерживали его при этой температуре в течение 10 мин. Затем к нему прикладывали постоянное внешнее деформирующее напряжение  $\sigma$ , величина которого не превышала предела текучести исследуемого образца. Внешнее деформирующее напряжение  $\sigma$  – способ усиления сигналов, соответствующих внутренним преобразованиям в образце при изменении температуры с заранее заданной скоростью, позволяет более точно определить граничные значения этих температурных интервалов. Далее образец нагревали с постоянной скоростью 1 град/мин и в режиме чистого сдвига регистрировали ТПД-кривую в координатах «деформация-температура». Температурные интервалы фазово-структурных превращений определяли по отклонению экспериментальной кривой от касательных, проведенных к участкам ТПД-кривой с постоянной скоростью течения.

Для изучения упругопластических свойств образцов использовали методику последовательных нагрузок через заданные промежутки времени [11, 17], которая позволяет определять различные механические характеристики объектов, изначально находящихся в жидком состоянии (в том числе пределы текучести  $\sigma_{\text{тек}}$  и упругости  $\sigma_{\text{упр}}$ ). Согласно этой методике образцы охлаждали со скоростью 4 град/мин до заданной температуры, стабилизировали при конечной температуре в течение 10 мин, а затем осуществляли пластическую деформацию образцов путем последовательного приложения нагрузок. Промежутки времени между последовательными приложениями нагрузок во всех случаях были одинаковы и составляли 4 мин. Регистрацию деформационных кривых проводили при постоянной температуре. По полученным экспериментальным деформационным кривым строили кривые деформация-напряжение и определяли механические характеристики исследуемых объектов.

The experimental thermoplastic curves (hereinafter, TPD curves) were used to determine the characteristic points or temperature ranges, corresponding to various phase transitions in the studied samples.

Sample of  $0,5 \times 10^{-6} \text{ м}^3$  was placed in deforming chamber, cooled with a given constant rate to a final temperature of  $-160 \dots -180^\circ\text{C}$  and left for 10 minutes at this temperature. Then it was applied to the constant external deformation tension  $\sigma$ , the value of which did not exceed the fluidity limit of the sample. External deformation tension  $\sigma$  is used to enhance the signals corresponding to the internal transformations in the sample during temperature changes with a predetermined rate, and allows to define more precisely the limits of the temperature ranges. The sample was heated thereafter with a constant rate of 1 degree/min and TPD curve was recorded in the mode of pure shear in coordinates 'deformation vs. temperature'. Temperature ranges of the phase and structure transformations were determined by the deviation of the experimental curve from tangents drawn to areas of TPD curve with constant flow rate.

To study the elasto-plastic properties of the samples we used the method of consecutive loads in a specified time periods [11, 17], which allowed to determine different mechanical properties of objects, being initially in the liquid state (including the fluidity limits  $\sigma_{\text{fl}}$  and elasticity limits  $\sigma_{\text{elast}}$ ). According to this method, the samples were cooled with a rate of 4 deg/min down to a predetermined temperature, then stabilized at the final temperature for 10 min, and thereafter the plastic deformation of the samples was carried out by the consecutive loads application. Time intervals between consecutive loads applications were equal in all cases, and made 4 minutes. Deformation curves were recorded at a constant temperature. According to the obtained experimental deformation curves the deformation-strain curves were plotted and mechanical properties of the objects were determined.

## Results and discussion

Fig. 1 shows the experimental TPD curves obtained for distilled water by applying a series of consecutive values of the deformation tension  $\sigma$ ,  $\text{kg/m}^2$ :  $0.13 \times 10^5$ ;  $0.4 \times 10^5$ ;  $0.67 \times 10^5$ ;  $1.33 \times 10^5$ ;  $2.6 \times 10^5$ ;  $4.0 \times 10^5$  and  $6.6 \times 10^5$ . The cooling rate of the samples,  $V_{\text{cool}}$ , was 4 deg/min and heating rate,  $V_{\text{heat}}$ , made 1 deg/min.

In the case of extremely small value of deformation tension ( $\sigma < 0.13 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$ ) the ice starts to melt at the temperatures close to  $0^\circ\text{C}$ , corresponding to the equilibrium melting temperature of ice (Fig. 1, curve 1). At relatively low values of the deformation tension ( $0.13 \times 10^5 \text{ kg/m}^2 < \sigma < 1.33 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$ ) the temperature of structure changes corresponding to the start of the ice melting is almost independent of  $\sigma$  (Fig. 1, curves 2–4). The higher the  $\sigma$  value the more clearly the

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены экспериментальные ТПД-кривые, полученные для дистиллированной воды при приложении ряда последовательных значений деформирующего напряжения  $\sigma$ , кг/м<sup>2</sup>:  $0,13 \times 10^5$ ;  $0,4 \times 10^5$ ;  $0,67 \times 10^5$ ;  $1,33 \times 10^5$ ;  $2,6 \times 10^5$ ;  $4,0 \times 10^5$  и  $6,6 \times 10^5$ . Скорость охлаждения образцов  $V_{\text{охл}}$  составляла 4 град/мин, а скорость нагрева  $V_{\text{наг}}$  – 1 град/мин.

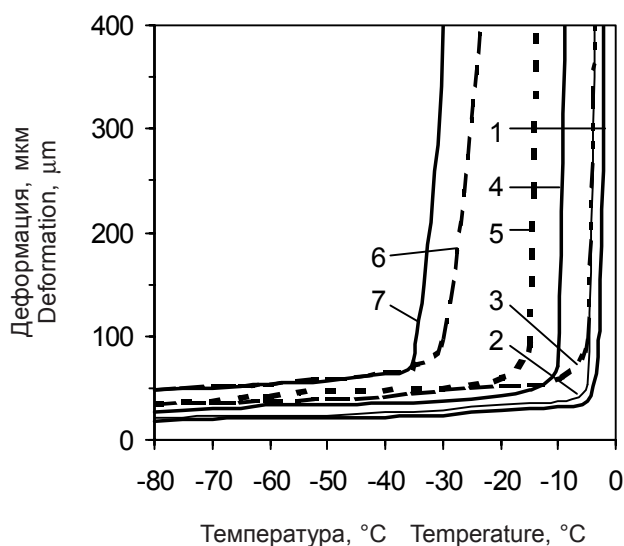
В случае предельно малого значения деформирующего напряжения ( $\sigma < 0,13 \times 10^5$  кг/м<sup>2</sup>) плавление льда начинается при температурах, близких к 0°C, что соответствует равновесной температуре плавления льда (рис. 1, кривая 1). При относительно небольших значениях деформирующего напряжения ( $0,13 \times 10^5$  кг/м<sup>2</sup>  $< \sigma < 1,33 \times 10^5$  кг/м<sup>2</sup>) температура структурных преобразований, соответствующих началу процесса плавления льда, практически не зависит от  $\sigma$  (рис. 1, кривые 2–4). Чем больше значение  $\sigma$ , тем более четко на ТПД-кривых прослеживается описываемая зависимость от величины приложенного деформирующего напряжения  $\sigma$  (рис. 1, кривые 5–7). Однако следует учитывать, что такая закономерность свойственна только для величины деформирующего напряжения, не превышающей предела упругости льда при данной температуре.

Экспериментальные данные, представленные на рис. 1, в дальнейшем будут использованы при обсуждении ТПД-кривых для других растворов.

Так как живые организмы в основном состоят из воды, то представления о механических характеристиках льда дают возможность понять физико-механические свойства биообъектов при различных температурах, а также процессы, происходящие в них при замораживании.

