

УДК 57.043:612.111:536.54

О.І. Осецький, Т.М. Гуріна*, Г.Л. Полякова, С.С. Севастянов

Термопластичний аналіз кластерної кристалізації кріопротекторних розчинів

UDC 57.043:612.111:536.54

O.I. Osetskyi, T.M. Gurina*, A.L. Poliakova, S.S. Sevastianov

Thermoplastic Analysis of Cluster Crystallization of Cryoprotective Solutions

Реферат: Вперше розглянута можливість використання термомеханічного аналізу для побудови фрагментів діаграм стану кріопротекторних розчинів у зоні температур склування. Розроблено методику вивчення кластерної кристалізації кріопротекторних розчинів на основі термомеханічних кривих. Проведено аналіз параметрів термомеханічних кривих заморожених водних розчинів диметилсульфоксиду (ДМСО), поліетиленоксиду 1500 (ПЕО-1500), гліцерину та встановлено зв'язок між вказаними параметрами і кінетикою кластерної кристалізації цих розчинів. На основі експериментально отриманих термомеханічних кривих заморожених розчинів ДМСО і ПЕО-1500 показано можливість утворення кластерів двох типів: на основі мікрористалів льоду і мікрористалів кріопротекторної речовини. Отримано додаткові експериментальні дані для побудови повних діаграм стану кріопротекторних розчинів, які включають ділянки існування кластерної фази.

Ключові слова: термопластична деформація, діаграма стану, кластерна кристалізація, розкльовання, кріопротектори.

Abstract: For the first time the possibility of using thermomechanical analysis to construct the fragments of state diagrams of cryoprotective solutions in the zone of glass transition temperatures has been considered. A method for studying cluster crystallization of cryoprotective solutions based on thermomechanical curves has been developed. The parameters of thermomechanical curves of frozen aqueous solutions of dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene oxide 1500 (PEO-1500), glycerol were analyzed and the relationship between these parameters and the cluster crystallization kinetics for these solutions was established. On the basis of experimentally obtained thermomechanical curves for the frozen solutions of DMSO and PEO-1500 the possibility of formation of clusters of two types has been shown: on the basis of ice and cryoprotective substance microcrystals. Additional experimental data were obtained to construct a complete state diagrams of cryoprotective solutions, which include the existing cluster phase areas.

Key words: thermoplastic deformation, state diagram, cluster crystallization, splitting, cryoprotectants.

Результати досліджень деяких авторів [8, 9, 23] явища кластерної кристалізації усувають суперечності, які виникають у спробах пояснити експериментально спостережувані закономірності фазових перетворень у кріопротекторних розчинах в межах класичних діаграм стану евтектичного типу [3, 12, 14–16, 24, 26]. Сформульовані О.І. Осецьким та співавторами [8, 9] уявлення про структуру частинок кластерної фази β_c підтверджено експериментальними даними щодо об'ємної скануючої тензодилатометрії водяних розчинів диметилсульфоксиду (ДМСО) і гліцерину. Пояснено природу механізмів пошкодження кріоконсервованих біоб'єктів з температурою, близькою до температури склування захисних розчинів T_g . З огляду на вищевикладене важливими є подальші дослідження явища кластерної кристалізації як для практичної кріобіології, так і для розвитку теорії фазових перетворень у розчинах зі слабкою міжмолекулярною взаємодією компонентів.

Research results provided by many authors on cluster crystallization [16–18] retract discrepancies, appeared in attempts to experimentally explain the observed regularities of phase transitions in cryoprotective solutions within the limits of classic diagrams of states of eutectic type [1, 3–5, 19, 25, 26]. The own coined notions [17, 18] on the structure of cluster phase β_c particles are experimentally confirmed by the data of volumetric scanning tensodilatometry of aqueous solutions of dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol. The origin of the mechanisms of damage of cryopreserved biological objects with the temperature close to that of vitrification of protective solutions T_g has been explained. Assuming the mentioned above the further studies of cluster crystallization both for practical cryobiology and development of theory of phase transformations in solutions with weak cell-to-cell interaction of components are crucial. The laying down of the principles of building the diagrams

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: gurtata@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: gurtata@ukr.net

Надійшла 15.04.2019
Прийнята до друку 31.08.2021

Received April, 15, 2019
Accepted August, 31, 2021

© 2021 O.I. Osetskyi, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Особливого значення набуває формулювання принципів побудови діаграм стану кріопротекторних розчинів, які включають ділянки існування кластерної фази. Для встановлення описаних вище принципів необхідно вивчити особливості кластерної кристалізації уздовж усієї осі концентрацій кріопротекторної речовини C_b . Однак для вирішення цієї проблеми необхідно подолати деякі експериментальні труднощі. Традиційні для таких досліджень методи диференціального термічного аналізу [24] та диференціальної скануючої калориметрії [3, 12, 26] не дозволяють чітко розділити процеси звичайної й кластерної кристалізації, яка протікає за температури, близької до T_g без розриву водневих зв'язків між молекулами води та кріопротекторної речовини [23]. За значень, менших деякої характерної концентрації C_g , такий поділ фіксує об'ємна скануюча тензодилатометрія [9]. Це пов'язано з тим, що при $C_b < C_g$ утворення кластерів відбувається на основі мікрокристалів льоду a_s [23] і супроводжується вираженими об'ємними ефектами [9]. Однак при $C_b > C_g$ ефективність об'ємної скануючої тензодилатометрії знижується. Таким чином, з урахуванням явища кластерної кристалізації інтервал концентрацій $C_b > C_g$ залишається практично невивченим. У зв'язку з цим у даній роботі для аналізу процесу кластерної кристалізації уздовж усієї осі концентрацій C_b використаний метод термомеханічної деформації попередньо заморожених кріопротекторних розчинів.

Мета роботи – розробка методики вивчення кластерної кристалізації кріопротекторних розчинів за термомеханічними кривими і отримання даних для побудови їх повних діаграм стану.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були заморожені водяні розчини ДМСО («Лубнифарм», Україна), гліцерину ч.д.а. («Макрохім», Україна), поліетиленоксиду 1500 (ПЕО-1500) («Барва», Україна) в межах масових концентрацій 0...100% з інтервалом 5%, а для концентрацій 50...70% з інтервалом 1%.

Для вивчення фазових перетворень у вказаних вище розчинах застосовували метод термомеханічного аналізу, схема реалізації якого досить докладно описана в багатьох роботах [7, 10, 11, 22].

Зразок об'ємом $0,5 \times 10^{-6} \text{ м}^3$ поміщали в деформувальний пристрій, охолоджували до температури -150°C із заданою постійною швидкістю $8 \times 10^{-2} \text{ }^\circ\text{C/s}$ і витримували його за цієї температури протягом 10 хв. Потім до нього прикладали постійну зовнішню деформуючу напругу σ ($1,5 \times 10^5 - 4 \times 10^6 \text{ Н/м}^2$), величина якої залежала від кон-

of state of cryoprotective solutions, including the sites of existing cluster phase is of a special value. To determine the described above principles it is necessary to examine the features of cluster crystallization along the whole axis of concentrations of cryoprotective substance C_b . However to solve this task it is necessary to overcome some experimental difficulties. Traditional for such investigations methods of differential thermal analysis [19] and differential scanning calorimetry [1, 25, 26] do not allow the distinction of the processes of usual and cluster crystallizations, occurring at the temperature close to T_g with no breaking aqueous bonds between molecules of water and cryoprotective substance [16]. At the values less than certain characteristic concentration C_g this division is fixed by volumetric scanning tensodilatometry [18]. This is related to the fact that at $C_b < C_g$ the clusters are formed on the basis of ice microcrystals a_s [16] and this is accompanied by the manifested volumetric effects [18]. But if $C_b > C_g$ the effectiveness of volumetric scanning tensodilatometry reduces. Thus with accounting the cluster crystallization the interval of concentrations $C_b > C_g$ remains virtually unstudied. Thereby in this research to analyze the cluster crystallization along the whole axis of concentration C_b the method of thermomechanical deformation of pre-frozen cryoprotective solutions was used.

