

УДК 547.458.2:547.42:536.425:536.48

Є.І. Смольянінова\*, О.М. Боброва

## Низькотемпературні фазові переходи у сахарозовмісних розчинах деяких кріопротекторів

UDC 547.458.2:547.42:536.425:536.48

Y.I. Smolyaninova\*, O.M. Bobrova

## Low Temperature Phase Transitions in Sucrose-Containing Solutions of Some Cryoprotectants

**Ключові слова:** низькі температури, фазові переходи, кріопротектори, сахароза, калориметрія.

**Key words:** low temperatures, phase transitions, cryoprotectants, sucrose, calorimetry.

Сахароза — це природний вуглевод, який широко застосовується під час низькотемпературного консервування біологічних об'єктів [3] як основний кріопротектор [5, 7] та в комбінації з гліцерином [4], етиленгліколем (ЕГ) [2] і диметилсульфоксидом (ДМСО) [3]. Відомо, що важливим чинником, який впливає на результат кріоконсервування, є склад кріозахисних середовищ. Саме співвідношення в середовищі проникних та непроникних у клітини кріозахисних речовин дозволяє уникнути процесів кристалізації на етапах охолодження та відігріву. Пошук ефективного складу кріозахисних середовищ є актуальним і на сьогодні [1, 3, 8].

Метою роботи було дослідження низькотемпературних фазових переходів у сахарозовмісних розчинах кріопротекторів: гліцерину, 1,2-пропандіолу, 1,3-пропандіолу, етиленгліколю та диметилсульфоксиду.

Кріозахисні середовища містили 30% (v/v) кріопротектора та 0,7 М сахарози. Розчини готували на фізіологічному середовищі Дюльбеко. Фазові переходи у розчинах кріопротекторів досліджували методом диференційної сканувальної калориметрії (ДСК) на етапі нагрівання охолоджених зразків зі швидкістю 0,5 град/хв [1].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили у програмі Statgraphics Plus 2.1 (Manugistic, США),  $n = 6$ .

Sucrose is a natural carbohydrate being widely used during low-temperature preservation of biological objects [3] as the main cryoprotectant [3, 6] as well as in combination with glycerol [2], ethylene glycol (EG) [5] and dimethyl sulfoxide (DMSO) [1]. An important factor affecting the result of cryopreservation is known to be the composition of cryoprotective media. It is the ratio in the media of cell-permeable and cell-impermeable cryoprotective substances which allows avoiding crystallization processes during the stages of cooling and thawing. The search for an effective composition of cryoprotective media is relevant even today [1, 6, 10].

The aim of this research was to study low-temperature phase transitions in sucrose-containing solutions of cryoprotectants: glycerol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, ethylene glycol, and dimethyl sulfoxide.

Cryoprotective media contained 30% (v/v) cryoprotectant and 0.7 M sucrose. The solutions were prepared in Dulbecco's phosphate-buffered saline. Phase transitions in cryoprotectant solutions were studied by differential scanning calorimetry (DSC) at the heating stage of cooled samples at a rate of 0.5 deg/min [8].

The obtained results were statistically processed using the Statgraphics Plus 2.1 software (Manugistic, USA),  $n = 6$ .

During the slow heating of sucrose-containing solutions of the cryoprotectants from  $-196^{\circ}\text{C}$ , a transi-