Известно, что лед обладает как пластическими, так и упругими свойствами, т. е. лед способен, с одной стороны, течь, когда к нему приложена определенная внешняя нагрузка, а с другой – противодействовать внешней силе, стремясь сохранить свою форму [7, 14, 31]. Наличие у льда жесткости и упругих свойств обусловлено водородными связями, формирующими его кристаллическую структуру. Например, при  $-10^\circ\text{C}$  модуль Юнга для льда, зависящий от упругих свойств, равен примерно  $9 \times 10^9$  Па [14], что почти совпадает по величине со значениями модуля Юнга для металлов. Однако если приложенная сила превышает по величине некоторое предельное значение (предел текучести), то начинается пластическая деформация образца.

Криозащитные среды представляют собой сложную гетерогенную систему. При температурах, близких к температуре жидкого азота, они состоят из двух твердых фаз: кристаллов льда и за-



**Рис. 1.** ТПД-кривые дистиллированной воды при скорости охлаждения 4 град/мин, скорости нагрева 1 град/мин и различном внешнем напряжении  $\sigma$  (кг/м<sup>2</sup>): 1 –  $0,13 \times 10^5$ ; 2 –  $0,4 \times 10^5$ ; 3 –  $0,67 \times 10^5$ ; 4 –  $1,33 \times 10^5$ ; 5 –  $2,6 \times 10^5$ ; 6 –  $4 \times 10^5$ ; 7 –  $6,6 \times 10^5$  ( $\sigma < \sigma_{\text{упр}}$ ).

**Fig. 1.** TPD-curves of distilled water at cooling rate of 4 deg/min, heating rate of 1 deg/min and various external deformation tension  $\sigma$  (kg/m<sup>2</sup>): 1 –  $0.13 \times 10^5$ ; 2 –  $0.4 \times 10^5$ ; 3 –  $0.67 \times 10^5$ ; 4 –  $1.33 \times 10^5$ ; 5 –  $2.6 \times 10^5$ ; 6 –  $4 \times 10^5$ ; 7 –  $6.6 \times 10^5$  ( $\sigma < \sigma_{\text{elast}}$ ).

described dependence on the applied deformation tension  $\sigma$  is visible on the TPD curves (Fig. 1, curves 5–7). Of note is, however, that such a regularity is only true for the values of the deformation tension which do not exceed the elastic limit of the ice at the given temperature.

The experimental data presented in Fig. 1, will be used later in the discussion of the TPD curves for other solutions.

Since living organisms are composed mainly of water, the understanding of the mechanical properties of ice allows to reveal the physical and mechanical properties of biologicals at different temperatures, as well as the processes occurring inside them during freezing.

The ice is known to have both plastic and elastic properties, *i. e.*, on the one hand, the ice can flow, if it is under certain external load, and on the other hand, it can counteract the external force in order to maintain its shape [7, 14, 31]. The ice possess rigidity and elastic properties due to the hydrogen bonds forming its crystal structure. For example, at  $-10^\circ\text{C}$  the Young's modulus of ice, depending on the elastic properties, makes approximately  $9 \times 10^9$  Pa [14], which is almost equal to the values of Young's modulus of metals. However, if the applied force exceeds the certain limit (fluidity limit), the plastic deformation of the sample begins.

Cryoprotective media are a complex heterogeneous systems. At the temperatures close to the temperature

стекловывшейся аморфной фазы. Эти структурные составляющие обладают различными механическими свойствами, которые зависят от соотношения кристаллической и аморфной фаз. При малых концентрациях криопротекторного вещества в растворе основной вклад в его упругопластические свойства вносят кристаллы льда. С ростом концентрации криопротектора увеличивается вклад стеклообразной фазы.

Поскольку принципы определения параметров, характеризующих упругопластические свойства как для кристаллических, так и аморфных тел, одинаковы, то они применимы и для изучения механических характеристик солевых и криопротекторных растворов [1, 2]. Эти характеристики отражают суммарные свойства замороженных образцов, которые имеют и кристаллическую, и аморфную фазы.

С помощью методики определения механических свойств образцов путем последовательных нагрузок [11, 17] получена графическая зависимость пределов текучести от температуры для льда (рис. 2, кривая 1) и замороженных растворов: физиологического (кривая 2), среды 199 (кривая 3) и 10%-го водного раствора ДМСО (кривая 4).

По абсолютной величине предел упругости льда всегда меньше предела его текучести при одной и той же температуре (на рис. 2 пунктирной линией показан предел упругости льда, полученный по методике последовательных нагрузок).

Таким образом, если в эксперименте используется деформирующее напряжение  $\sigma < \sigma_{упр}$ , образец находится в области упругих деформаций, что исключает возможность пластического течения льда. В этом случае изменение величины деформации на ТПД-кривых может быть вызвано только процессами, связанными с фазовыми превращениями, происходящими в межкристаллических прослойках льда. Это является основным критерием для выбора деформирующих напряжений при определении температурных интервалов возможных фазовых переходов и структурных превращений, в которых необходимо варьировать скорости охлаждения-нагрева для получения эффективного режима криоконсервирования клеточных суспензий. Предел упругости льда определяет максимальное значение деформирующего напряжения, при превышении которого имеется вероятность неадекватной трактовки перегибов на ТПД-кривой.

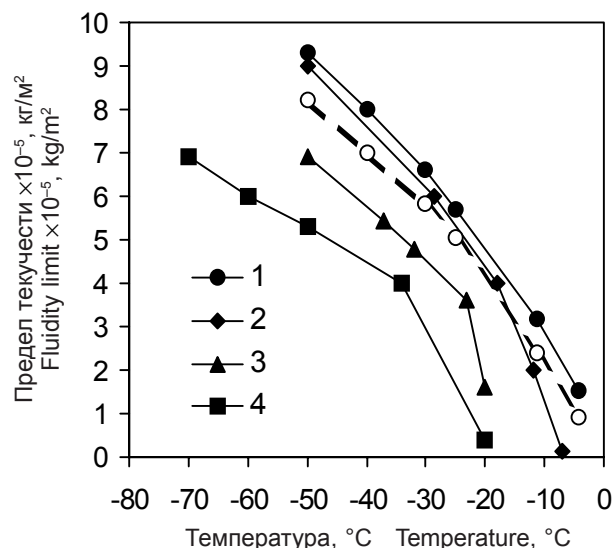
Еще одним критерием выбора величины деформирующего напряжения при получении экспериментальных ТПД-кривых является конкретный вид исследуемого фазового превращения, поскольку каждому структурному преобразованию в криозащитном растворе сложного состава соответствует

of liquid nitrogen, they consist of two solid phases: ice crystals and glassy amorphous phase. These structural elements have different mechanical properties that depend on the ratio of the crystal and amorphous phases. At low concentrations of cryoprotective agents in the solution the main contribution to its elastoplastic properties is made by ice crystals. Along with the rise of cryoprotectant's concentration the contribution of glassy phase increases.

Since the principles of determining the parameters that characterize the elastoplastic properties of both crystal and amorphous materials are the same, they are applicable to the study of the mechanical properties of both salines and cryoprotective solutions [1, 2]. These characteristics reflect the combined properties of frozen samples that contain both crystalline and amorphous phases.

Using the method for determining the mechanical properties of the samples by consecutive loads application [11, 17], we obtained the graphical dependence of fluidity limits vs. temperature for ice (Fig. 2, curve 1) and the frozen solutions: physiological saline (curve 2), medium 199 (curve 3) and 10% aqueous solution of DMSO (curve 4).