The research was aimed to develop the methods of studying the cluster crystallization of cryoprotective solutions using thermomechanical curves and obtaining the data to build their complete diagrams of state.

Materials and methods

Frozen aqueous solutions of DMSO (Lubny-farm, Ukraine), glycerol of pure for analysis grade (JSC Macrochem, Ukraine), polyethylenoxide 1500 (PEO-1500) (JSC Barva, Ukraine) within mass concentrations of 0..100% with 5% interval, and with that of 1% for concentrations of 50...70%. were the research.

To study the phase transitions in the mentioned above solutions the method of thermomechanical analysis, the scheme of implementation of which was described in details in many reports [14, 15, 20, 21] was used.

The sample of $0.5 \times 10^{-6} \text{ м}^3$ volume was placed into deforming device, cooled down to -150°C with the set constant rate of $8 \times 10^{-2} \text{ }^\circ\text{C/s}$ and maintained it at this temperature for 10 minutes. Then it was subjected to a constant external deformation load σ ($1,5 \times 10^5 - 4 \times 10^6 \text{ N/m}^2$), the value of which depended on the concentration of solution and tasks of certain experiment. Herewith it did not exceed



центрації розчину і задач конкретного експерименту. При цьому вона не перевищувала межі текучості досліджуваного зразка в інтервалі температур від -150°C до T_g . Далі зразок нагрівали з постійною швидкістю $1,5 \times 10^{-2} \text{ }^{\circ}\text{C/s}$ і в режимі чистого зсуву реєстрували термомеханічні криві в координатах «деформація–температура». За одержаними кривими визначали характерні точки або температурні інтервали, які відповідають тим чи тим фазовим перетворенням у досліджуваних зразках.

Особливу увагу в даній серії експериментів приділено збільшенню пластичної деформації зразка $\Delta \epsilon_T$ відразу після розклування аморфних фракцій за температури T_g , що містяться в ньому. При цьому фіксувалося збільшення деформації $\Delta \epsilon_T$, яке відповідає підвищенню температури зразка при $T_g + \Delta T$. Величина ΔT в даному випадку варіювалася в діапазоні $5 \dots -15^{\circ}\text{C}$ залежно від виду кріопротекторної речовини.

Результати та обговорення

Типові термомеханічні криві $\dot{\epsilon}_T = \epsilon_T(T)$ досліджуваних водяних розчинів ДМСО, гліцерину і ПЕО-1500 характеризуються багатостадійністю (рис. 1). Так, на першій стадії ($-150^{\circ}\text{C} \dots T_g$) спостерігається незначне лінійне збільшення деформації ϵ_T з температурою, яке в подальших експериментах приймалося за базову лінію. Для другої стадії ($T_g \dots T_R$) властиве різке збільшення термопластичної деформації. За відхиленням зафіксованих кривих $\epsilon_T(T)$ від базової лінії можна досить точно визначити температури початку процесу розклування аморфних фракцій у досліджуваних заморожених розчинах [7]. Третя стадія ($T_R \dots T_{\beta a}$) характеризується зменшенням похідної $d\epsilon_T/dT$, яка потім знову різко зростає в момент переходу до четвертої стадії при $T > T_{\beta a}$.

Для пояснення такого складного виду термопластичних кривих $\epsilon_T(T)$ необхідно проаналізувати структуру зразків, які деформуються, і закономірності їх пластичної течії в умовах безперервного нагріву та постійного зовнішнього навантаження $\sigma = \sigma_1 = \text{const}$. Природно, що структура заморожених кріопротекторних розчинів визначається їх діаграмами стану на етапі охолодження. Схематично така діаграма показана на рис. 2. Згідно з діаграмою в охолоджуваних водних розчинах із концентрацією кріопротекторної речовини в діапазоні $C_B < C_{ca}$ кристали льоду A_s утворюються до досягнення розчином концентрації C_{ca} . Подальше охолодження залишеної рідкої фракції з концентрацією $C_B = C_{ca}$ приводить до її склування при $T = T_g$ [13, 25]. Аналогічні процеси спостерігаються і в охолоджуваному розчині з концент-

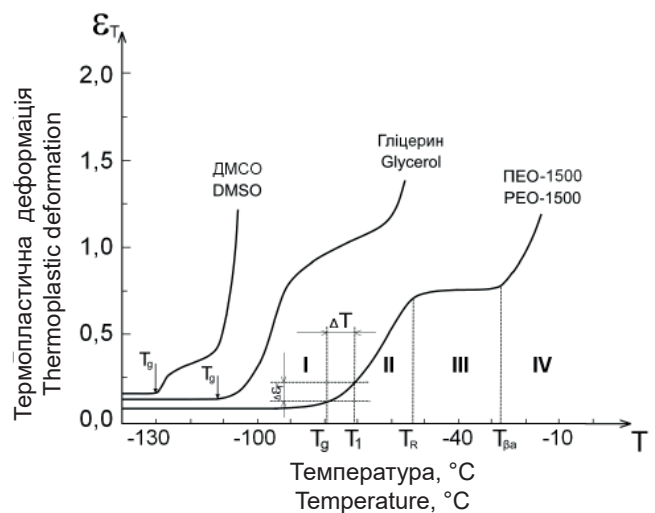


Рис. 1. Термопластичні криві $\epsilon_T(T)$ заморожених водяних розчинів ДМСО ($\sigma = 3 \times 10^6 \text{ Н/м}^2$; $C_B = 0,55$), гліцерину ($\sigma = 2 \times 10^6 \text{ Н/м}^2$; $C_B = 0,6$), ПЕО-1500 ($\sigma = 7 \times 10^5 \text{ Н/м}^2$; $C_B = 0,3$).

Fig. 1. Thermoplastic curves $\epsilon_T(T)$ of frozen aqueous solutions of DMSO ($\sigma = 3 \times 10^6 \text{ N/m}^2$; $C_B = 0.55$), glycerol ($\sigma = 2 \times 10^6 \text{ N/m}^2$; $C_B = 0.6$), PEO-1500 ($\sigma = 7 \times 10^5 \text{ N/m}^2$; $C_B = 0.3$).

the fluidity limit of the investigated specimen within the temperature interval from -150°C to T_g . Later the sample was heated with the constant rate of $1,5 \times 10^{-2} \text{ }^{\circ}\text{C/s}$ and in the regimen of pure shift the thermomechanical curves were recorded in 'deformation-temperature' coordinates. Due to the resulted curves there were determined characteristic points or temperature intervals, corresponding to phase transitions in the studied specimens.

