

УДК 547.569.2:532.78:539.213

А.И. Осецкий, С.С. Севастьянов\*

## Влияние водородных связей на кинетику кристаллизации водных растворов криопротекторных веществ

UDC 547.569.2:532.78:539.213

A.I. Osetsky, S.S. Sevastyanov\*

## Effect of Hydrogen Bonds on Crystallization Kinetics of Aqueous Solutions of Cryoprotective Agents

**Реферат:** В работе изучены температурные зависимости объема водных растворов ДМСО и глицерина разных концентраций в процессе их охлаждения до  $-150^{\circ}\text{C}$  и последующего отогрева до  $25^{\circ}\text{C}$ . Показано, что в диапазоне весовых концентраций криопротекторных веществ 30–70% данные зависимости существенно отличаются на этапах охлаждения и последующего отогрева. Установлено, что в исследуемом интервале концентраций происходит резкое увеличение объема растворов глицерина при их нагреве выше температуры стеклования и, наоборот, резкое уменьшение объема отогреваемых растворов ДМСО. Отмечено, что наблюдаемые объемные эффекты хорошо укладываются в рамки представлений о кластерной кристаллизации криопротекторных растворов, учитывающих слабое НВ-взаимодействие между компонентами. На основе полученных результатов проведен анализ структуры образующихся кластерных частиц. Показано, что поверхностные слои из молекул криопротекторного вещества, окружающие микрокристаллы льда, могут иметь как кристаллическую, так и аморфную структуру. Рассмотрено влияние этих различий на защитные свойства криопротекторов.

**Ключевые слова:** криопротекторный раствор, кластерная кристаллизация, кластерная частица, диаграмма состояний, стеклование, структура, водородные связи.

**Реферат:** У роботі вивчено залежності об'єму водних розчинів ДМСО та гліцерину різних концентрацій у процесі їх охолодження до  $-150^{\circ}\text{C}$  і подальшого відігрівання до  $25^{\circ}\text{C}$ . Показано, що в діапазоні вагових концентрацій криопротекторних речовин 30–70% вказані залежності істотно відрізняються на етапах охолодження і подальшого відігрівання. Встановлено, що в досліджуваному інтервалі концентрацій відбувається різке збільшення об'єму розчинів гліцерину при їх нагріванні вище температури склування і, навпаки, різке зменшення об'єму розчинів ДМСО. Відзначено, що ці об'ємні ефекти добре вкладаються в рамки уявлень про кластерну кристалізацію криопротекторних розчинів, які враховують слабку НВ-взаємодію між компонентами. На основі отриманих результатів проведено аналіз структури кластерних часток, які утворюються. Показано, що поверхневі шари з молекул криопротекторної речовини, які оточують мікрокристали льоду, можуть мати як кристалічну, так й аморфну структуру. Розглянуто вплив цих відмінностей на захисні властивості криопротекторів.

**Ключові слова:** криопротекторний розчин, кластерна кристалізація, кластерна частка, діаграма станів, склування, структура, водневі зв'язки.

**Abstract:** The temperature dependences of volume for aqueous solutions of DMSO and glycerol under various concentrations during their cooling down to  $-150^{\circ}\text{C}$  and subsequent heating up to  $25^{\circ}\text{C}$  were studied in details in this paper. It was shown that within the range of 30–70% weight concentrations of cryoprotective substances these dependences differed greatly at cooling stages and during subsequent thawing. It has been also found that within the studied concentration range there was a sharp increase in volume for glycerol solutions when heated above the glass transition temperature, and *vice versa*, a sharp reduction in DMSO solution volume. It has been noted that the observed volume effects fit well within the concept of cluster crystallization of cryoprotective solutions, taking into account a weak HB-interaction between the components. On the basis of the findings the structure of the formed cluster particles was analyzed. It has been shown that the surface layers from the molecules of cryoprotective agent surrounding ice microcrystals can be of either crystalline or amorphous structure. The effect of these differences on protective properties of cryoprotectants was examined.

**Key words:** cryoprotective solution, cluster crystallization, cluster particle, diagram of states, glass structure, hydrogen bonds.

Способность криопротекторных веществ связывать с помощью водородных связей (НВ-связей) молекулы воды лежит в основе их криозащитных свойств. При этом для большинства используемых в практической криобиологии растворов криопротекторов значения энергии НВ-связей находятся в пределах 3–7 ккал/моль [8], т. е. среднее значение энергии связывания  $\langle \epsilon_H \rangle$  относительно невелико

Ability of cryoprotective agents (CPA) to bind the water molecules by means of hydrogen bonds (HB-bonds) underlies their cryoprotective properties. Moreover, for most widely applied cryoprotectant solutions the energy values of HB-bonds are within 7.3 kcal/mol [1], *i. e.* an average value of the binding energy  $\langle \epsilon_H \rangle$  is relatively small ( $2.5 \times 10^3$  K). The effect of HB-bonds on the structure of a solution at room temperature could

Отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,  
электронная почта: stas\_sevastianov@i.ua

Поступила 11.05.2016  
Принята в печать 30.06.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 199–212.  
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: stas\_sevastianov@i.ua

Received May, 11, 2016  
Accepted June, 30, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 199–212.  
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