The absolute value of the elastic limit of the ice is always less than the limit of its fluidity at the same temperature (in Fig. 2 the dashed line shows the elastic limit of the ice obtained by the method of consecutive loads).



**Рис. 2.** Зависимости пределов текучести от температуры: 1 – для льда; замороженных растворов: 2 – физиологического раствора; 3 – среды 199; 4 – 10%-го водного раствора ДМСО. Скорость охлаждения образцов 4 град/мин. Пунктирная линия соответствует пределу упругости льда.

**Fig. 2.** Dependence of fluidity limit vs. temperature: 1 – for ice; frozen solutions: 2 – physiological saline, 3 – medium 199, 4 – 10% aqueous solution of DMSO. Samples cooling rate was 4 deg/min. Dashed line corresponds to the elastic limit of ice.

вполне определенный температурный интервал на ТПД-кривой.

Для изучения фазовых превращений и структурных преобразований, которые происходят на этапе нагрева образца в межкристаллических прослойках при температурах ниже  $-40 \dots -50^\circ\text{C}$  (расстеклование межкристаллических прослоек, плавление смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора и рекристаллизация перед плавлением смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора [30]), деформирующее напряжение согласно рис. 1 должно быть не более  $6,6 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$ . Конкретное значение деформирующего напряжения  $\sigma$  для криопротекторного раствора зависит от вида криопротектора, его концентрации и определяется по зависимости предела текучести от температуры для этого раствора, полученной аналогично кривой 4 на рис. 2.

Для исследования фазовых превращений, которые происходят в процессе нагрева образца в температурной области выше температуры эвтектики криопротектора (эвтектическое плавление физиологического раствора или культуральной среды, плавление основной массы льда, рекристаллизация, предшествующая этим двум видам плавления [30]), деформирующее напряжение должно быть  $2,6 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$  и ниже, вплоть до  $0,13 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$ .

Таким образом, изменяя величину деформирующего напряжения  $\sigma$ , по ТПД-кривым можно исследовать кинетику фазовых превращений, происходящих в процессе замораживания-оттаивания, и определять соответствующие им температурные интервалы для каждой составляющей многокомпонентной криозащитной среды.

Если криозащитная среда представляет собой водный раствор криопротектора, то при охлаждении (нагреве) имеют место такие процессы, как стеклование (расстеклование) межкристаллических прослоек, кристаллизация (плавление) смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора и рекристаллизация, предшествующая плавлению. Если в качестве основы для криопротекторного раствора используется физиологический раствор или культуральная среда, то к вышеуказанным процессам следует добавить фазовые преобразования, связанные с наличием солевых компонентов. На этапе охлаждения это эвтектическая кристаллизация, а на этапе нагрева – эвтектическое плавление и рекристаллизация перед ним. Для всех растворов необходимо учитывать кристаллизацию основной массы воды при охлаждении и плавление основной массы льда с предшествующей рекристаллизацией при нагреве.

Для примера на рис. 3 представлены ТПД-кривые растворов криопротектора ДМСО 10%-й кон-

Thus, if the experiment utilizes the deformation tension  $\sigma < \sigma_{\text{elast}}$ , the sample is in the region of elastic deformation, which excludes the possibility of plastic flow of the ice. In this case, the changes in the deformation values on the TPD curves can be caused solely by processes associated with phase transitions occurring in ice intercrystal layers. This is the main criterion for the selection of the deformation tension for determining the temperature ranges of possible phase transitions and structure transformations, where the cooling-heating rates should be varied to get an effective regimen for cryopreservation of cell suspensions. The elastic limit of the ice determines the maximum value of deformation tension, with exceeding of which there is a possibility of inadequate interpretation of kinks on the TPD curve.

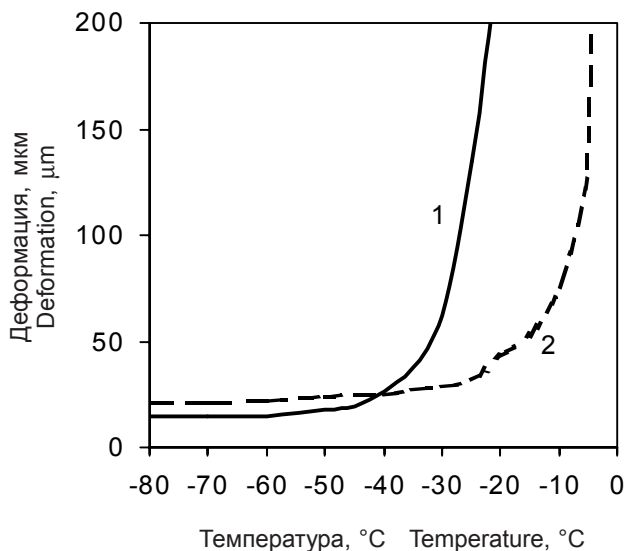
Another criterion for selecting the deformation tension values to obtain experimental TPD curves is a certain pattern of studied phase transformation, as each structural transformation in the complex cryoprotective solution corresponds to a specific temperature range on TPD curve.

Investigation of phase transformations and structure changes occurring during rewarming of the sample in the intercrystal layers at the temperatures below  $-40 \dots -50^\circ\text{C}$  (devitrification of intercrystal layers, melting of the eutectic concentration mixture of cryoprotectant solution and recrystallization prior to melting of the eutectic concentration mixture of cryoprotectant solution [30]) should be conducted with deformation tension values not be higher than  $6.6 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$  according to Fig. 1. The specific value of the deformation tension  $\sigma$  for cryoprotective solution depends on the type of cryoprotectant, its concentration and is determined from the dependence of the fluidity limit vs. the temperature for this solution, obtained in similar way as curve 4 in Fig. 2.

For the study of phase transformations occurring during rewarming of the sample at the temperatures above the eutectic temperature of the cryoprotectant (eutectic melting of physiological saline or culture medium, melting of the bulk ice, recrystallization prior to these two types of melting [30]), deformation tension should be  $2.6 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$  and less, down to  $0.13 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$ .

Thus, by changing the value of the deformation tension  $\sigma$ , one could use the TPD curves for studying the kinetics of phase transformations occurring in the process of freeze-thawing, and to determine the corresponding temperature ranges for each component of a multicomponent cryoprotective media.

If cryoprotective media is an aqueous solution of cryoprotectant, the cooling (heating) is accompanied with the processes such as vitrification (devitrification) of intercrystal layers, crystallization (melting) of eutectic mixture of cryoprotectant solution and recrystallization prior to melting. If the basis for the cryoprotective



**Рис. 3.** ТПД-кривые раствора ДМСО 10% концентрации на основе: 1 – дистиллированной воды; 2 – физиологического раствора при одних и тех же условиях эксперимента:  $V_{\text{охл}} = 4$  град/мин;  $V_{\text{нагр}} = 1$  град/мин;  $\sigma = 0,13 \times 10^5$  кг/м<sup>2</sup>.

**Fig. 3.** TPD curves of 10% DMSO solution based on: 1 – distilled water; 2 – physiological saline in the same experimental conditions:  $V_{\text{cool}} = 4$  deg/min;  $V_{\text{heat}} = 1$  deg/min;  $\sigma = 0.13 \times 10^5$  kg/m<sup>2</sup>.

центрации на дистиллированной воде (кривая 1) и на физиологическом растворе (кривая 2), полученные при одних и тех же условиях эксперимента:  $V_{\text{охл}} = 4$  град/мин;  $V_{\text{нагр}} = 1$  град/мин;  $\sigma = 0,13 \times 10^5$  кг/м<sup>2</sup>.