A special attention in these series of experiments was paid to an increase in plastic deforma-

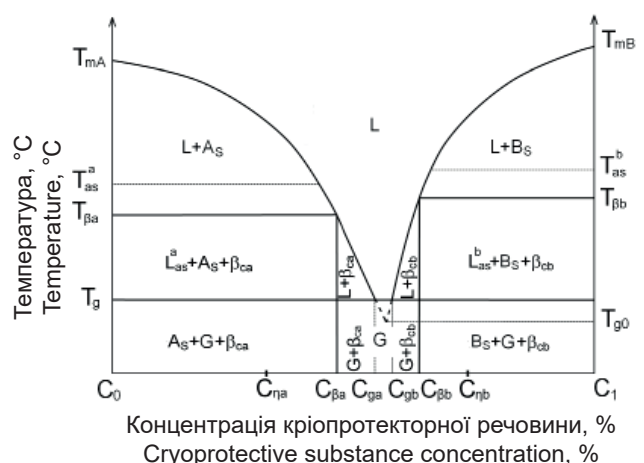


Рис. 2. Вид діаграми станів попередньо заморожених водяних розчинів кріопротекторної речовини В на етапі нагрівання.

Fig. 2. Appearance of diagram of state for pre-frozen aqueous solutions of cryoprotective substance B at heating stage.



рацією $C_b > C_{cb}$ з тією різницею, що утворення кристалів кріопротекторної речовини V_s в ньому відбувається до досягнення концентрації C_{cb} . Особливу увагу слід звернути на структуру рідкої фази L. При температурах вище деякої температури асоціації T_{as} фаза L є сумішню молекул води A, молекул кріопротекторної речовини B і гідратованих молекул кріопротектора A_nB (n – кількість молекул води, пов'язаних водневими зв'язками з молекулою B).

Очевидно, що співвідношення цих молекул у розчині L змінюється залежно від концентрації C_b . Нижче температури T_{as} , яка визначається змінною ентропії [8], починається асоціація гідратованих молекул A_nB у комплекси $(A_nB)_m$ [5, 6, 18, 21]. Даний процес не є фазовим переходом, оскільки в даному випадку фазові межі не формуються й не реалізується принцип постійності складу фракції L_{as} , яка утворюється. Залежність маси фракції L_{as} від концентрації C_b показана на рис. 3, А. На рис. 3, В представлено фрагменти структур заморожених розчинів, які утворюються уздовж осі концентрацій C_b відповідно до діаграми на рис. 2. На підставі представлених фрагментів можна припустити, що пластична течія зразків вища за температуру T_g у діапазоні концентрацій $C_{\eta a} < C_b < C_{\eta b}$ буде повністю підкорятися закону течії ньютонівської рідини [4].

$$\dot{\varepsilon} = r \sigma / \eta, \quad (1)$$

де r – коефіцієнт, який враховує геометричні параметри процесу деформації; σ – прикладене навантаження; η – динамічна в'язкість рідкої фази, яка визначається за формулою:

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{Q}{kT}\right), \quad (2)$$

де η_0 – нормувальний коефіцієнт; Q – енергія активації в'язкої течії; k – стала Больцмана; T – температура.

При отриманні термомеханічних кривих у режимі повільного рівномірного нагрівання з достатньою точністю можна розрахувати швидкість термопластичної течії

$$\dot{\varepsilon} = \Delta \varepsilon_T / \Delta t,$$

де $\Delta \varepsilon_T$ – приріст деформації, та час зміни температури на величину ΔT :

$$\Delta t = \varphi \Delta T,$$

tion of the sample $\Delta \varepsilon_T$ just after devitrification of amorphous fractions at T_g , which are the part of it. Herewith there was registered a rise in deformation $\Delta \varepsilon_T$, which corresponds to an increased temperature in the sample at $T_g + \Delta T$. The ΔT value in this case varied within the range of 5...–15°C depending on cryoprotectant type.

Results and discussion

Typical thermomechanical curves $\varepsilon_T = \varepsilon_T(T)$ of the studied aqueous solutions of DMSO, glycerol and PEO-1500 are of multistage character (Fig. 1). Thus, at the first stage ($-150^\circ\text{C} \dots T_g$) there is a slight linear increase in the deformation ε_T with temperature, which in subsequent experiments was assumed as the baseline. The second stage ($T_g \dots T'_R$) is characterized by a sharp increase in thermoplastic deformation. By the deviation of the fixed curves $\varepsilon_T(T)$ from the baseline, it is possible to determine quite accurately the temperatures when the process of devitrification of amorphous fractions in the investigated frozen solutions starts [14]. The third stage ($T'_R \dots T_{\beta a}$) is characterized by a decrease in the derivative $\partial \varepsilon / \partial T$, which then again increases sharply at the time of transition to the fourth stage at $T > T_{\beta a}$.

To explain such a complex type of thermoplastic curves $\varepsilon_T(T)$ it is necessary to analyze the structure of deformed samples and their plastic fluidity regularities under conditions of continuous heating and constant external load $\sigma = \sigma_1 = \text{const}$. Naturally, the structure of frozen cryoprotective solutions is described by their state diagrams at

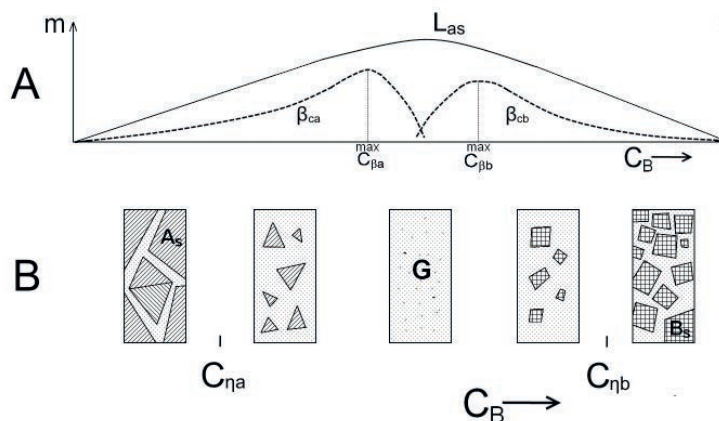


Рис. 3. Концентраційні залежності величини L_{as} (суцільна крива) і маси кластерних фаз $m_{\beta a}$ і $m_{\beta b}$ (пунктирна крива) (А); фрагменти структур кріопротекторних розчинів, що розсклувалися, які відповідають різним значенням вихідної концентрації C_b (В).

Fig. 3. Concentration dependences of L_{as} value (solid curve) and $m_{\beta a}$ and $m_{\beta b}$ cluster phases mass (dotted curve) (А); fragments of structures of devitrified cryoprotective solutions, which correspond to different values of initial concentration of C_b (В).