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

**\*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: esmolyaninova@ukr.net

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

**\*To whom correspondence should be addressed:**

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

Надійшла 03.10.2022

Прийнята до друку 27.02.2023

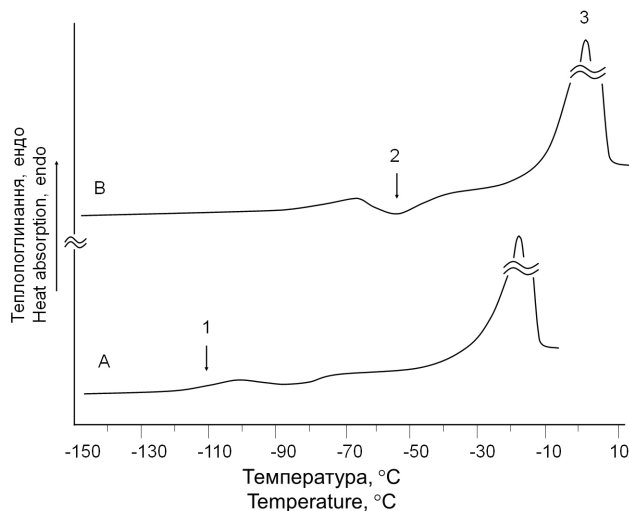
Received 03, October, 2022

Accepted 27, February, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023  
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

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.

Протягом повільного нагрівання сахарозо-вмісних розчинів кріопротекторів від  $-196^{\circ}\text{C}$  на ДСК-термограмах було зареєстровано перехід з твердоаморфного стану у стан переохолодженої рідини (розклування), який триває у певному діапазоні температур (рис. 1А, В; перехід 1). Тем-



**Рис. 1.** ДСК-термограми розчинів кріопротекторів: 30% ДМСО з 0,7 М сахарози на фізіологічному середовищі Дюльбекко (А), 30% гліцерину з 0,7 М сахарози на фізіологічному середовищі Дюльбекко (В).

**Fig. 1.** DSC thermograms of cryoprotectant solutions: 30% DMSO with 0.7 M sucrose in Dulbecco's phosphate-buffered saline (A), 30% glycerol with 0.7 M sucrose in Dulbecco's phosphate-buffered saline (B).

пературу склування визначали за точкою перегину на кривій (таблиця). Стрибок теплопоглинання під час розклування всіх вказаних кріопротекторів відрізнявся (рис. 2). Він був значуще вищий

than from a solid amorphous state to a supercooled liquid state (devitrification) was recorded with DSC thermograms, which lasted within a certain temperature range (Fig. 1A, B; transition 1). The glass transition temperature was determined by the inflection point on the curve (Table). The jump in heat absorption during devitrification of all specified cryoprotectants differed (Fig. 2). It was significantly higher for the sucrose-containing EG solution, that indicated the formation of a significant amount of glassy phase during cooling.

With a further increase in temperature, crystallization was observed in all investigated solutions immediately after completion of vitrification (see Fig. 1, transition 2). The supercooled liquid that appears after the glass transition is unstable at low temperatures, which, in turn, leads to the initiation of crystallization. This indicates the low stability of the amorphous state of cryoprotectant solutions. Obviously, to avoid crystallization of the investigated solutions, it is necessary to use a higher thawing rate. At the appropriate temperature, characteristic for each solution, the melting of ice begins (see Fig. 1, transition 3).

Temperatures of phase transitions in studied solutions differ noticeably (Fig. 1, Table). The lowest glass transition, crystallization, and melting temperatures were recorded in sucrose-containing DMSO and EG solutions (Table). Aqueous solutions of these cryoprotectants without sucrose have a lower glass transition temperature [8], *i. e.* sucrose at a concentration of 0.7 M increases the glass transition temperature of cryoprotectants.

It was previously established that the crystallization and melting of eutectic compounds were

Температури фазових переходів і склування у 30%-х розчинах кріопротекторів з додаванням 0,7 М сахарози  
Temperatures of phase transitions and glass transitions in 30% solutions of cryoprotectants  
with addition of 0.7 M sucrose

Розчини Solutions	T <sub>g</sub> , °C	T <sub>c</sub> , °C	T <sub>m</sub> , °C
ДМСО DMSO	$-108,2 \pm 0,5$	$-85,3 \pm 0,5$	$-34,6 \pm 0,5$
ЕГ EG	$-109,1 \pm 0,5$	$-86,9 \pm 0,5$	$-25,8 \pm 0,5$
Гліцерин Glycerol	$-76 \pm 0,5$	$-54 \pm 0,5$	$-11,7 \pm 0,5$
1,2-ПД 1,2-PD	$-72,2 \pm 0,5$	$-51,6 \pm 0,5$	$-13,9 \pm 0,5$
1,3-ПД 1,3-PD	$-83 \pm 0,5$	$-62,1 \pm 0,5$	$-15,1 \pm 0,5$

**Примітка:** T<sub>g</sub> — температура склування; T<sub>c</sub> — температура кристалізації; T<sub>m</sub> — температура плавлення.