При такой величине деформирующего напряжения  $\sigma$  на обеих ТПД-кривых перегибы, отвечающие расстеклованию межкристаллических прослоек и плавлению смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора, не видны в интервалах температур, соответствующих этим процессам.

Резкое увеличение скорости деформации образца на кривой 1 (рис. 3) при  $-45^\circ\text{C}$  связано с запоздавшим плавлением смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора. Причем это именно сместившееся плавление смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора в межкристаллической прослойке, так как согласно рис. 2 (кривая 4) предел текучести этого раствора при данной температуре имеет значительно большее значение.

На кривой 2 (рис. 3) отчетливо прослеживается процесс эвтектического плавления физиологического раствора в температурном диапазоне от  $-37$  до  $-21^\circ\text{C}$ , что согласуется со справочными данными для температуры эвтектики водного раствора NaCl соответствующей концентрации [3]. Солевой раствор эвтектической концентрации в области заэвтектических температур (ниже  $-21^\circ\text{C}$ ), находясь в твердофазном состоянии, в межкристаллических прослойках играет роль «армирующей сетки» и этим полностью нивелирует эвтектическое плавление раствора криопротектора.

Наличие температурного интервала, обусловленного эвтектической кристаллизацией водного раствора NaCl, отличает ТПД-кривую для криопротекторного раствора на основе физиологического раствора или культуральной среды от ТПД-кривой

solution is a physiological saline or culture medium, the stated above processes are supplemented with phase transformation due to the presence of salt components. At the stage of cooling this is eutectic crystallization, and at the stage of heating this is eutectic melting and recrystallization prior to this. For all the solutions one should take into account the crystallization of bulk water during cooling and the melting of bulk ice with preceding recrystallization during rewarming.

Fig. 3 shows the examples of the TPD curves for 10% DMSO cryoprotectant solutions based on distilled water (curve 1) and physiological saline (curve 2) obtained at the same experimental conditions:  $V_{\text{cool}} = 4$  deg/min;  $V_{\text{heat}} = 1$  deg/min;  $\sigma = 0,13 \times 10^5$  kg/m<sup>2</sup>.

With this value of the deformation tension  $\sigma$  the kinks in both TPD curves which reflect devitrification of intercrystal layers and melting of eutectic mixture of cryoprotectant solution are not present in the temperature ranges corresponding to these processes.

The sharp increase in the rate of deformation of the sample on the curve 1 (Fig. 3) at  $-45^\circ\text{C}$  is due to the belated melting of eutectic mixture of cryoprotectant solution. Moreover this is namely the shifted melting of the eutectic mixture of the cryoprotectant solution in intercrystal layers, since according to Fig. 2 (curve 4) the fluidity limit of the solution at a given temperature has the higher value.

On the curve 2 (Fig. 3) we can clearly see the process of eutectic melting of the physiological saline in a temperature range of  $-37...-21^\circ\text{C}$ , which is consistent with reference data for the eutectic temperature of NaCl aqueous solution of corresponding concentration [3]. The saline of eutectic concentration, being in the solid state at the temperatures lower than eutectic point (below  $-21^\circ\text{C}$ ) acts as a ‘reinforcement mesh’ in intercrystal layers and in this way completely masks the eutectic melting of the cryoprotectant solution.

для соответствующего водного раствора этого криопротектора.

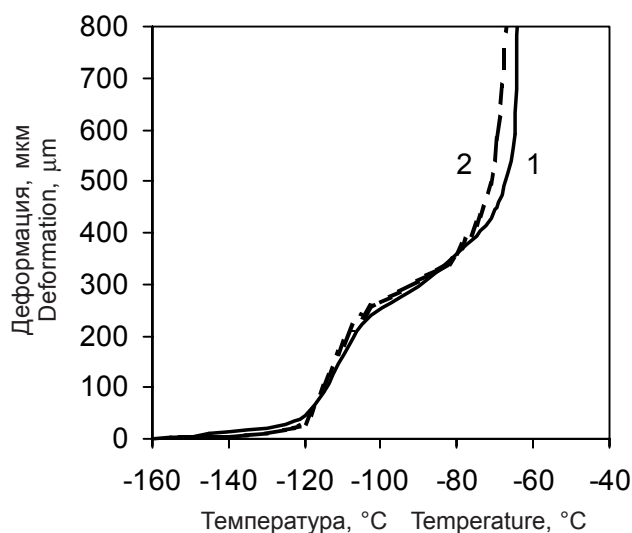
После плавления эвтектики физиологического раствора в температурном интервале от  $-21$  до  $-15^{\circ}\text{C}$  происходит рекристаллизация перед плавлением основной массы льда и далее непосредственно ее плавление (от  $-15$  до  $-4,5^{\circ}\text{C}$ ).

Аналогичные экспериментальные кривые (рис. 4), но при значениях  $\sigma = 4 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$ , позволяют наблюдать процесс плавления смеси эвтектической концентрации раствора ДМСО (кривые 1 и 2) в интервале температур от  $-87$  до  $-67^{\circ}\text{C}$ , что соответствует известной в литературе эвтектической температуре для водного раствора ДМСО [18]. Перегибы на ТПД-кривой при температурах ниже  $-67^{\circ}\text{C}$  связаны с процессами расстеклования межкристаллических прослоек и рекристаллизации перед плавлением смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора. Процессы, связанные с фазовыми превращениями выше  $-67^{\circ}\text{C}$ , на этих экспериментальных кривых не видны из-за слишком большого значения деформирующего напряжения  $\sigma$ .

При значении деформирующего напряжения  $\sigma = 0,67 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$  на одной ТПД-кривой можно увидеть плавление обеих эвтектик: и смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора, и физиологического раствора. На рис. 5 в температурной области А на обеих кривых виден перегиб, связанный с плавлением смеси эвтектической концентрации раствора ДМСО, а на кривой 2 в температурной области В – еще и с эвтектическим плавлением водного раствора NaCl.

Как правило, фазовому переходу, соответствующему плавлению образца, предшествует процесс рекристаллизационной перестройки его структуры [32]. Известно, что интенсивность рекристаллизации перед плавлением зависит от скорости охлаждения образца. Для подтверждения правомерности трактовки результатов по определению температурного интервала рекристаллизации на ТПД-кривых был проведен соответствующий эксперимент. На рис. 6 представлены ТПД-кривые физиологического раствора, полученные с разными скоростями охлаждения: кривая 1 –  $V_{\text{охл}} = 4$  град/мин, кривая 2 –  $V_{\text{охл}} = 25$  град/мин. В то же время значения деформирующего напряжения и скорости нагрева для обеих кривых были одинаковыми:  $\sigma = 0,4 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$  и  $V_{\text{наг}} = 1$  град/мин.

Представленные экспериментальные ТПД-кривые позволяют определить температурный интервал протекания процесса рекристаллизации. Интенсивность рекристаллизации, следовательно, и степень выраженности её на ТПД-кривой, зависит от скорости охлаждения, т. е. от степени неравновесности структуры образца, получаемой в про-



**Рис. 4.** ТПД-кривые раствора ДМСО 10% концентрации на основе: 1 – дистиллированной воды; 2 – физиологического раствора при одних и тех же условиях эксперимента:  $V_{\text{охл}} = 4$  град/мин;  $V_{\text{наг}} = 1$  град/мин;  $\sigma = 4 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$ .