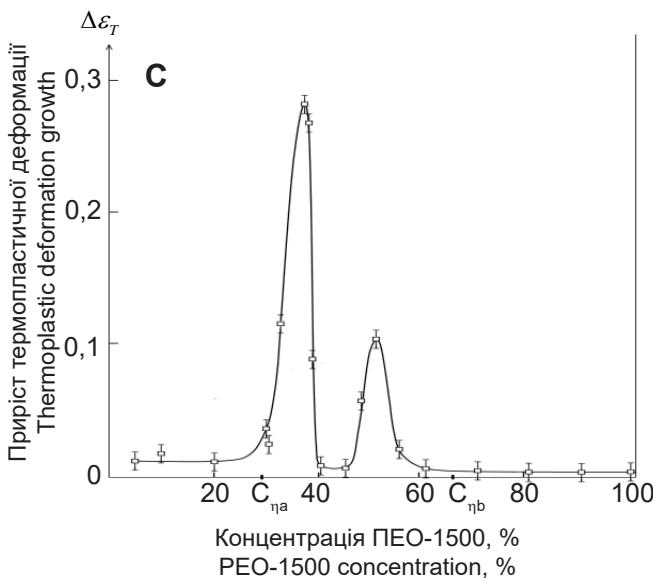
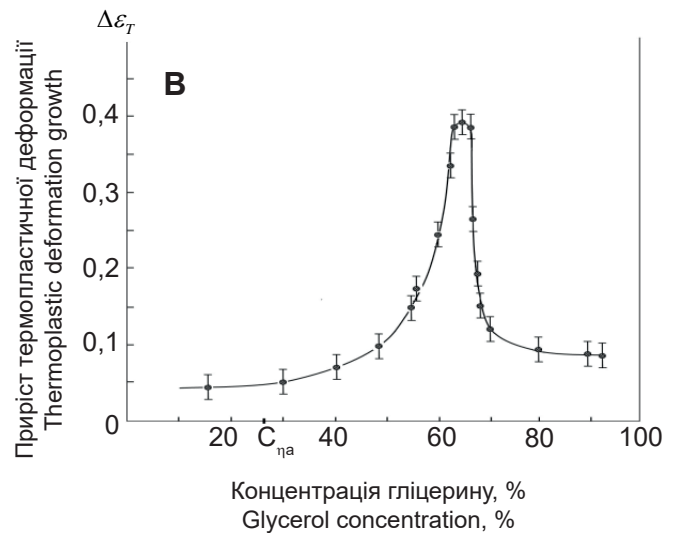
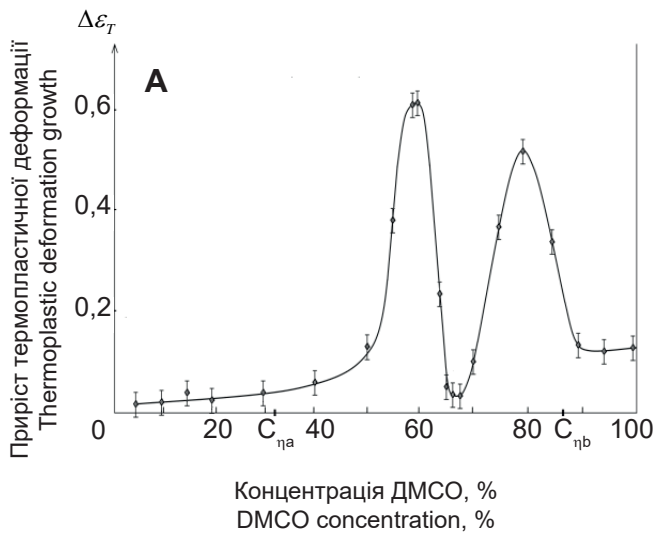


Рис. 4. Концентраційні залежності приросту термопластичної деформації $\Delta\varepsilon_T$ для водяних розчинів: **A** – ДМСО ($\sigma = 3 \times 10^6$ Н/м²); **B** – гліцерину ($\sigma = 2 \times 10^6$ Н/м²); **C** – ПЕО-1500 ($\sigma = 7 \times 10^5$ Н/м²).

Fig. 4. Concentration dependences of increase of thermoplastic deformation $\Delta\varepsilon_T$ for aqueous solutions: **A** – DMSO ($\sigma = 3 \times 10^6$ N/m²); **B** – glycerol ($\sigma = 2 \times 10^6$ N/m²); **C** – PEO-1500 ($\sigma = 7 \times 10^5$ N/m²).

де ϕ – коефіцієнт розмірності; ΔT – зміна температури.

У цьому випадку для приросту деформації зразка $\Delta\varepsilon_T$ ΔT в інтервалі температур $T_g + \Delta T$ можна записати як

$$\Delta\varepsilon_T = g\sigma\phi\Delta T \cdot \exp\left(-\frac{Q}{k(T_g + \Delta T)}\right) / \eta_0. \quad (3)$$

Згідно з формулою (3) величина $\Delta\varepsilon_T$ за умови $\sigma = \text{const}$ і $\Delta T = \Delta T_1 = \text{const}$ повинна залишатися незмінною або монотонно зменшуватися зі збільшенням концентрації криопротекторної речовини. Остання умова обумовлена можливим збільшенням в'язкості розчину, який розсклувався, що враховується коефіцієнтом η_0 .

Експериментально отримані для різних криопротекторних розчинів залежності $\Delta\varepsilon_T = \Delta\varepsilon_T(C_B)$ при $\Delta T = \text{const}$ наведено на рис. 4.

the cooling stage. Fig. 2 schematically shows such a diagram. According to it in cooled aqueous solutions with a concentration of cryoprotective substance within the range of $C_B < C_{ca}$ the ice crystals A_s are formed until the solution reaches the concentration of C_{ca} . Further cooling of the remaining liquid fraction with a concentration of $C_B = C_{ca}$ leads to its vitrification at $T = T_g$ [2, 22]. Similar processes are observed in a cooled solution with a concentration of $C_B > C_{cb}$ with the difference that the formation of crystals of cryoprotective substance B_s in it occurs before reaching the concentration of C_{cb} . Particular attention should be paid to the structure of the liquid phase L. At temperatures above a certain association temperature T_{as} the phase L is a mixture of water molecules A, the ones of cryoprotective substance B and hydrated molecules of cryoprotectant A_nB (n is the number of water molecules bound by hydrogen bonds to the molecule B).

The ratio of these molecules in the solution L obviously varies depending on the concentration of C_B . Below the temperature of T_{as} , which is determined by the change in entropy [17], the association of hydrated A_nB molecules in complexes $(A_nB)_m$ begins [7, 10, 11, 13]. This process is not a phase transition, because here the phase boundaries are not formed and the principle of the composition constancy for the L_{as} fraction is not implemented. The dependence of the mass of the L_{as} fraction on the concentration of C_B is shown in Fig. 3, A. Fig. 3,

Схему визначення величини $\Delta\epsilon_T$ наведено на рис. 1. Фактично $\Delta\epsilon_T$ – це приріст деформації зразка за умов його нагрівання від температури початку процесу розкльовання T_g до деякої температури $T_1 = T_g + \Delta T$. При цьому величина ΔT для ДМСО становила 15°C , гліцерину – 10°C і ПЕО-1500 – 5°C , тобто вона зменшувалася з підвищенням температури розкльовання аморфних фракцій у відповідному кріопротекторному розчині. Такі зміни пов'язані зі спостережуваним зменшенням в'язкості цих фракцій і підвищенням їх плинності в відповідних температурних інтервалах.

Вид представлених на рис. 4 залежностей принципово відрізняється від зміни величини $\Delta\epsilon_T(C_B)$, що підтверджує формула (3). Очевидно, що цей факт є наслідком процесів, які відбуваються в досліджуваній системі та супроводжуються екзо- і ендотермічними ефектами. В такому випадку величина $\Delta\epsilon_T$ визначається конкуренцією двох процесів: нагріванням зразка за рахунок зовнішнього тепла Q^+ , яке надходить від нагрівачів системи сканування температури, та його охолодження/нагрівання внаслідок внутрішніх екзо- (Q_c^+) або ендотермічних (Q_c^-) процесів.

Природно, якщо для загальної кількості енергії Q_Σ виконується умова

$$Q_\Sigma = Q^+ + Q_c^+, \quad (4)$$

то швидкість пластичної течії $\dot{\epsilon}_T$ і, відповідно, величина $\Delta\epsilon_T$ будуть зростати в концентраційних інтервалах, у яких реалізується екзотермічний процес.

Якщо ж виконується умова

$$Q_\Sigma = Q^+ + Q_c^-, \quad (5)$$

то величини $\dot{\epsilon}_T$ і $\Delta\epsilon_T$ будуть зменшуватися.