**Note:** T<sub>g</sub> – glass transition temperature; T<sub>c</sub> – crystallization temperature, T<sub>m</sub> – melting temperature.

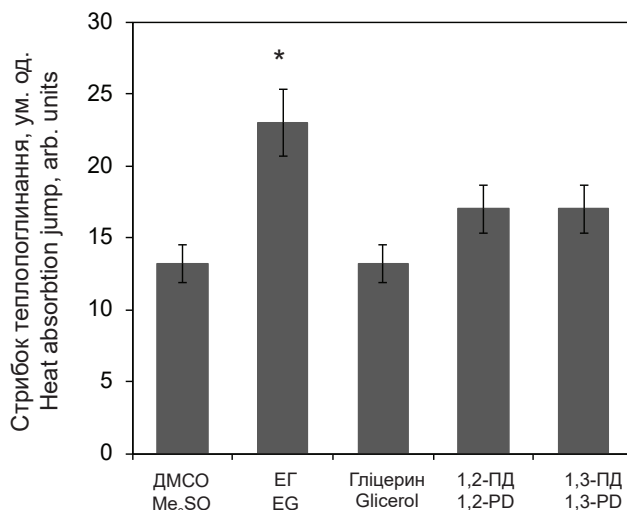
для сахарозовмісного розчину ЕГ, що свідчить про формування значної кількості склоподібної фази при охолодженні.

За умов подальшого підвищення температури одразу після завершення розклування спостерігалася кристалізація у всіх досліджуваних розчинах (див. рис. 1, перехід 2). Переохолодження рідина, яка з'являється після розклування, є нестабільною за низьких температур, що призводить до початку кристалізації. Це свідчить про низьку стабільність аморфного стану розчинів кріопротекторів. Вочевидь, для уникнення кристалізації досліджуваних розчинів необхідно використовувати більш високі швидкості відігріву. При відповідній для кожного розчину температурі починається плавлення льоду (див. рис. 1, перехід 3).

Температури фазових переходів у розчинах різних кріопротекторів помітно відрізняються (див. рис. 1, таблиця). Найнижчі температури склування, кристалізації та плавлення зареєстровано у сахарозовмісних розчинах ДМСО та ЕГ (таблиця). Водні розчини даних кріопротекторів без сахарози мають більш низьку температуру склування [1], тобто сахароза у концентрації 0,7 М підвищує температуру склування кріопротекторів.

Раніше було встановлено, що для водних розчинів ДМСО та ЕГ характерними є кристалізація та плавлення евтектичних складів [1]. У даному дослідженні показано, що завдяки додаванню сахарози у жодному з розчинів кріопротекторів кристалізація евтектики не реєструвалася. Імовірно, що сахароза ефективно зв'язує воду, підвищує в'язкість розчину та перешкоджає формуванню кристалів евтектичного складу. Так, дослідження G. Yu та співавт. [8] розчинів сахарози методом низькотемпературної Раманівської спектроскопії виявило посилення водневих зв'язків сахароза-вода та сахароза-сахароза при  $-50^{\circ}\text{C}$ . Також у роботі A. Sikora та співавт. [6] із застосуванням методів класичної та температуромодульованої ДСК було показано складний фазовий стан розчинів сахарози при низьких температурах.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що усі досліджені розчини кріопротекторів успішно вітрифікуються, але мають низьку стабільність аморфного стану і потребують високих швидкостей відігріву для запобігання кристалізації на етапі нагріву. Додавання сахарози в кріозахисні розчини призводить до значних змін у розвитку фазових переходів, зокрема підвищення температури склування.