**Fig. 4.** TPD curves of 10% DMSO solution based on: 1 – distilled water; 2 – physiological saline in the same experimental conditions:  $V_{\text{cool}} = 4$  deg/min;  $V_{\text{heat}} = 1$  deg/min;  $\sigma = 4 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$ .

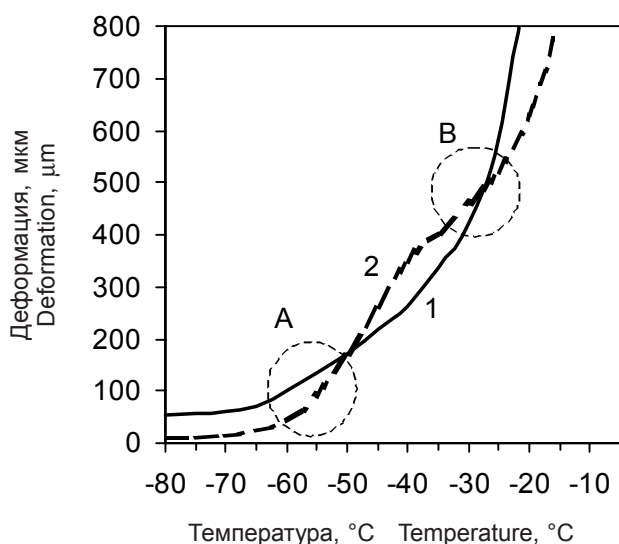
The presence of the temperature range reflecting the eutectic crystallization of NaCl aqueous solution, distinguishes the TPD curve for cryoprotective solution based on physiological saline or culture medium from the TPD curve for the corresponding aqueous solution of this cryoprotectant.

After the eutectic melting of physiological saline in the temperature range of  $-21 \dots -15^{\circ}\text{C}$  the recrystallization before melting of the bulk ice and finally its melting ( $-15$  to  $-4.5^{\circ}\text{C}$ ) occur.

Similar experimental curves (Fig. 4), but for values of  $\sigma = 4 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$  allow the observation of the melting of the eutectic mixture of DMSO solution (curves 1 and 2) in the temperature range of  $-87 \dots -67^{\circ}\text{C}$ , which corresponds to the reported eutectic temperature for DMSO aqueous solution [18]. The kinks on the TPD curve at temperatures below  $-67^{\circ}\text{C}$  are related to the processes of intercrystal layers devitrification and recrystallization prior to melting of the eutectic mixture of the cryoprotectant solution. The processes associated with phase transitions above  $-67^{\circ}\text{C}$  are not visible on these experimental curves due to the high deformation tension  $\sigma$ .

If the value of the deformation flow tension  $\sigma = 0,67 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$  one TPD curve can contain the information about melting of both eutectics: eutectic mixtures of cryoprotectant solution and physiological saline. In Fig. 5 the temperature range А of both curves has the kink associated with the melting of the eutectic mixture of the DMSO solution, and the temperature





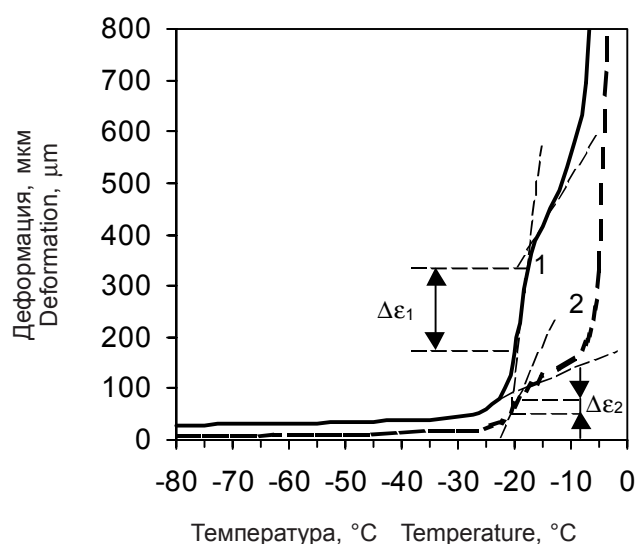
**Рис. 5.** ТПД-кривые раствора ДМСО 10% концентрации на основе: 1 – дистиллированной воды; 2 – физиологического раствора при одних и тех же условиях эксперимента:  $V_{\text{охл}} = 4$  град/мин;  $V_{\text{нар}} = 1$  град/мин;  $\sigma = 0,67 \times 10^5$  кг/м<sup>2</sup>.

**Fig. 5.** TPD curves of 10% DMSO solution based on: 1 – distilled water; 2 – physiological saline in the same experimental conditions:  $V_{\text{cool}} = 4$  deg/min;  $V_{\text{heat}} = 1$  deg/min;  $\sigma = 0.67 \times 10^5$  kg/m<sup>2</sup>.

цессе его замораживания. На кривых 1 и 2 видны различные величины приращения деформации ( $\Delta \epsilon_1$  и  $\Delta \epsilon_2$ ) после эвтектического плавления, соответствующие пластическому течению образца под действием деформирующего напряжения в режиме нагрева с постоянной скоростью. Чем более неравновесна структура, тем меньше величина  $\Delta \epsilon$  из-за упрочнения образца вследствие начала роста более крупных кристаллов за счет мелких, однако температурный интервал протекания процесса остается неизменным. Для физиологического раствора температурный интервал рекристаллизации перед плавлением основной массы льда находится в интервале от  $-21$  и до  $-15^\circ\text{C}$ .

Рекристаллизацию перед эвтектическим плавлением солевого раствора мы не рассматриваем, так как в связи с малой концентрацией NaCl в растворе величина этого процесса, по всей видимости, настолько мала, что не может вносить существенного вклада в криоповреждения при замораживании биообъектов. Однако при правильно подобранном значении деформирующего напряжения ТПД-кривые дают возможность регистрировать и этот вид рекристаллизации.

В практике криобиологии для криопротекторных растворов в качестве основы часто используют не только воду и физиологический раствор, но и различные культуральные среды. Данные по эвтектическим температурам таких сред в справочной литературе отсутствуют. Поэтому мы посчитали



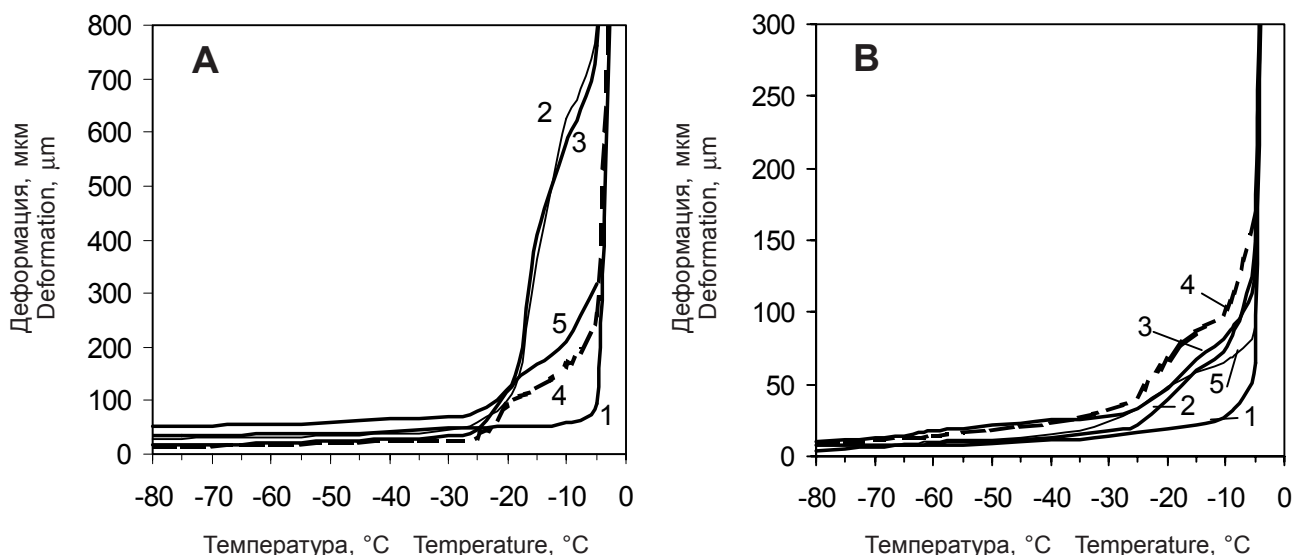
**Рис. 6.** ТПД-кривые физиологического раствора при разных скоростях охлаждения: 1 – 4 град/мин, 2 – 25 град/мин и одних и тех же значениях деформирующего напряжения  $\sigma = 0,4 \times 10^5$  кг/м<sup>2</sup> и  $V_{\text{нар}} = 1$  град/мин.