Нерівність

$$Q_\Sigma = Q^+ + Q_c^- < 0, \quad (6)$$

яка виконується при

$$|Q^+| < |Q_c^-|, \quad (7)$$

буде відповідати умовам $\dot{\epsilon}_T = 0$; $\Delta\epsilon_T = 0$.

З урахуванням співвідношень (4)–(7) можна пояснити вид термомеханічних кривих на рис. 1 та залежності $\Delta\epsilon_T(C_B)$ на рис. 4. Згідно з рис. 4 швидкість пластичної течії розчину, який розкльовувався, зростає з підвищенням температури більш інтенсивно, ніж це впливає з формул (1)–(3). Даний факт вказує на додатковий розігрів

B demonstrates the structural fragments of frozen solutions, which are formed along the axis of concentrations of C_B according to the diagram of Fig. 2. Based on the presented fragments, we can assume that the plastic fluidity of samples is higher than the temperature T_g within the range of concentrations $C_{\eta^a} < C_B < C_{\eta^b}$ will completely obey the law of flow of Newtonian fluid [8].

$$\dot{\epsilon} = r \sigma / \eta, \quad (1)$$

where r is coefficient that takes into account the deformation geometric parameters; σ – applied load; η is dynamic viscosity of liquid phase, which is determined by the formula:

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{Q}{kT}\right), \quad (2)$$

where η_0 is normalization factor; Q is activation energy of viscous fluidity; K – Boltzmann constant; T – temperature.

When obtaining thermomechanical curves in the mode of slow uniform heating with sufficient accuracy, you can calculate the speed of thermo-plastic fluidity:

$$\dot{\epsilon} = \Delta\epsilon_T / \Delta t,$$

where $\Delta\epsilon_T$ is the increment in deformation and time of temperature change by the value of ΔT :

$$\Delta t = \phi \Delta T,$$

where ϕ is dimensionality factor; ΔT – temperature change.

In this case, for the increment in deformation $\Delta\epsilon_T \Delta T$ within the temperature range $T_g + \Delta T$ can be written as

$$\Delta\epsilon_T = r \sigma \phi \Delta T \cdot \exp\left(-\frac{Q}{k(T_g + \Delta T)}\right) / \eta_0. \quad (3)$$

According to formula (3), the value of $\Delta\epsilon_T$ if $\sigma = \text{const}$ and $\Delta T = \Delta T_1 = \text{const}$ must remain unchanged or decrease monotonically with a rise in concentration of cryoprotective substance. The latter condition is explained by a possible increase in the viscosity of the solution that has devitrified, which is taken into account by the η_0 coefficient.

The dependences $\Delta\epsilon_T = \Delta\epsilon_T(C_B)$ at $\Delta T = \text{const}$ obtained experimentally for different cryoprotective solutions are shown in Fig. 4.

The scheme for determining the value of $\Delta\epsilon_T$ is presented in Fig. 1. Actually, $\Delta\epsilon_T$ is the increment



досліджуваних зразків за рахунок екзотермічних процесів, які в них протікають. Таким процесом може бути утворення кластерних часток β_{ca} на основі мікрокристалів льоду a_s . Оскільки утворення фази β_{ca} відбувається в аморфній фракції G, то вона фактично є інтегральним тепловим датчиком, який вбудовано в заморожений зразок. При цьому описане явище має дві особливості: 1 – протікання в певному інтервалі температур $T_g \dots T_{ca}$ (див. рис. 4); 2 – залежність інтенсивності явища від концентрації C_b та наявності максимуму при $C_b = C_{\beta a}^{max}$ (див. рис. 3, А).

Описані особливості легко пояснити для швидко охолоджуваних розчинів за допомогою кластерної кристалізації, яка починається відразу після розклування аморфних фракцій і збільшення рухливості комплексів $(A_n B)_m$, де m – кількість гідратованих молекул В у комплексі. При цьому кластерна кристалізація визначається розміром критичного зародка кристалічного льоду δ_{as} , який зменшується зі зниженням температури (див. рис. 4). Тому близькі до T_g температури є оптимальними для утворення кластерної фази. З підвищенням температури розмір критичного зародка δ_{as} збільшується, що ускладнює утворення кластерних часток, яке відбувається без розриву водневих зв'язків у комплексах $(A_n B)_m$. Наближення до температури T_R викликає часткове плавлення кластерної фази, яке супроводжується поглинанням тепла та різким зменшенням швидкості $\dot{\epsilon}_T$. Цей процес начисто відображають термомеханічні криві (див. рис. 1), за якими можна чітко визначити температурний інтервал існування кластерної фази $T_g \dots T_{\beta a}$.

Крім того, швидкість утворення кластерної фази залежить від наявності в розчині комплексів $(A_n B)_m$, кількість яких збільшується з підвищенням концентрації C_b в інтервалі $C_{\beta a} < C_b < C_{ga}$. За цих умов спостерігається збільшення швидкості кластерної кристалізації та інтенсивності тепловиділення. В результаті величина $\Delta\epsilon_T$, яка відображає процес тепловиділення, зростає до певних значень концентрацій $C_b = C_{\beta a}^{max}$ (див. рис. 3, А).

Надалі при $C_b = C_{\beta a}^{max}$ кількість комплексів $(A_n B)_m$, здатних утворювати кластерні частки на основі мікрокристалів льоду, зменшується через нестачу молекул води. Це приводить до утворення характерного максимуму на залежності $\Delta\epsilon_T(C_b)$ при $C_b = C_{\beta a}^{max}$. Маса утвореної кластерної фази умовно показана пунктирною кривою на рис. 3, А.

Слід зазначити, що температурні та концентраційні інтервали утворення кластерної фази

in the sample deformation if it is heated from the temperature of the beginning of the glass transition T_g to some temperature $T_1 = T_g + \Delta T$. The value of ΔT for DMSO was 15°C, glycerol – 10°C and PEO-1500 – 5°C, *i. e.* it decreased with increasing glass transition temperature of amorphous fractions in the corresponding cryoprotective solution. Such changes are associated with the observed decrease in the viscosity of these fractions and an increase in their fluidity within the corresponding temperature ranges.

The type presented in Fig. 4 dependences are fundamentally different from the change in the value of $\Delta\epsilon_T(C_b)$, which is confirmed by formula (3). This fact is obviously a consequence of the processes that occur in the studied system and are accompanied by exothermic and endothermic effects. In this case, the value of $\Delta\epsilon_T$ is determined by two competitive processes: heating of the sample due to external heat Q^+ , which comes from the heaters of the temperature scanning system, and its cooling / heating due to internal exo- (Q_c^+) or endothermic (Q_c^-) processes.

Naturally, if the condition is satisfied for the total amount of energy Q_Σ

$$Q_\Sigma = Q^+ + Q_c^+, \quad (4)$$

then the velocity of plastic fluidity ϵ_T and, accordingly, the value of $\Delta\epsilon_T$ will increase in the concentration intervals in which the exothermic process is implemented.

If the condition is met

$$Q_\Sigma = Q^+ + Q_c^-, \quad (5)$$

then the values of ϵ_T and $\Delta\epsilon_T$ will decrease.

Inequality

$$Q_\Sigma = Q^+ + Q_c^- < 0, \quad (6)$$

which is performed when

$$Q_\Sigma = Q^+ + Q_c^- < 0, \quad (7)$$

will meet the conditions $\dot{\epsilon}_T = 0$; $\Delta\dot{\epsilon}_T = 0$.