## Основные обозначения

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| $T$                             | Температура  |
| $\dot{T}$                       | Скорость изменения температуры   |
| $\dot{T}^-$                     | Скорость охлаждения  |
| $\dot{T}^+$                     | Скорость нагрева   |
| $T_0$                           | Начальная температура охлаждаемого раствора                                      |
| $T_m$                           | Температура плавления чистого компонента $A$ или $B$                             |
| $T_S$                           | Температура кристаллизации чистого компонента $A$ или $B$                        |
| $T^c$                           | Температура кристаллизации раствора  |
| $T_g^c$                         | Температура стеклования (расстеклования) высококонцентрированных жидких фракций  |
| $T_L^-$                         | Температурные параметры линии ликвидуса при охлаждении раствора                  |
| $T_L^+$                         | Температурные параметры линии ликвидуса при нагреве замороженного раствора       |
| $T^{eut}$                       | Температура эвтектики  |
| $T_C^{ent}$                     | Температура начала кластерной кристаллизации при охлаждении раствора             |
| $T_C^+$                         | Температура окончания плавления кластеров при нагреве замороженного раствора     |
| $C_B$                           | Весовая концентрация криопротекторного вещества $B$                              |
| $C_0^c, C_C^c$                  | Концентрационные параметры диаграмм состояния                                    |
| $C_0^g, C_1^c$                  |  |
| $A_S$                           | Кристаллы льда   |
| $a_S$                           | Нанокристаллы льда   |
| $b_S$                           | Нанокристаллы вещества $B$ в оболочке кластера                                   |
| $b_S^g$                         | Аморфная фракция вещества $B$ в оболочке кластера                                |
| $B_S^g$                         | Кристаллы криопротекторного вещества $B$   |
| $L$                             | Жидкая фаза  |
| $\beta_C$                       | Кластерная фаза  |
| $m_\beta$                       | Масса образующейся кластерной фазы   |
| $G$                             | Твердая аморфная фракция   |
| $\Delta C_B$                    | Изменение концентрации жидкой фазы при кластерной кристаллизации                 |
| $\Delta C_A$                    | Изменение концентрации жидкой фазы при образовании кристаллов льда               |
| $V_0$                           | Начальный объем изучаемого раствора  |
| $\Delta V_{ac}$                 | Изменение объема системы при кластерной кристаллизации                           |
| $\Delta V_A$                    | Изменение объема системы при образовании кристаллов льда                         |
| $\Delta V_{bc}$                 | Изменение объема системы при образовании или плавлении кластерных оболочек       |
| $\Delta Q_{A^*}$                | Тепловые эффекты, сопровождающие образование кристаллов льда и кластерных частиц |
| $\Delta Q_{ac}$                 |  |
| $\langle \varepsilon_H \rangle$ | Средняя энергия водородных связей $A-B$ в комплексе $A_n B_m$                    |
| $\nu$                           | Частота тепловых колебаний молекул в комплексе $A-B$                             |
| $k$                             | Постоянная Больцмана   |
| $\varphi$                       | Стерический фактор   |
| $\omega$                        | Частота разрыва $HB$ -связей   |
| $\beta$                         | Коэффициент теплового объемного расширения раствора                              |

## Main legends

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| $T$                             | Temperature   |
| $\dot{T}$                       | Temperature change rate   |
| $\dot{T}^-$                     | Cooling rate  |
| $\dot{T}^+$                     | Heating rate  |
| $T_0$                           | Initial temperature of solution to be cooled  |
| $T_m$                           | Melting temperature of pure component either $A$ or $B$                             |
| $T_S$                           | Crystallization temperature of pure component either $A$ or $B$                     |
| $T^c$                           | Crystallization temperature of solution   |
| $T_g^c$                         | Vitrification (devitrification) temperature of highly concentrated liquid fractions |
| $T_L^-$                         | Temperature parameters of liquidus line when cooling solution                       |
| $T_L^+$                         | Temperature parameters of liquidus line when heating frozen solution                |
| $T^{eut}$                       | Eutectics temperature   |
| $T_C^{ent}$                     | Temperature of cluster crystallization onset when cooling the solution              |
| $T_C^+$                         | Temperature of ceasing the melting of clusters when heating                         |
| $C_B$                           | Mass concentration of cryoprotective substance $B$                                  |
| $C_0^c, C_C^c$                  | Concentration parameters of diagram of states                                       |
| $C_0^g, C_1^c$                  |   |
| $A_S$                           | Ice crystals  |
| $a_S$                           | Ice nanocrystals  |
| $b_S$                           | Nanocrystals of substance $B$ in cluster covers                                     |
| $b_S^g$                         | Amorphous fraction of substance in cluster covers                                   |
| $B_S^g$                         | Crystals of cryoprotective substances $B$   |
| $L$                             | Liquid phase  |
| $\beta_C$                       | Cluster phase   |
| $m_\beta$                       | Mass of forming cluster phase   |
| $G$                             | Solid amorphous fraction  |
| $\Delta C_B$                    | Change of liquid phase concentration during cluster crystallization                 |
| $\Delta C_A$                    | Change of liquid phase concentration during ice crystal formation                   |
| $V_0$                           | Initial volume of the studied solution  |
| $\Delta V_{ac}$                 | Change of system volume during cluster crystallization                              |
| $\Delta V_A$                    | Change of system volume during ice crystal formation                                |
| $\Delta V_{bc}$                 | Change of system volume during formation or melting of cluster membranes            |
| $\Delta Q_{A^*}$                | Heating effect accompanying formation of ice crystals and cluster particles         |
| $\Delta Q_{ac}$                 |   |
| $\langle \varepsilon_H \rangle$ | Average energy of hydrogen $A-B$ bonds in associate $A_n B_m$                       |
| $\nu$                           | Frequency of thermal vibrations of molecules in $A-B$ associate                     |
| $k$                             | Boltzmann constant  |
| $\varphi$                       | Steric factor   |
| $\omega$                        | Frequency of $HB$ bonds breakage  |
| $\beta$                         | Coefficient of heat volume extension of the solution                                |

( $2,5 \times 10^3$  K), в результате влияние  $HB$ -связей на структуру раствора при комнатной температуре незначительно. Это следует из оценки частоты разрыва этих связей в  $A_n B_m$ -комплексах, где  $n$  и  $m$  – количество молекул воды  $A$  и криопротекторного вещества  $B$  соответственно.