**Fig. 6.** TPD curves of physiological saline after using various cooling rates: 1 – 4 deg/min, 2 – 25 deg/min and the same deformation tension  $\sigma = 0.4 \times 10^5$  kg/m<sup>2</sup> and  $V_{\text{heat}} = 1$  deg/min.

range B in the curve 2 has also the kink associated with the eutectic melting of NaCl aqueous solution.

As a rule, the phase transition corresponding to the melting of the sample is preceded by recrystallization restructuring of its structure [32]. It is known that the recrystallization intensity before melting depends on the cooling rate of the sample. To confirm if the interpretation of the results of determining the temperature range of recrystallization from the TPD curves is eligible another experiment was conducted. Fig. 6 shows the TPD curves of physiological saline, obtained with different cooling rates: curve 1 with  $V_{\text{cool}} = 4$  deg/min, curve 2 with  $V_{\text{cool}} = 25$  deg/min. At the same time the values of the deformation tension and the rewarming rate for both curves are the same:  $\sigma = 0,4 \times 10^5$  kg/m<sup>2</sup> and  $V_{\text{heat}} = 1$  deg/min.

Presented experimental TPD curves allow to determine the temperature range of the crystallization process. The intensity of recrystallization, and accordingly, the degree of its expression on the TPD curve depend on the cooling rate, *i. e.*, on the degree of nonequilibrium of sample structure, formed in the process of freezing. Curves 1 and 2 have different deformation increments ( $\Delta \epsilon_1$  and  $\Delta \epsilon_2$ ) after eutectic melting, which correspond to a plastic flow of the sample under the influence of the deformation tension during rewarming with a constant rate. The more non-equilibrium the structure the smaller is the value  $\Delta \epsilon$  due to sample hardening that results from the started growth of larger crystals at the expense of smaller ones, but the tempe-



**Рис. 7.** ТПД-кривые дистиллированной воды (1), физиологического раствора (2), среды 199 (3), раствора Хенкса (4), среды DMEM (5) ( $V_{\text{нар}} = 1$  град/мин,  $\sigma = 0,4 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$ ) при скоростях охлаждения 4 град/мин (А); 25 град/мин (В).

**Fig. 7.** TPD curves of distilled water (1), physiological saline (2); medium 199 (3); Hanks' solution (4); DMEM (5) ( $V_{\text{heat}} = 1 \text{ deg/min}$ ,  $\sigma = 0.4 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$ ) at cooling rates of 4 deg/min (A); 25 deg/min (B).

необходимым, используя метод ТПД, определить температурный интервал эвтектической кристаллизации (плавления) для наиболее часто используемых культуральных сред: среда 199, раствор Хенкса, среда DMEM. Во-первых, для того, чтобы показать наличие эвтектического перехода как такового для таких сложных по составу растворов, во-вторых, определить температурные интервалы эвтектической кристаллизации (плавления) для практического использования при разработке протоколов криоконсервирования.

Экспериментальные ТПД-кривые для вышеперечисленных культуральных сред показаны на рис. 7. Условия проведения эксперимента:  $V_{\text{охл}} = 4$  град/мин (рис. 7, А),  $V_{\text{охл}} = 25$  град/мин (рис. 7, В),  $V_{\text{нар}} = 1$  град/мин,  $\sigma = 0,4 \times 10^5 \text{ кг/м}^2$ . Для данных культуральных сред, как и для физиологического раствора (см. рис. 6), более высокая скорость охлаждения (рис. 7, б) повышает интенсивность рекристаллизации перед плавлением основной массы льда и, как следствие, выраженность этого процесса на экспериментальных ТПД-кривых. Это позволяет более точно определить температурный интервал рекристаллизации.

В рассматриваемых культуральных средах основное вещество, водному раствору которого свойственна эвтектическая кристаллизация в процессе охлаждения, является NaCl. Поэтому температурный интервал, соответствующий процессу эвтектической кристаллизации (плавления) культуральных сред, практически не будет отличаться от такового интервала для физиологического рас-

створа range of the process remains the same. For the physiological saline the temperature range of recrystallization prior to melting of bulk ice is between  $-21$  and  $-15^\circ\text{C}$ .

Recrystallization prior to eutectic melting of saline is not under consideration since due to the low concentration of NaCl in the solution the value of the process is apparently so small that it can not make any significant contribution to cryodamages during freezing of biologicals. However, the properly selected deformation tension values allow to see this kind of recrystallization on TPD curves too.

In cryobiological practice, the cryoprotective solutions are usually based not only on water and physiological saline, but also on the different culture media. There are no reported data on the eutectic temperatures of such media. Therefore, we considered as useful to apply the TPD method for determining the temperature range of the eutectic crystallization (melting) of the most commonly used culture media: medium 199, Hanks' solution, DMEM. Firstly, it is necessary to see if there is a eutectic transition at large for such a complex solutions, and secondly, to determine the temperature ranges of eutectic crystallization (melting) for practical application when develop the cryopreservation protocols.

Experimental TPD curves for the mentioned culture media are shown in Fig. 7. Experimental conditions were as follows:  $V_{\text{cool}} = 4 \text{ deg/min}$  (Fig. 7A),  $V_{\text{cool}} = 25 \text{ deg/min}$  (Fig. 7B),  $V_{\text{heat}} = 1 \text{ deg/min}$ ,  $\sigma = 0.4 \times 10^5 \text{ kg/m}^2$ . For the given culture media, as well as for physiological saline (see Fig. 6), the higher cooling rate (Fig. 7B)

вора. При этом для одной и той же скорости охлаждения степень выраженности на ТПД-кривой процесса рекристаллизации перед плавлением основной массы льда зависит от состава культуральной среды (рис. 7, А и В). Полученные экспериментальные данные имеют и сугубо практическое значение. При определении температурных интервалов фазовых переходов в растворах криопротекторов на различных культуральных средах можно использовать данные для физиологического раствора, а именно диапазон температур от  $-37$  до  $-21^{\circ}\text{C}$ .