Taking into account the relations (4)–(7), we can explain the type of thermomechanical curves in Fig. 1 and dependence of $\Delta\epsilon_T(C_b)$ in Fig. 4. Fig. 4 shows the velocity of the plastic flow of the devitrified solution increases with rising temperature more intensively than it follows from formulas (1)–(3). This fact indicates the additional heating of the studied samples due to the exothermic processes that take place in them. This process can be the formation

повністю збігаються з цими інтервалами для явища «девітрифікації» [1, 2, 12, 17, 19, 20]. Цей термін часто використовують у кріобіологічній літературі для визначення процесів кристалізації, які починаються відразу після нагрівання досліджуваних систем вище температур розкльовання T_g . Однак природа цього явища і структура фаз, які утворюються під час його розвитку, вченими не обговорюється. Крім того, на нашу думку, термін «девітрифікація» в даному випадку вважається некоректним, оскільки він доречний для опису процесів кристалізації у твердій аморфній фракції, а спостережувана кристалізація протікає у рідкій фазі, яка вже розкльовалася. Очевидно, що явище «девітрифікації» є кластерною кристалізацією в попередньо заморожених кріопротекторних розчинах або біосистемах, які кріоконсервуються з їх використанням.

Особливо слід розглянути другий пік на залежностях $\Delta\varepsilon_T(C_B)$ для розчинів ДМСО і ПЕО-1500 при $C_B > C_{gb}$. Очевидно, що він пов'язаний із утворенням частинок кластерної фази на основі мікрочастин b_s кріопротекторної речовини В. У цьому випадку значення $\Delta\varepsilon_T$ починають підвищуватися з концентрацій $C_B > C_{gb}$ і тривають у міру збільшення гідратованих молекул В до $C_B = C_{\beta a}^{\max}$. Подальше зниження значень $\Delta\varepsilon_T$ пов'язане зі зменшенням кількості клатратів на основі молекул кріопротектора В.

Правомірність концепції щодо природи другого піку на залежностях $\Delta\varepsilon_T(C_B)$ для розчинів ДМСО і ПЕО-1500 підтверджує відсутність такого для розчинів гліцерину. Це може бути пов'язано з нездатністю гліцерину кристалізуватися в процесі традиційно використовуваних у кріобіології режимів охолодження-нагрівання його водяних розчинів.

Узагальнити отримані при нагріванні заморожених розчинів результати дослідження можна за допомогою діаграми станів, на якій показано ділянки існування кластерної фази β_c (див. рис. 2). Згідно з діаграмою після нагрівання попередньо заморожених розчинів при $T_g \dots T_{\beta}$ у них формується кластерна фаза β_c , природа і кінетика утворення якої залежить від концентрації розчину, що нагрівається. За концентрацій $C_0 < C_B < C_{\beta a}$ кластерна фаза на основі мікрочастин льоду a_s виникає на тлі вже наявних кристалів льоду a_s . При $C_{\beta a} < C_B < C_{ga}$ у розчині, що розкльовувався, існує тільки дві фази: (L + β_{ca}). При $C_B > C_{gb}$ кластерні частинки утворюються на основі мікрочастин кріопротекторної речовини b_s . При цьому в діапазоні концентрацій $C_{gb} < C_B < C_{\beta b}$ існують дві фази

of cluster particles β_{ca} on the basis of ice microcrystals a_s . Since the formation of the β_{ca} phase occurs in the amorphous fraction G, it is in fact an integrated thermal sensor, which is built into the frozen sample. The described phenomenon has two features: 1 – proceeding in a certain temperature range $T_g \dots T_{ca}$ (see Fig. 4); 2 – the dependence of intensity of the phenomenon on the concentration of C_B and the presence of a maximum at $C_B = C_{\beta a}^{\max}$ (see Fig. 3A).

The described features can be easily explained for rapidly cooled solutions by cluster crystallization, which begins immediately after devitrification of amorphous fractions and increasing the mobility of complexes $(A_n B)_m$, where m is the number of hydrated molecules B in the complex. The cluster crystallization is determined by the size of the critical nucleus of crystalline ice δ_{as} , which reduces with decreasing temperature (Fig. 4). Therefore, temperatures close to T_g are optimal for the cluster phase formation. The temperature increases, the size of the critical nucleus δ_{as} increases, that complicates the formation of cluster particles, which occurs without breaking the hydrogen bonds in the complexes $(A_n B)_m$. Approximation to the temperature T_R causes partial melting of the cluster phase, which is accompanied by heat absorption and a sharp decrease in the velocity $\dot{\varepsilon}_T$. This process is clearly reflected in thermomechanical curves (see Fig. 1), which can clearly determine the temperature interval of the cluster phase $T_g \dots T_{\beta a}$.

In addition, the rate of the cluster phase formation depends on the presence in the solution of complexes $(A_n B)_m$, the number of which increases with a rise in concentration of C_B within the range of $C_{\beta a} < C_B < C_{ga}$. Under these conditions, there is an increase in the rate of cluster crystallization and heat intensity. As a result, the value of $\Delta\varepsilon_T$, which reflects the process of heat release, increases to certain values of concentrations $C_B = C_{\beta a}^{\max}$ (see Fig. 3A).

In future, at $C_B = C_{\beta a}^{\max}$, the number of complexes $(A_n B)_m$ capable of forming cluster particles based on ice microcrystals decreases due to the lack of water molecules. This leads to the formation of a characteristic maximum on the dependence $\Delta\varepsilon_T(C_B)$ at $C_B = C_{\beta a}^{\max}$. The mass of the formed cluster phase is conditionally shown by the dotted curve in Fig. 3A.

It should be noted that the temperature and concentration intervals of cluster phase formation completely coincide with these intervals for the phenomenon of 'devitrification' [1, 6, 9, 12, 23, 24]. This term is often used in reported cryobiological studies to describe the crystallization processes that begin immediately after heating the studied systems above the devitrification temperatures T_g .



$(L + \beta_{cb})$, а в діапазоні $C_B > C_{\beta b}$ – три $(L + B_s + \beta_{cb})$. Варто виокремити діапазон концентрацій $C_{ga} < C_B < C_{gb}$, в якому можна спостерігати три фази $(L + \beta_{ca} + \beta_{cb})$. Встановлений факт суперечить правилу розмірності меж фазової діаграми [9], згідно з яким у цій ділянці може існувати тільки одна фаза L. Такому стану відповідає і вид залежностей $\Delta\epsilon_T(C_B)$ (див. рис. 3). З урахуванням значення $\Delta\epsilon_T$ у діапазоні $C_{ga} \dots C_{gb}$ можна вважати, що кластерні фази тут практично не утворюються. Ймовірно, описаний факт є наслідком високих значень температури склування T_g для досліджуваних кріопротекторних розчинів. При $T_g \rightarrow T_{g0}$ інтервал $C_{ga} \dots C_{gb}$ буде мати вигляд точки (див. рис. 2) [9]. Важливо зауважити, що представлена на рис. 2 діаграма є узагальненою, а її параметри можуть змінюватися залежно від виду кріопротекторної речовини. Типовий приклад такої зміни демонструють водяні розчини гліцерину, в яких при $C_B > C_{gb}$ ані кластерна фаза β_{cb} , ані кристали B_s не утворюються, що пояснює відсутність правої частини на діаграмі станів водяних розчинів гліцерину при $T > T_g$.

Термомеханічний аналіз заморожених кріопротекторних розчинів істотно розширює уявлення про природу їх кластерної кристалізації. Термопластичні криві дозволяють фіксувати як температурний інтервал існування кластерної фази, так і концентраційну залежність кінетики кластерної кристалізації.