Согласно уравнению Аррениуса [5, 6]:

$$w = \nu \cdot \varphi \cdot \exp\left(-\frac{\langle \varepsilon_H \rangle}{k \cdot T}\right), \quad (1)$$

где  $\nu$  – частота тепловых колебаний молекул в  $AB$ -комплексе;  $\varphi$  – стерический фактор;  $T$  – температура;  $k$  – постоянная Больцмана ( $k = 1,38 \times 10^{-16}$  эрг/град).

be considered as negligible. This follows from the estimated frequency of breaking these bonds in  $A_n B_m$  associates, where  $n$  and  $m$  are the quantities of water molecules  $A$  and cryoprotective substance  $B$ , respectively.

According to Arrhenius equation [9, 10]:

$$w = \nu \cdot \varphi \cdot \exp\left(-\frac{\langle \varepsilon_H \rangle}{k \cdot T}\right), \quad (1)$$

where  $\nu$  is frequency of thermal vibrations of molecules in  $AB$  associates;  $\varphi$  – steric factor;  $T$  – temperature;  $k$  – Boltzmann constant ( $k = 1.38 \times 10^{-16}$  erg/deg).

The equation (1) demonstrates that at room temperatures  $w \approx 10^6$  s<sup>-1</sup>, i. e. the most time the water



Из уравнения (1) следует, что при комнатных температурах  $w \approx 10^6 \text{ с}^{-1}$ , т. е. большую часть времени молекулы воды и криопротекторного вещества в растворе находятся в свободном состоянии. Поэтому процессы кристаллизации криопротекторных растворов пытаются трактовать в рамках классических диаграмм состояния, в которых НВ-связи не учитываются [11, 14, 20, 21].

С понижением температуры ситуация кардинально изменяется. Так, уже при  $T < -50 \dots -70^\circ\text{C}$  величина  $\omega$  уменьшается до значений порядка  $10 \text{ с}^{-1}$  и ниже, т. е. стабильность АВ-комплексов резко повышается, что подтверждается результатами экспериментов по инфракрасной спектроскопии [16] и дифракции медленных нейтронов [19, 22–24]. Это практически исключает образование в охлаждаемом растворе отдельных кристаллов льда и криопротекторного вещества ниже определенной температуры  $T_c$ . Как следствие, стабильные АВ-комплексы переходят в твердофазное состояние в виде аморфной фракции [10–13, 21] или гидратной фазы  $\beta_c$  [1, 17, 25], что противоречит закономерностям эвтектической кристаллизации.

Для объяснения противоречий между теоретическими и экспериментальными данными была предложена модель кластерной кристаллизации [2, 17, 18] и сформулированы принципы построения диаграмм состояния, включающих области существования кластерной фазы  $\beta_c$  [2]. Однако на сегодняшний день отсутствует четкое экспериментальное подтверждение реализации этой модели в наиболее востребованных криопротекторных растворах. Во многом это обусловлено тем, что в практической криобиологии сохранность биообъектов связывается с кинетикой кристаллизации растворов при  $T > T_c$  и большинство работ посвящено изучению именно этого интервала температур. В то же время протекающая при  $T < T_c$  кластерная кристаллизация, обусловленная НВ-связями между молекулами воды и криопротекторного вещества, может оказывать существенное влияние на качество консервируемого биоматериала.

В связи с этим целью данной работы было изучение кристаллизации-плавления растворов со слабым межмолекулярным взаимодействием компонентов с помощью специально разработанного метода дифференциальной объемной сканирующей тензодилатометрии.

### Материалы и методы

Экспериментальное изучение закономерностей образования кластерной  $\beta_c$ -фазы при охлаждении-отогреве водных растворов криопротекторных веществ проводилось с помощью дифференциального микроробъемного сканирующего тензодила-

молекулы и криопротекторные вещества свободны в растворе, и из-за этого факта кристаллизация криопротекторных растворов обычно интерпретируется с помощью традиционных диаграмм состояния, где НВ-связи не рассматриваются [2, 6, 19, 20].

С понижением температуры ситуация меняется драматически. В частности, даже при  $T < -50 \dots -70^\circ\text{C}$  значение  $\omega$  снижается до значений порядка  $10 \text{ с}^{-1}$  и ниже, т. е. стабильность АВ-ассоциатов резко повышается, что подтверждается результатами инфракрасной спектроскопии [11] и дифракции медленных нейтронов [18, 21–23]. Это исключает практически образование отдельных кристаллов льда и криопротекторных веществ в охлажденном растворе ниже определенной температуры  $T_c$ . В результате, стабильные АВ-ассоциаты переходят в твердофазное состояние либо в виде аморфной фракции [1–4, 19, 20] или гидратной фазы  $\beta_c$  [12, 24, 25], что противоречит закономерностям эвтектической кристаллизации.

Для объяснения противоречий между теоретическими и экспериментальными данными была предложена модель кластерной кристаллизации [12–14] и сформулированы принципы построения диаграмм состояния, включающих области существования кластерной фазы  $\beta_c$  [14]. Однако, на сегодняшний день отсутствует четкое экспериментальное подтверждение реализации этой модели в наиболее востребованных криопротекторных растворах. Во многом это обусловлено тем, что в практической криобиологии сохранность биообъектов связывается с кинетикой кристаллизации растворов при  $T > T_c$  и большинство работ посвящено изучению именно этого интервала температур. В то же время протекающая при  $T < T_c$  кластерная кристаллизация, обусловленная НВ-связями между молекулами воды и криопротекторного вещества, может оказывать существенное влияние на качество консервируемого биоматериала.