### Выводы

Фазовые превращения в многокомпонентных криозащитных средах и их составляющих, сопровождающие процедуру замораживания-оттаивания, оказывают непосредственное влияние на сохранность криоконсервируемых биологических объектов. В работе методом ТПД исследованы фазовые превращения, протекающие при замораживании-оттаивании в дистиллированной воде, физиологическом растворе и некоторых культуральных средах (среда 199, раствор Хенкса, среда ДМЕМ), которые являются неотъемлемой частью многокомпонентных криозащитных растворов. На примере криопротекторного раствора ДМСО (10%) показана возможность изучить методом ТПД фазовые превращения, связанные с присутствием в криозащитном растворе как криопротекторного вещества, так и других компонентов раствора. Определены температурные интервалы эвтектической кристаллизации (плавления), кристаллизации (плавления) основной массы льда в образце и рекристаллизации на этапе нагрева перед соответствующими видами плавления для каждого составляющего многокомпонентной криозащитной среды. Дальнейшие исследования будут направлены на использование полученных результатов для оптимизации протоколов охлаждения-нагрева криоконсервируемых биообъектов.

### Литература

1. *Бартенев Г.М., Френкель С.Я.* Физика полимеров. – Л.: Химия, 1990. – 432 с.
2. *Вигли Д.А.* Механические свойства материалов при низких температурах. – М.: Мир, 1974. – 373 с.
3. *Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некрач Е.Ф.* Краткий справочник по химии. – Киев: Наук. думка, 1987. – 833 с.
4. *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.
5. *Егунов В.П.* Введение в термический анализ: Монография. – Самара, 1996. – 270 с.
6. *Загибалова Т.Д., Манк В.В.* Состояние воды в биологических объектах при криоконсервировании по данным ЯМР // Криобиология. – 1985. – №1. – С. 19–23.

increases the recrystallization intensity before melting of bulk ice and, consequently, the expression of this process on the experimental TPD curves. This allows to determine the temperature range of recrystallization more precisely.

In these culture media, the main substance, which aqueous solution is characterized by eutectic crystallization during cooling, is NaCl. Therefore, the temperature range corresponding to the process of eutectic crystallization (melting) of culture media, would have almost no differences from the interval for physiological saline. Moreover, for the same cooling rate the degree of expression on the TPD curve of recrystallization process prior to the melting of bulk ice depends on the composition of the culture medium (Fig. 7A and B). The obtained experimental data are also of practical importance. When determine the temperature ranges of phase transitions in cryoprotectant solutions based on various culture media one could use the data for physiological saline, namely the range of temperatures of  $-37...-21^{\circ}\text{C}$ .

### Conclusions

Phase transformations in multicomponent cryoprotective media and their constituents during freeze-thawing, have a direct impact on the survival of the biological objects being cryopreserved. This study dealt with the phase transformations assessed by TPD method, which occur during freeze-thawing in distilled water, physiological saline, and several culture media (medium 199, Hanks' solution, DMEM) as an integral part of multicomponent cryoprotective solutions. On the example of cryoprotective solution of DMSO (10%) we demonstrated the possibility to investigate by TPD method the phase transformations associated with the presence of cryoprotectant in the solution, as well as other components. The temperature ranges of eutectic crystallization (melting), crystallization (melting) of bulk ice in the sample and recrystallization during heating prior to the corresponding types of melting of each component of the multicomponent cryoprotective medium were established. Further research will be directed to application of the results in the optimizing the protocols of cooling-heating of biological objects being cryopreserved.

### References

1. *Bartenev G.M., Frankel P.J.* Polymer physics. – Leningrad: Khimiya, 1990. – 432 p.
2. *Wigley D.A.* The mechanical properties of materials at low temperatures. – Moscow: Mir, 1974. – 373 p.
3. *Goronovsky I.T., Nazarenko Y.P. Nekrach E.F.* Short reference book in chemistry. – Kiev: Nauk. Dumka, 1987. – 833 p.
4. *Gurina T.M.* Investigation of the phase state of frozen solutions of cryoprotectants, cell suspensions and tissues using thermo-