В результаті з'являється можливість класифікації кріопротекторних розчинів за параметрами їх кластерної кристалізації. Така класифікація необхідна для встановлення механізмів пошкодження кріоконсервованих біоб'єктів в інтервалі температур склування.

Висновки

Таким чином, розроблено методику вивчення кластерної кристалізації водяних кріопротекторних розчинів шляхом реєстрації їх термопластичної деформації в процесі відтавання в інтервалі температур $-150 \dots -30^\circ\text{C}$.

Визначено температурні та концентраційні інтервали розвитку кластерної кристалізації на етапі відтавання заморожених кріозахисних розчинів.

Вперше встановлено факт утворення кластерної фази на основі мікрокристалів кріопротекторної речовини.

Сформульовано принцип побудови повних діаграм стану кріозахисних розчинів і проведено аналіз їх особливостей для різних видів кріопротекторних речовин.

However, the nature of this phenomenon and structure of the phases that are formed during its development, scientists do not discuss. In addition, we believe the term 'devitrification' in this case is considered as incorrect, because it is appropriate to describe the crystallization processes in the solid amorphous fraction, and the observed crystallization occurs in liquid phase, which has already devitrified. It is obvious that the phenomenon of 'devitrification' is cluster crystallization in pre-frozen cryoprotective solutions or biosystems that are cryopreserved with their use.

In particular, we should consider the second peak on the dependences $\Delta\epsilon_T(C_B)$ for solutions of DMSO and PEO-1500 at $C_B > C_{gb}$. Obviously, it is associated with the formation of particles of the cluster phase based on microcrystals b_s of cryoprotective substance B. In this case, the values of $\Delta\epsilon_T$ begin to increase with concentrations $C_B > C_{gb}$ and continue as hydrated molecules B to $C_B = C_{\beta d}^{\max}$. A further decrease in the values of $\Delta\epsilon_T$ is associated with a decrease in the number of clathrates based on cryoprotectant B molecules.

The legitimacy of the concept regarding the nature of the second peak on the dependences $\Delta\epsilon_T(C_B)$ for DMSO and PEO-1500 solutions confirms the absence of such for solutions of glycerol. This may be due to the inability of glycerol to crystallize during the traditionally used in cryobiology cooling-heating modes of its aqueous solutions.

To summarize the findings obtained by heating the frozen solutions a state diagram, which shows the areas of existence of the cluster phase β_c (see Fig. 2) can be used. According to the diagram, after heating the pre-frozen solutions at $T_g \dots T_{\beta}$, a cluster phase β_c is formed in them, the nature and kinetics of the formation of which depend on the concentration of the heated solution. At concentrations $C_0 < C_B < C_{\beta a}$, a cluster phase based on microcrystals of ice a_s arises when A_s crystals already exist. At $C_{\beta a} < C_B < C_{ga}$ in the devitrified solution, there are only two phases: $(L + \beta_{ca})$. When $C_B > C_{gb}$ cluster particles are formed on the basis of microcrystals of cryoprotective substance b_s . In the range of concentrations $C_{gb} < C_B < C_{\beta b}$ there are two phases: $(L + \beta_{cb})$, and in the range $C_B > C_{\beta b}$ three: $(L + B_s + \beta_{cb})$. It is necessary to distinguish the range of concentrations $C_{ga} < C_B < C_{gb}$, in which three phases can be observed: $(L + \beta_{ca} + \beta_{cb})$. The established fact contradicts the rule of dimension of the boundaries of the phase diagram [18], according to which in this section there can be only one phase L. This state corresponds to the type of dependences $\Delta\epsilon_T(C_B)$ (see Fig. 3). Given the value of $\Delta\epsilon_T$ in the range $C_{ga} \dots C_{gb}$, we can assume that cluster phases are prac-



Література

1. Зинченко АВ, Боброва ЕН, Щетинский МИ. Влияние глицерина и 1,2-пропандиола на фазовые переходы и стеклования в суспензии эритроцитов кордовой крови при температуре ниже 0°C. *Доповіді НАН України*. 2003; (12): 155–60.
2. Зинченко АВ, Боброва ЕН, Щетинский МИ. Влияние ДМСО на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови ниже 0°C. *Проблемы криобиологии*. 2003; (2): 16–21.
3. Зинченко АВ, Манк ВВ, Моисеев ВА. О фазовых переходах и физических состояниях систем вода-пропандиол. *Доклады АН СССР*. 1983; 269 (1): 144–6.
4. Кухлинг К. *Справочник по физике*. Москва: Мир; 1985. 520 с.
5. Моисеев ВА, Зинченко ВД, Манк ВВ, Овчаренко ФД. Исследование водных смесей полиэтиленгликолей методом ЯМР. *Коллоидный журнал*. 1977; 39 (1): 30–5.
6. Моисеев ВА, Манк ВВ, Зинченко ВД, Нардид ОА. Комплексующие свойства полиэтиленгликолей. В: *Современные проблемы криобиологии и криомедицины*. Москва: Внешторгиздат; 1975. 42–8.
7. Осецкий АИ, Кириллюк АЛ, Гурина ТМ. Изучение кинетики расстеклования водных растворов криопротекторов методом термопластической деформации. *Проблемы криобиологии*. 2005; 15 (2): 137–46.
8. Осецкий АИ. К теории диаграмм состояния криопротекторных растворов. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2014; 24 (2): 102–17.
9. Осецкий АИ, Севастьянов СС. Влияние водородных связей на кинетику кристаллизации водных растворов криопротекторных веществ. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2016; 26 (3): 199–212.
10. Тейтельбаум Б Я. *Термомеханический анализ полимеров*. Москва: Наука; 1979. 236 с.
11. Уэндландт УУ. *Термические методы анализа*. Москва: Мир; 1978. 526 с.
12. Abidalla M, Roversi PF. Vitrification Assessment: Thermal analysis of cryoprotective aqueous solutions 1,2 propanediol and ethylene glycol. *Biopreservation and biobanking*. 2018; 16 (3): 207–16.
13. Boutron P, Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water – glycerol – dimethylsulphoxide. *Cryobiology*. 1978; 15 (1): 93–108.
14. Cocks FA, Brower WE. Phase diagram relationships in cryobiology. *Cryobiology*. 1974; 1 (4): 340–58.
15. Flores-Ramirez AJ, Garcia-Coronado P, Grajales-Lagunes A, Gonzalez R. Freeze-concentrated phase and state transition temperatures of mixtures of low and high molecular weight cryoprotectants. *Advances in Polymer Technology*. 2019: 1–11.
16. Gosh RC, Toda A, Tanaka S. The effect of NaCl on the eutectic phase behavior of aqueous poly (ethylene glycol) solutions. *Polymer*. 2009; 50 (5): 1304–10.
17. Hey JM, MacFarlane DR. Kinetic analyses of crystallization and devitrification: Comparison of activation energies in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulphoxide. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1997; 211 (3): 262–70.
18. Kanno H, Kajiwara K, Miyata K. Supercooling of aqueous dimethylsulfoxide solution at normal and high pressures: evidence for the coexistence of phase-separated aqueous dimethylsulfoxide solutions of different water structures. *Journal of Chemical Physics*. 2010; 132 (19): 194503-1–194503-8.
19. MacFarlane DR. Devitrification in glass-forming aqueous solutions. *Cryobiology*. 1986; 23 (3): 230–44.
20. Mullen S, Critser J. *The Science of Cryobiology*. In: Woodruff T, Snyder K, editors. *Oncofertility fertility preservation for cancer survivors. Part of the Cancer treatment and research book series (CTAR, volume 138)*. Boston: Springer; 2007. p. 83–109.
21. Murata K, Tanaka H. Liquid – liquid transition without macroscopic phase separation in a water – glycerol mixture. *Nature materials*. 2012; 11 (5): 436–43.

tically not formed here. Probably, the described fact is a consequence of high values of glass transition temperature T_g for the studied cryoprotective solutions. For $T_g \rightarrow T_{g0}$, the interval $C_{ga} \dots C_{gb}$ will have the form of a point (Fig. 2) [18]. It is important to note that diagram in Fig. 2 is generalized, and its parameters may vary depending on the type of cryoprotective substance. A typical example of such a change is shown by aqueous solutions of glycerol, in which at $C_B > C_{Bb}$ neither cluster phase β_{cb} nor B_s crystals are formed, which explains the absence of the right part on the state diagram of aqueous solutions of glycerol at $T > T_g$.