В связи с этим целью данной работы было изучение кристаллизации-плавления растворов со слабым межмолекулярным взаимодействием компонентов с помощью специально разработанного метода дифференциальной объемной сканирующей тензодилатометрии.

### Materials and methods

The regularities of forming the cluster  $\beta_c$  phase during cooling-warming of aqueous solutions of cryoprotective agents were experimentally studied using a differential microvolume scanning tensodilatometer, the concept of which was previously described in details [12]. The device main part consists of a differentially mounted main and reference measuring units containing the combined bellows inserts transforming the volume changes of the tested solutions into linear transitions of drawing power.

This device is useful when studying quite a large amount of solution ( $V_0 > 2 \text{ cm}^3$ ), cooled or thawed at a relatively low rate ( $\dot{T} \leq 10 \text{ deg/min}$ ).



тометра, принципиальная схема которого подробно описана ранее [17]. Главная часть этого устройства состоит из смонтированных дифференциально основной и эталонной измерительных ячеек, содержащих комбинированные сильфонные вставки, которые трансформируют объемные изменения исследуемых растворов в линейные перемещения силовых тяг.

Данную схему прибора удобно использовать при изучении достаточно больших количеств раствора ( $V_0 > 2 \text{ см}^3$ ), охлаждаемого или нагреваемого с относительно небольшими скоростями ( $\dot{T} \leq 10 \text{ град/мин}$ ).

Для изучения кинетики кристаллизации растворов с начальным объемом  $V_0 < 1 \text{ см}^3$  или с небольшими концентрациями криопротекторных веществ ( $C_B < 10\%$ ) используется микрообъемный вариант сканирующего тензодилатометра. Он также содержит дифференциально смонтированные основную и эталонную измерительные ячейки, однако эти ячейки имеют более сложную конструкцию [4, 9].

Эксперименты проводили на водных растворах глицерина, подвергнутого двойной перегонке в вакууме, и ДМСО (Корпорация «Артериум», Украина). Растворы готовили на основе бидистиллированной воды с выдержкой не менее 20 ч при температуре  $40^\circ\text{C}$  и многократном перемешивании. Заправка исследуемых растворов проводилась с помощью специальной вакуумной приставки, обеспечивающей обезгаживание растворов и ячеек перед экспериментом.

Используемый диапазон весовых концентраций криопротекторного вещества находился в пределах от 5 до 100%. Масса исследуемого раствора определялась с точностью  $\pm 10^{-3} \text{ г}$ .

Зависимости объема криопротекторных растворов от температуры в режиме ее сканирования в интервале  $25 \dots -150^\circ\text{C}$  исследовали при одинаковых скоростях охлаждения и последующего отогрева, равных  $1 \text{ град/мин}$ . При этом для учета влияния на вид тензодилатогрaмм градиента температур в измерительных ячейках эксперименты проводили на ячейках двух видов: с  $V_0 = 10 \text{ см}^3$  и  $V_0 = 1 \text{ см}^3$ . Затем выполняли сравнительный анализ полученных результатов.

### Результаты и обсуждение

Основная идея применения метода объемной сканирующей тензодилатометрии к изучению явления кластерной кристаллизации водных растворов, обусловленной НВ-взаимодействием компонентов, состоит в наличии разных объемных эффектов при кристаллизации воды и криопротекторных веществ. Известно, что при фазовом переходе «вода-лед» объем данной системы увеличивается на  $8,2\%$ . В то же время кристаллизация

To study the crystallization kinetics of solutions with an initial volume of  $V_0 < 1 \text{ cm}^3$  or with low concentrations of cryoprotective agents ( $C_B < 10\%$ ) there was used a microvolume option of scanning tensodilatometer. It also comprises the differentially mounted measuring basic and reference units but with more complicated structure [15, 17].

Experiments were performed in aqueous solutions of glycerol, double distilled under vacuum, and DMSO (Arterium, Ukraine). The solutions were prepared on the base of a bidistilled water with a delay for at least 20 hrs at  $40^\circ\text{C}$  and multiple mixing. The tested solutions were loaded with a special vacuum adjustment, providing outgassing of the fluids and units prior to the experiment.

The used weight concentrations for cryoprotective agent was within the range from 5 to 100%. The mass of the tested solution was determined with  $\pm 10^{-3} \text{ g}$  accuracy.

Dependences of the volume of cryoprotective solutions vs. temperature within the range of  $25 \dots -150^\circ\text{C}$  were investigated under the same rates of cooling and subsequent warming, *i. e.*  $1 \text{ deg/min}$ . Herewith, the estimation of the effect of temperature gradient in measuring units on the appearance of tensodilatograms was performed in two types of units: with  $V_0 = 10 \text{ cm}^3$  and  $V_0 = 1 \text{ cm}^3$ . Then the results were comparatively analyzed.

### Results and discussion

The basic idea of applying the method of volume scanning tensodilatometry when studying the phenomenon of cluster crystallization of aqueous solutions resulting from НВ-interactions of the components consists in the presence of different volume effects during crystallization of water and cryoprotective substances. It is known that during the water-ice phase transition the volume of the system is increased by  $8.2\%$ . At the same time the crystallization of most cryoprotective substances occurs with a decrease in the volume of the system within the range from 2 to 5% depending on the type of substance. In case if a cryoprotective agent does not crystallize under the experimental conditions and transits into an amorphous state, its volume reduces also by  $0.1-0.3\%$ . These facts could provide an information about the structure of the formed cluster phase particles, which essentially depends on the type of АВ associates, appearing in a cooled aqueous solution due to hydrogen bonds.