7. *Зацепина Г.Н.* Физические свойства и структура воды. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 184 с.
8. *Зинченко А.В.* Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур  $-150^{\circ}\text{C}-0^{\circ}\text{C}$ : Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. – Киев, 1983. – 20 с.
9. *Зинченко В.Д.* Исследование межмолекулярных взаимодействий в водных растворах полиэтиленгликолей, некоторых белков и аминокислот методом ЯМР: Автореф. дис. ... канд. физ.-техн. наук. – Харьков, 1978. – 16 с.
10. *Зинченко В.Д., Манк В.В., Моисеев В.А., Овчаренко Ф.Д.* Исследование водных смесей полиэтиленгликолей методом ЯМР // Коллоидный журнал. – 1977. – Т. 39, №1. – С. 30–35.
11. *Кирилюк А.Л.* Влияние криопротекторов и режимов замораживания на механическое повреждение клеток в области субэвтектических температур: Автореф. дис...канд. биол. наук. – Харьков, 2008. – 21 с.
12. *Кирилюк Г.Л., Резников В.І., Гурина Т.М.* Теоретичне та експериментальне дослідження процесу льодоутворення в розчинах криопротекторів методом тензодилатометрії // Біофізичний вісник. – 2006. – Вип.17(1). – С. 95–102.
13. *Лихтенштейн Г.И.* Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
14. *Маэно Н.* Наука о льде. – М.: Мир, 1988. – 229 с.
15. *Моисеев В.А.* Молекулярные механизмы криоповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1984. – 47 с.
16. *Осецкий А.И., Кирилюк А.Л., Гурина Т.М.* Изучение кинетики расстеклования водных растворов криопротекторов методом термопластической деформации // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, № 2. – С. 137–146.
17. *Осецкий А.И., Кирилюк А.Л.* Экспериментальное определение пороговых концентраций криопротекторных веществ, обеспечивающих ингибирование механических повреждений криоконсервируемых биообъектов // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, № 3. – С. 245–247.
18. *Пушкар Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А.* Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. – Киев: Наук. думка, 1977. – 243 с.
19. *Пушкар Н.С., Осецкий А.И., Аненко В.И., Макаренко Б.И.* Тензодилатометрия охлаждаемых растворов криопротекторов и тканей // Док. АН УССР, Сер. Б. – 1990. – №3. – С. 74–78.
20. *Репин Н.В.* Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных условиях охлаждения // Криобиология. – 1986. – №3. – С. 31–36.
21. *Розанов Л.Ф.* Криомикроскопическое изучение процессов замораживания и отогрева клеточных суспензий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1977. – 23 с.
22. *Тейтельбаум Б.Я.* Термомеханический анализ полимеров. – М.: Наука, 1979. – 236 с.
23. *Уэндландт У.* Термические методы анализа: Пер. с англ. под ред. В. А. Степанова и В. А. Берштейна. – М.: Мир, 1978. – 526 с.
24. *Шестак Я.* Теория термического анализа: Физико-химические свойства твердых неорганических веществ: Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 456 с.
25. Пат. України №17624А, МПК5 G01 № 33/448. Спосіб визначення фізичного стану розчину криопротектора в процесі заморожування-відігріву / О.І. Осецький, Т.М. Гурина; Заявлено 01.10.1996; опубл. 06.05.1997; Бюл. № 5.
26. Пат. України №26502 МПК G 01 N 25/02. Спосіб дослідження розчинів криопротекторів при заморожуванні / О.І. Осецький, Г.Л. Кирилюк, Т.М.Гурина; Заявлено 14.05.07; опубл. 25.09.07; Бюл. №15.
27. Пат. України №18660, МПК G 01 N 25/02. Спосіб дослідження розчинів охолоджуваних криопротекторів / В.І. Резніков, Г.Л. Кирилюк; Заявлено 22.05.06; опубл. 15.11.06; Бюл. №11.
- plastic deformation: Authors abstract of thesis ... Candidate. biol. sciences. – Kharkov, 1993. – 18 p.
5. *Egunov V.P.* Introduction to thermal analysis: monograph. – Samara, 1996. – 270 p.
6. *Zagibalova T.D., Mank V.V.* State of water in biological objects during cryopreservation studied by NMR // Kriobiologiya. – 1985. – N1. – P. 19–23.
7. *Zatsepin G.N.* Physical properties and structure of the water. – Moscow: Moscow State University, 1998. – 184 p.
8. *Zinchenko A.V.* The study of phase transitions and physical states of aqueous solutions of polyols in the temperature range of  $-150^{\circ}\text{C}-0^{\circ}\text{C}$ : Authors abstract of thesis ... Candidate. phys.-math. sciences. – Kyiv, 1983. – 20 p.
9. *Zinchenko V.D.* The study of molecule-molecule interactions in aqueous solutions of polyethylene glycols, some proteins and amino acids by NMR methos: Authors abstract of thesis ... Candidate. phys.tech. sciences. – Kharkov, 1978. – 16 p.
10. *Zinchenko V.D., Mank V.V., Moiseev V.A., Ovcharenko F.D.* Investigation of aqueous mixtures of polyethylene glycols by NMR // Kolloidnyi Zhurnal. – 1977. – Vol. 39, N1. – P. 30–35.
11. *Kirilyuk A.L.* Influence of cryoprotectants and freezing regimens on mechanical damage of cells within subeutectic interval of temperatures: Authors abstract of thesis ... Candidate. biol. sciences. – Kharkov, 2008. – 21 p.
12. *Kirilyuk G.L., Reznikov V.I., Gurina T.M.* Theoretical and experimental research to process of ice formation in cryoprotectant solutions using a method of tensodylatometry // Biophysical Bulletin. – 2006. – Issue 17 (1). – P. 95–102.
13. *Lichtenstein G.I.* The method of spin labels in molecular biology. – Moscow: Nauka, 1974. – 256.
14. *Maeno N.* Science of ice. – Moscow: Mir, 1988. – 229 p.
15. *Moiseev V.A.* Molecular mechanisms of cryodamage and cryoprotection of proteins and biological membranes: Authors abstract of thesis ... Doctor of biol. sciences. – Kharkov, 1984. – 47 p.
16. *Osetskiy A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M.* Study of devitrification kinetics of cryoprotectant aqueous solutions using thermoplastic deformation method // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N2. – P. 137–146.
17. *Osetskiy A.I., Kirilyuk A.L.* Experimental determination of the threshold concentrations of cryoprotective agents providing the inhibition of mechanical damage in cryopreserved biological objects // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol.15, N3. – P. 245–247.
18. *Pushkar N.S., Bilous A.M., Itkin Yu.A.* Low-temperature crystallization in biological systems. – Kiev: Nauk. Dumka, 1977. – 243 p.
19. *Pushkar N.S., Osetskiy A.I., Anenko V.I., Makarenko B.I.* Tensodylatometry of cooled solution of cryoprotectants and tissues // Doklady Ukrainian Academy of Sciences, Series B.– 1990. – N3. – P. 74–78.
20. *Repin N.V.* The study of extra- and intracellular crystallization in human erythrocytes under different conditions of cooling // Kriobiologiya. – 1986. – N3. – P. 31–36.
21. *Rozanov L.F.* Cryomicroscopic investigation of the processes of freezing and thawing of cell suspensions: Authors abstract of thesis ... Candidate. biol. sciences. – Kharkov, 1977. – 23 p.
22. *Teitelbaum B.J.* Thermomechanical analysis of polymers. – Moscow: Nauka, 1979. – 236 p.
23. *Wendlandt W.* Thermal methods of analysis. – Moscow: Mir, 1978. – 526 p.
24. *Sestak J.* Thermophysical properties of solids: their measurements and theoretical thermal analysis. – Moscow: Mir, 1987. – 456 p.
25. Patent of Ukraine Nr.17624A, IPC5 G01 N 33/448. The way of determining of physical state of cryoprotectant solution during freeze-thawing / O.I. Osetsky, T.M. Gurina; Filed 01.10.1996, Publ. 05/06/1997; Bull. Nr. 5.
26. Patent of Ukraine Nr. 26502 IPC G01 Nr 25/02. The way of studying the cryoprotectant solutions during freezing / O.I. Osetsky, G.L. Kirilyuk, T.M. Gurina; Filed 05/14/07, Publ. 25.09.07; Bull. Nr. 15.

28. *Bryant G.* DSC measurement of cell suspensions during successive freezing runs: implications for the mechanisms of intracellular ice formation // *Cryobiology*. – 1995. – Vol. 32, № 2. – P. 114–128.
29. *Ehrerstein G. W., Riedl G., Trawiel P.* Thermal analysis of plastics: theory and practice. – Munich: Hanser, 2004. – 368 p.
30. *Gurina T.M., Pakhomov A.V., Kyryliuk A.L., Bozhok G.A.* Developing protocol of testicular interstitial cell cryopreservation with consideration of determining temperature intervals for controlled cooling below  $-60^{\circ}\text{C}$  // *Cryobiology*. – 2011. – Vol. 62, №2. – P. 107–114.
31. *Hobbs P.V.* Ice physics. – Oxford: Univ. Press, 1974. – 864 p.
32. *Luyet B.J., Sager D., Gehenio P.M.* The phenomenon of "premelting recrystallization" // *Biodynamika*. – 1967. – Vol. 10, №205. – P. 133–136.
33. *Menczel J.D., Prime R.B.* Thermal analysis of polymers, fundamentals and applications. – Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, 2009. – 688 p.
34. *Oetjen G.-W., Haseley P.* Freeze-drying. – Weinheim: Wiley-VCH, 2004. – P. 70–73.
27. Patent of Ukraine Nr. 18660, IPC G 01 Nr. 25/02. The way of studying of cooling cryoprotectant solutions / V.I. Reznikov, G.L. Kiriluk; Filed 5/22/06, Publ. 15.11.06; Bull. Nr. 11.
28. *Bryant G.* DSC measurement of cell suspensions during successive freezing runs: implications for the mechanisms of intracellular ice formation // *Cryobiology*. – 1995. – Vol. 32, N2. – P. 114–128.
29. *Ehrerstein G. W., Riedl G., Trawiel P.* Thermal analysis of plastics: theory and practice. – Munich: Hanser, 2004. – 368 p.
30. *Gurina T.M., Pakhomov A.V., Kyryliuk A.L., Bozhok G.A.* Developing protocol of testicular interstitial cell cryopreservation with consideration of determining temperature intervals for controlled cooling below  $-60^{\circ}\text{C}$  // *Cryobiology*. – 2011. – Vol. 62, N2. – P. 107–114.
31. *Hobbs P.V.* Ice physics. – Oxford: Univ. Press, 1974. – 864 p.
32. *Luyet B.J., Sager D., Gehenio P.M.* The phenomenon of "premelting recrystallization" // *Biodynamika*. – 1967. – Vol. 10, N205. – P. 133–136.
33. *Menczel J.D., Prime R.B.* Thermal analysis of polymers, fundamentals and application. – Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, 2009. – 688 p.
34. *Oetjen G.-W., Haseley P.* Freeze-drying. – Weinheim: Wiley-VCH, 2004. – P. 70–73.

*Поступила 17.07.2012*

*Accepted 17.07.2012*