Thermomechanical analysis of frozen cryoprotective solutions significantly expands the understanding of the nature of their cluster crystallization. Thermoplastic curves make it possible to record both the temperature interval of the cluster phase and concentration dependence of the kinetics of cluster crystallization.

As a result, it is possible to classify cryoprotective solutions according to their cluster crystallization parameters. This classification is necessary to establish the mechanisms of damage to cryopreserved biological systems within the range of glass transition temperatures.

Conclusions

Thus, a method for studying the cluster crystallization of aqueous cryoprotective solutions by recording their thermoplastic deformation during thawing within the temperature range of $-150 \dots -30^\circ\text{C}$ has been developed.

Temperature and concentration intervals of cluster crystallization development at the stage of thawing of frozen cryoprotective solutions have been determined.

For the first time the fact of formation of a cluster phase on the basis of microcrystals of cryoprotective substance has been established.

The principle of building of complete diagrams of the state of cryoprotective solutions has been coined and their features for different types of cryoprotective substances have been analyzed.

References

1. Abidalla M, Roversi PF. Vitrification Assessment: Thermal analysis of cryoprotective aqueous solutions 1,2 propanediol and ethylene glycol. *Biopreservation and Biobanking*. 2018; 16 (3): 207–16.
2. Boutron P, Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water – glycerol – dimethylsulphoxide. *Cryobiology*. 1978; 15 (1): 93–108.
3. Cocks FA, Brower WE. Phase diagram relationships in cryobiology. *Cryobiology*. 1974; 1 (4): 340–58.



22. Osetsky AI. Peculiarities of state diagrams of aqueous solutions of cryoprotective agents. *Cryobiology*. 2009; 59 (2): 141–9.
23. Osetsky AI. Thermodynamic aspects of cluster crystallization in cryoprotective solutions. *CryoLetters*. 2011; 32 (3): 216–24.
24. Rasmussen DH, MacKenzie AP. Phase diagram for the system water – dimethylsulphoxide. *Nature*. 1968; 220: 1315–7.
25. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*. 2010; 60 (1): 11–22.
26. Zhivotova EN, Zinchenko AV, Kuleshova LG, Chekanova VV, Kompaniets AM. Physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 30$ at temperatures lower than 283 K. *CryoLetters*. 2007; 28 (4): 261–70.
4. Flores-Ramirez AJ, Garcia-Coronado P, Grajales-Lagunes A, Gonzalez R. Freeze-concentrated phase and state transition temperatures of mixtures of low and high molecular weight cryoprotectants. *Advances in Polymer Technology*. 2019; 1–11.
5. Gosh RC, Toda A, Tanaka S. The effect of NaCl on the eutectic phase behavior of aqueous poly (ethylene glycol) solutions. *Polymer*. 2009; 50 (5): 1304–10.
6. Hey JM, MacFarlane DR. Kinetic analyses of crystallization and devitrification: Comparison of activation energies in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulphoxide. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1997; 211 (3): 262–70.
7. Kanno H, Kajiwarw K, Miyata K. Supercooling of aqueous dimethylsulfoxide solution at normal and high pressures: evidence for the coexistence of phase-separated aqueous dimethylsulfoxide solutions of different water structures. *Journal of Chemical Physics*. 2010; 132 (19): 194503-1–194503-8.
8. Kikhling Kh. [Physics reference]. Moscow: Mir; 1985. 520p. Russian.
9. MacFarlane DR. Devitrification in glass-forming aqueous solutions. *Cryobiology*. 1986; 23 (3): 230–44.
10. Moiseev VA, Mank VV, Zinchenco VD, et al. [Complexing properties of polyethylene glycols. In: Current Problems of Cryobiology and Cryomedicine]. Moscow: Vneshtorgizdat; 1975. 42–8. Russian.
11. Moiseev VA, Zinchenco VD, Mank VV, et al. [Investigation of aqueous mixtures of polyethylene glycols by NMR]. *Kolloidnyi Zhurnal*. 1977; 39 (1): 30–5. Russian.
12. Mullen S, Critser J. The Science of Cryobiology. In: Woodruff T, Snyder K, editors. *Oncofertility fertility preservation for cancer survivors. Part of the Cancer treatment and research book series (CTAR, volume 138)*. Boston: Springer; 2007. p. 83–109.
13. Murata K, Tanaka H. Liquid – liquid transition without macroscopic phase separation in a water – glycerol mixture. *Nature Materials*. 2012; 11 (5): 436–43.
14. Osetsky AI, Kirilyuk AL, Gurina TM. Study of devitrification kinetics of cryoprotectant aqueous solutions using thermoplastic deformation method. *Problems of Cryobiology*. 2005; 15 (2): 137–46.
15. Osetsky AI. Peculiarities of state diagrams of aqueous solutions of cryoprotective agents. *Cryobiology*. 2009; 59, (2): 141–9.
16. Osetsky AI. Thermodynamic aspects of cluster crystallization in cryoprotective solutions. *CryoLetters*. 2011; 32 (3): 216–24.
17. Osetsky AI. To Theory of Diagrams of State for Cryoprotective Solutions. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2014; 24 (2): 102–17.
18. Osetsky AI, Sevastyanov SS. Effect of hydrogen bonds on crystallization kinetics of aqueous solutions of cryoprotective agents. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2016; 26 (3): 199–212.
19. Rasmussen DH, MacKenzie AP. Phase diagram for the system water – dimethylsulphoxide. *Nature*. 1968; 220: 1315–7.
20. Teitelbaum BY. [Thermomechanical analysis of polymers]. Moscow: Nauka; 1979. 236 p. Russian.
21. Wendlandt W. *Thermal Methods of Analysis*. New York: Wiley; 1974. 505 p.
22. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*. 2010; 60 (1): 11–22.
23. Zinchenco AV, Bobrova EN, Schetinskiy MI. [Glycerol and 1,2 propanediol effect on phase transitions and vitrification in cord blood erythrocyte suspension under 0°C]. *Dopovidi NAN Ukrainy*. 2003; (12): 155–60. Russian.
24. Zinchenco AV, Bobrova EN, Schetinskiy MI. DMSO effect on phase transitions and vitrification in cord blood erythrocyte suspension under 0°C. *Problems of Cryobiology*. 2003; (2): 16–21.
25. Zinchenco AV, Mank VV, Moiseev VA. [About phase transitions and physical states of water-propanediol system]. *Doklady Akademiy Nauk SSSR*. 1983; 269 (1): 144–6. Russian.
26. Zhivotova EN, Zinchenko AV, Kuleshova LG, Chekanova VV, Kompaniets AM. Physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 30$ at temperatures lower than 283 K. *CryoLetters*. 2007; 28 (4): 261–70.