Typical tensodilatograms  $V = V(T)$ , reflecting the volume changes in the investigated aqueous solutions of various weight concentrations of DMSO or glycerol during their cooling and subsequent thawing within a temperature range of  $20 \dots -150^\circ\text{C}$  with the rates of  $\dot{T}^- = \dot{T}^+ = 1 \text{ deg/min}$  are shown in Figs. 1 and 2.



большинства криопротекторных веществ происходит с уменьшением объема системы в диапазоне от 2 до 5% в зависимости от вида вещества. В том случае, если криопротекторное вещество в условиях эксперимента не кристаллизуется, а переходит в аморфное состояние, его объем также уменьшается в пределах 0,1–0,3%. Эти факты способны дать информацию о структуре образующихся частиц кластерной фазы, которая существенным образом зависит от вида АВ-комплексов, возникающих в охлаждаемом водном растворе за счет водородных связей.

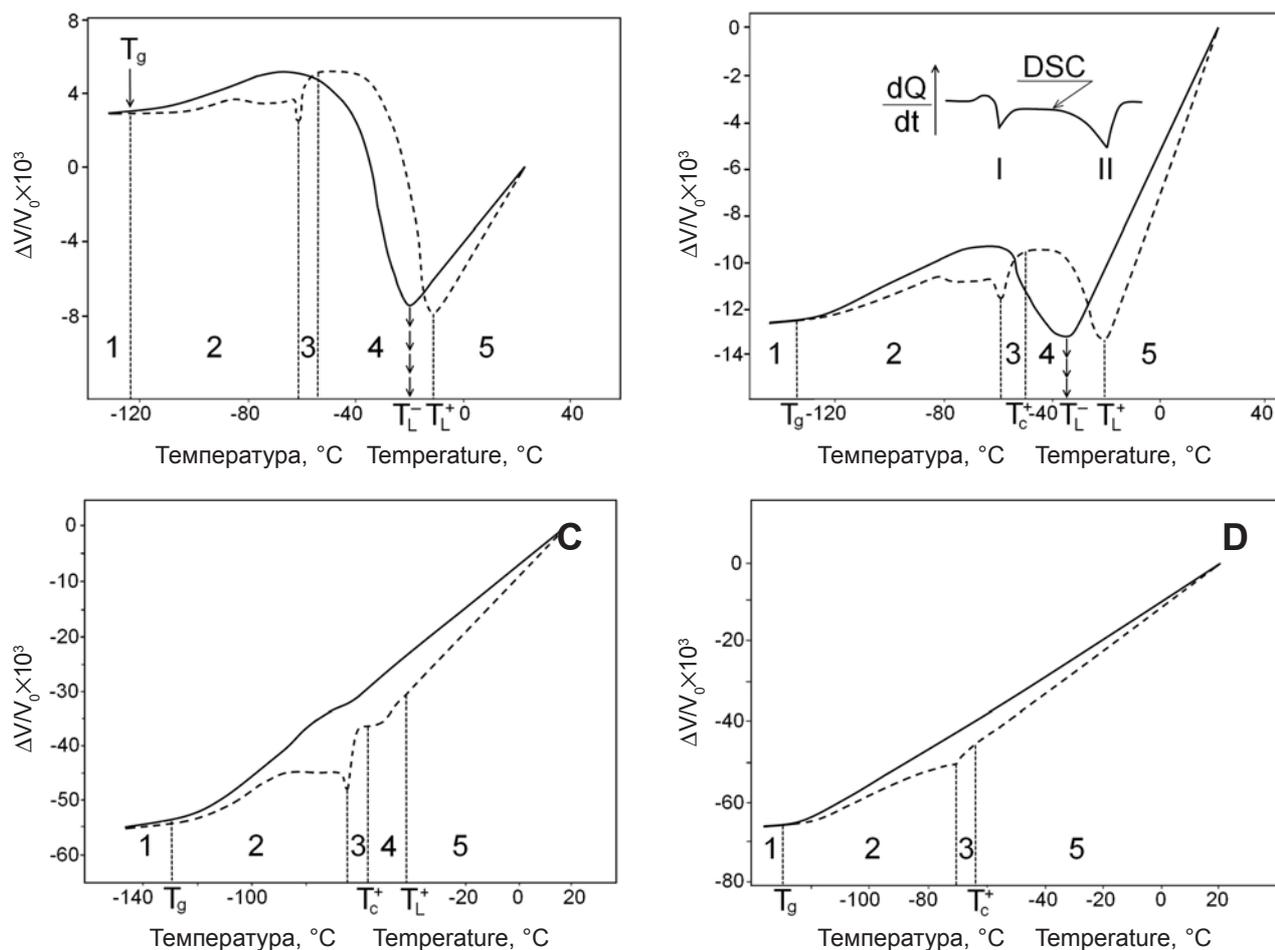
Типичные тензодилатограммы  $V = V(T)$ , отражающие изменение объема исследуемых водных растворов с разной весовой концентрацией ДМСО или глицерина в процессе их охлаждения и последующего отогрева в интервале температур 20...–150°C со скоростями  $\dot{T}^- = \dot{T}^+ = 1$  град/мин, приведены на рис. 1 и 2.

Представленный диапазон концентраций криопротекторных веществ  $C_B = 30–70\%$  является

The presented concentration range of cryoprotective substances  $C_B = 30–70\%$  is the most interesting when studying the kinetics of crystallization and melting of the cluster phase  $\beta_c$  [13, 14]. These particular concentrations are characteristic for liquid microphases forming in the solutions with typical for practical cryobiology initial concentrations of  $C_B = 5–15\%$  to the moment they reach the temperature interval of the cluster crystallization  $T_c \dots T_g$  [2–4, 6, 12, 19, 20, 24, 25].