**Рис. 2.** Стрибок теплопоглинання під час розклування сахарозовмісних розчинів кріопротекторів: \* — відмінності значущі відносно інших розчинів ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

**Fig. 2.** A jump in heat absorption during vitrification of sucrose-containing solutions of cryoprotectants: \* – the differences are significant compared to other solutions ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

characteristic of aqueous solutions of DMSO and EG [8]. In this study, it was shown that due to the addition of sucrose, no eutectic crystallization was found in any of the cryoprotectant solutions. It is likely that sucrose effectively binds water, increases the viscosity of the solution and prevents the formation of eutectic crystals. Thus, the research of G. Yu *et al.* [7] of sucrose solutions using low-temperature Raman spectroscopy revealed the strengthening of sucrose-water and sucrose-sucrose hydrogen bonds at  $-50^{\circ}\text{C}$ . Also in the report of A. Sikora *et al.* [4] using classical and temperature-modulated DSC methods, the complex phase state of sucrose solutions at low temperatures was shown.

Thus, the obtained data indicate that all investigated solutions of cryoprotectants are successfully vitrified, but have low stability of the amorphous state and require high heating rates to prevent crystallization during the heating stage. The sucrose supplement to cryoprotectant solutions leads to significant changes in the development of phase transitions, in particular, an increase in the glass transition temperature.

## References

1. Bhattacharya S. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. In: Bozkurt Y, editor. Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences [Internet].

## Література

1. 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.
2. Смольянинова ЕИ, Пешко ОВ, Лисина ЕГ, и др. Анализ влияния различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши. Проблемы криобиологии. 2007; 17(4): 385–93.
3. Bhattacharya S. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. In: Bozkurt Y, editor. Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences [Internet]. IntechOpen; 2018 Nov 05; [cited Jan 24 2022]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/64165>
4. Farshad A, Akhondzadeh S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2008; 21(12): 1721–7.
5. Herdis, Surachman M, Darmawan IWA, Afifah. The role of sucrose as extracellular cryoprotectant in maintaining the Garut rams' frozen semen quality. AIP Conference Proceedings 2120. [Internet]. 2019 July 03; [cited Jan 15 2022]; 080019. Available from: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5115757>
6. Sikora A, Dupanov VO, Kratochvíl J, Zámečník J. Transitions in aqueous solutions of sucrose at subzero temperatures. Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics. 2007; 46: 71–85.
7. Thananurak P, Chuaychu-noo N, Thélie A, et al. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose. Poult. Sci. 2019; 98(9): 4161–71.
8. Yu G, Li R, Hubel A. Interfacial interactions of sucrose during cryopreservation detected by Raman spectroscopy. Langmuir. 2019; 35(23): 7388–95.
- IntechOpen; 2018 Nov 05; [cited Jan 24 2022]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/64165>
2. Farshad A, Akhondzadeh S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2008; 21(12): 1721–7.
3. Herdis, Surachman M, Darmawan IWA, Afifah. The role of sucrose as extracellular cryoprotectant in maintaining the Garut rams' frozen semen quality. AIP Conference Proceedings 2120. [Internet]. 2019 July 03; [cited Jan 15 2022]; 080019. Available from: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5115757>
4. Sikora A, Dupanov VO, Kratochvíl J, Zámečník J. Transitions in aqueous solutions of sucrose at subzero temperatures. Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics. 2007; 46: 71–85.
5. Smolyaninova Yel, Pishko OV, Lisina EG, et al. Analysis of effect of different steps of vitrification protocol for cryopreservation in ethylene glycol-sucrose medium on 2-cell murine embryo survival. Problems of Cryobiology. 2007; 17(4): 385–93.
6. Thananurak P, Chuaychu-noo N, Thélie A, et al. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose. Poult. Sci. 2019; 98(9): 4161–71.
7. Yu G, Li R, Hubel A. Interfacial interactions of sucrose during cryopreservation detected by Raman spectroscopy. Langmuir. 2019; 35(23): 7388–95.
8. Zinchenko 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.