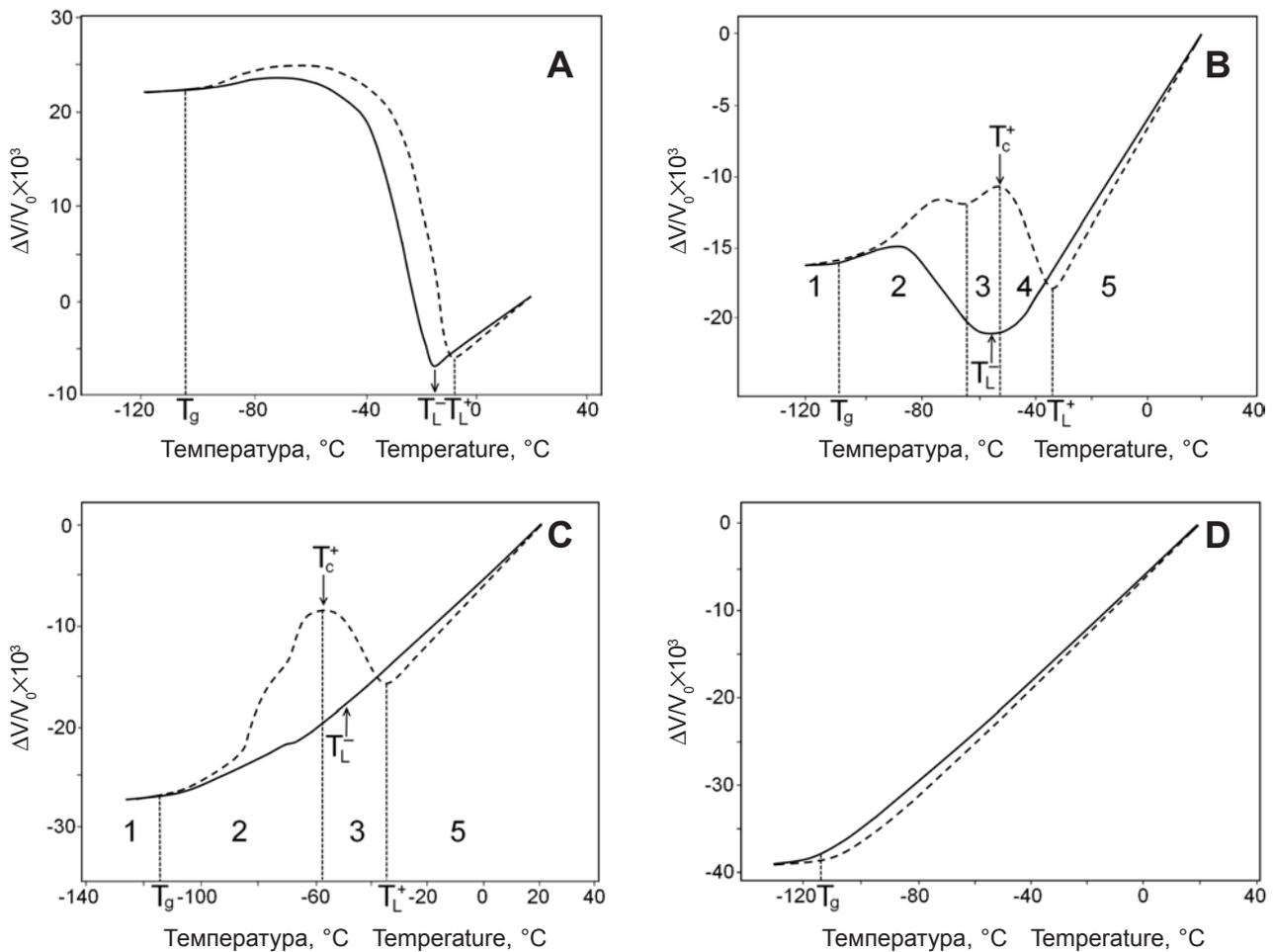
The analysis of curves  $V = V(T)$  showed a significant dependence of the shape of the obtained tensodilatograms vs. the initial concentration of cryoprotective solution as well as a prominent difference of tensodilatograms obtained during cooling and subsequent warming.

Thus, in tensodilatograms obtained during cooling of the solutions with an initial concentration  $C_B < 60\%$  we have found only the stages of thermal contraction of the solutions within the temperature range of 20°C... $T_L^-$ , as well as the stages of samples' volume increasing at the temperatures below the crystallization



**Рис. 1.** Тензодилатограммы водных растворов с концентрацией ДМСО: **А** – 30%; **В** – 40%; **С** – 55%; **Д** – 65%; охлаждение – сплошная линия, отогрев – пунктирная линия.

**Fig. 1.** Tensodilatograms of aqueous solutions with DMSO concentrations: **A** – 30%; **B** – 40%; **C** – 55%; **D** – 65%; cooling is represented by solid line, dashed line denotes thawing.



**Рис. 2.** Тензодилатограммы водных растворов с концентрацией глицерина: **A** – 30%; **B** – 57%; **C** – 62,5%; **D** – 70%; охлаждение – сплошная линия, отогрев – пунктирная линия.

**Fig. 2.** Tensodilatograms of aqueous solutions with glycerol concentrations: **A** – 30%; **B** – 57%; **C** – 62.5; **D** – 70%; cooling is represented by solid line, dashed line denotes thawing.

наиболее интересным с точки зрения изучения кинетики кристаллизации и плавления кластерной фазы  $\beta_c$  [2, 18]. Именно такие концентрации характерны для жидких микрофаз, образующихся в растворах с типичными для практической криобиологии исходными концентрациями  $C_B = 5-15\%$ , к моменту достижения ими температурного интервала кластерной кристаллизации  $T_c \dots T_g$  [1, 11–14, 17, 20, 21, 25].

Приведенные кривые  $V = V(T)$  свидетельствуют о существенной зависимости вида полученных тензодилатограмм от исходной концентрации криопротекторного раствора и резком различии тензодилатограмм, полученных при охлаждении и последующем нагреве.

Так, на тензодилатограммах, соответствующих охлаждению растворов с исходной концентрацией  $C_B < 60\%$ , фиксируются только стадии теплового сжатия растворов в диапазоне температур  $20^\circ\text{C} \dots T_L^-$ , стадии увеличения объема образцов ниже темпе-

onset point and the stage of a weak dependence of the samples' volume vs. the temperature below the vitrification point  $T_g$ .

Tensodilatograms of the cooled solutions with initial mass concentrations of DMSO higher than 60% and glycerol above 65% are of two-stage character: almost linear decrease in volume as the temperature decreases, characteristic of the thermal fluid compression within the temperature range of  $20^\circ\text{C} \dots T_g$  and approaching the plateau below the vitrification temperature  $T_g$ .

At the same time, the tensodilatograms of the heated solutions within the concentration range of 30–65% for DMSO and 45–65% for glycerol are of pronounced multistage character (Figs. 1 and 2B, C; vertical dashed lines). In particular, when heating from  $-150^\circ\text{C}$  the solution with an initial DMSO concentration of 40% (Fig. 1B) five specific steps have been clearly observed: 1 – corresponded to the slight smooth increase in the system volume characteristic for solid state, when the dependence  $V^+(T)$  obtained upon heating



ратуры начала кристаллизации  $T_L^-$  и стадии слабой зависимости объема образцов от температуры ниже температуры стеклования  $T_g$ .

Тензодилатограммы охлаждаемых растворов с исходными массовыми концентрациями ДМСО выше 60% и глицерина выше 65% имеют двустадийный характер: практически линейное уменьшение объема с понижением температуры, характерное для теплового сжатия жидкости, в интервале температур  $20^\circ\text{C} \dots T_g$  и выход на плато ниже температуры стеклования  $T_g$ .

В то же время тензодилатограммы нагреваемых растворов в диапазоне концентраций 30–65% для ДМСО и 45–65% для глицерина имеют ярко выраженный многостадийный характер (рис. 1 и 2, В, С; вертикальные пунктирные линии). Так, при нагреве от температуры  $-150^\circ\text{C}$  раствора с исходной концентрацией ДМСО 40% (рис. 1, В) отчетливо регистрируются пять характерных стадий: 1 – соответствует характерному для твердофазного состояния плавному незначительному увеличению объема системы, при котором получаемая при нагреве зависимость  $V^+(T)$  полностью совпадает с полученной в этом температурном интервале на этапе предварительного охлаждения зависимостью  $V^-(T)$ ; 2 – соответствует отклонению зависимости  $V^+(T)$  от зависимости  $V^-(T)$  в результате неравномерного уменьшения объема системы; 3 – характеризуется резким увеличением объема системы; 4 – характеризуется уменьшением объема системы в результате плавления образовавшихся в процессе охлаждения кристаллов льда; 5 – соответствует практически линейному увеличению объема системы, характерного для теплового объемного расширения нагреваемой жидкости и описываемого выражением

$$\Delta V = V_L \cdot \beta \cdot \Delta T, \quad (2)$$

где  $\Delta V$  – изменение объема исследуемого раствора при его нагреве на величину  $\Delta T$ ;  $V_L$  – объем раствора при температуре  $T_L^+$ , т. е. в момент окончания плавления кристаллов льда;  $\beta$  – коэффициент теплового объемного расширения раствора в соответствующем интервале температур.

Наблюдаемое на этой стадии незначительное несовпадение зависимостей  $V^+(T)$  и  $V^-(T)$  обусловлено разным распределением температур по объему ячейки тензодилатометра на этапах охлаждения и нагрева.

Аналогичные стадии можно выделить и на тензодилатограммах нагреваемых водных растворов глицерина, однако поведение кривой  $V^+(T)$  на стадиях 2 и 3 (рис. 2) принципиально отличается от ее поведения на этих стадиях в случае водных

coincided with the dependence  $V^-(T)$  obtained within the same temperature range during preliminary cooling; 2 – corresponded to the deviation between dependencies  $V^+(T)$  and  $V^-(T)$  due to uneven reduction of the system volume; 3 – characterized by a sharp increase in the system volume; 4 – characterized by a decrease in the system volume resulted from the melting of the ice crystals formed during cooling; 5 – corresponded to the almost linear increase in the system volume, characteristic of the thermal volume expansion of heated liquid and is described by the expression

$$\Delta V = V_L \cdot \beta \cdot \Delta T, \quad (2)$$

where  $\Delta V$  is the change in volume of the studied solution during its heating by the value  $\Delta T$ ;  $V_L$  – volume of the solution at  $T_L^+$  temperature, *i.e.* at the end of melting of ice crystals;  $\beta$  – coefficient of thermal volumetric expansion of the solution within the corresponding temperature range.

A slight mismatch between the dependencies  $V^+(T)$  and  $V^-(T)$  observed at this stage is caused by different temperature distribution along the tensodilatometer unit during cooling and heating.

Similar stages can be also found in tensodilatograms of the heated aqueous solutions of glycerol, however, the behavior of the curve  $V^+(T)$  at the stages 2 and 3 (Fig. 2) is fundamentally different from its behavior during these stages for DMSO aqueous solutions (Fig. 1). In particular, a deviation between the dependencies  $V^+(T)$  and  $V^-(T)$  is observed at the stage 2, caused by a significant increase in the system volume. This is the reverse to the appearance of  $V^+(T)$  dependence for DMSO solutions and does not correspond to the processes occurred in the tested solutions at the cooling stage as well. In turn, stage 3 is characterized by the curve  $V^+(T)$  approaching to the plateau. In the heated solution this could be possible only if there are developing the processes, which lead to a decrease in the system volume, in such a way compensating a normal thermal expansion.

Comparing the series of tensodilatograms obtained for the solutions of DMSO (Fig. 1) and the ones of glycerol (Fig. 2) clearly showed the dependence of the shape of the dependencies  $V^+(T)$  within a particular stage as well as the total number of stages on the initial concentration of the solution. For example, the tensodilatogram of heated solution with a DMSO concentration  $C_B = 65\%$  had no stage 4 being typical for lower concentrations (see Fig. 1D). It is very prominent in the Fig. 2 tensodilatograms of the glycerol solutions under heating. The tensodilatogram of the solution containing 57% glycerol has five clearly distinguished stages (Fig. 2B). At the same time, the tensodilatograms of the heated solutions with glycerol concen-

растворов ДМСО (рис. 1). Так, на стадии 2 наблюдается отклонение зависимости  $V^+(T)$  от зависимости  $V^-(T)$ , обусловленное значительным увеличением объема системы. Это прямо противоположно поведению зависимости  $V^+(T)$  для растворов ДМСО и также абсолютно не соответствует процессам, протекавшим в исследуемом растворе на этапе охлаждения. В свою очередь, стадия 3 характеризуется выходом кривой  $V^+(T)$  на плато. В нагреваемом растворе это возможно только при развитии в нем процессов, приводящих к уменьшению объема системы, что компенсирует обычное тепловое расширение.

При сравнении тензодилатограмм, полученных как для растворов ДМСО (рис. 1), так и для растворов глицерина (рис. 2), отчетливо видно, что вид зависимостей  $V^+(T)$  в пределах одной выделенной стадии и общее количество стадий зависят от исходной концентрации раствора. Так, на тензодилатограмме нагреваемого раствора с концентрацией ДМСО  $C_B = 65\%$  полностью отсутствует стадия 4 (см. рис. 1, D), характерная для более низких концентраций. Особенно четко это проявляется на представленных на рис. 2 тензодилатограммах нагреваемых растворов глицерина. На тензодилатограмме раствора с концентрацией глицерина 57% отчетливо просматриваются пять стадий (рис. 2, B). В то же время тензодилатограммы нагреваемых растворов с концентрацией глицерина 70% и выше (рис. 2, D) содержат только две стадии, соответствующие процессу расстеклования аморфной фракции и тепловому расширению жидкой фазы.

С помощью полученных тензодилатограмм легко построить диаграммы состояний исследуемых растворов. Такие диаграммы для систем «вода-ДМСО» и «вода-глицерин» показаны на рис. 3, А, В. При их построении использовали значения параметров  $T_L^-$  и  $T_c^-$ , отражающие на экспериментальных зависимостях  $V(T)$  границы стадий при охлаждении растворов, и параметров  $T_L^+$  и  $T_c^+$ , отражающие эти границы при их последующем нагреве.

Несовпадение вида диаграмм состояния, полученных при охлаждении и последующем отогреве растворов, требует детального анализа. Ранее считалось, что такое несовпадение может возникать только при условии  $\dot{T}^- \gg \dot{T}^+$ , где  $\dot{T}^-$  и  $\dot{T}^+$  – скорости охлаждения и последующего нагрева исследуемых растворов соответственно [1, 25]. Приведенные на рис. 3, А, В диаграммы состояний получены при условии  $\dot{T}^- = \dot{T}^+$ , что свидетельствует о том, что возникающее в области концентраций  $C_g^- \dots C_g^+$  раздвоение диаграмм характерно для любых соотношений скоростей  $\dot{T}^-$  и  $\dot{T}^+$ , поскольку физические состояния, через которые проходит отогреваемый раствор, отличаются от набора состояний, соответствующих охлаждаемому раствору.

tration of 70% and above (Fig. 2D) contain only two stages corresponding to devitrification of amorphous fraction and a liquid phase thermal expansion.

Using the obtained tensodilatograms it is easy to construct a state diagram of the tested solutions. These diagrams for the water-DMSO and water-glycerol systems are shown in Fig. 3A, B. The procedure involved  $T_L^-$  and  $T_c^-$  parameters characterizing the boundaries of stages when cooling the solutions, as well as  $T_L^+$  and  $T_c^+$  parameters, reflecting these boundaries during their subsequent heating.

The discrepancy between the shape of phase diagrams, obtained when cooling and subsequent heating the solutions, requires a detailed analysis. Previously, there was a belief that such a mismatch can arise only if  $\dot{T}^- \gg \dot{T}^+$  where  $\dot{T}^-$  and  $\dot{T}^+$  were the rates of cooling and subsequent heating of the investigated solutions, respectively [24, 25]. The presented in Fig. 3A diagrams of states were obtained if  $\dot{T}^- = \dot{T}^+$ , i. e. the duality of diagrams occurring within the range of  $C_g^- \dots C_g^+$  concentrations was characteristic for any ratios of rates  $\dot{T}^-$  and  $\dot{T}^+$  since physical states, passed during heating of the solution differed from a set of states characteristic for cooling.

Thus, according to the diagrams (Fig. 3A, B; solid lines), cooling the solution with an initial concentration  $C_B' < C_g^-$  was accompanied with the formation of ice crystals  $A_S$  at the temperature  $T_L^-$ , finished after reaching temperature  $T_g$  and concentration  $C_g^-$ . Following heating of the solution with the same absolute rate of the temperature change is described with the state diagram, based on the points  $T_L^+$  and  $T_c^+$  (see Fig. 3A, B; dotted lines). Therefore, a phase trajectory corresponding to heating of the solution constructed in  $T - C_B$  coordinates, will deviate from that of cooling.

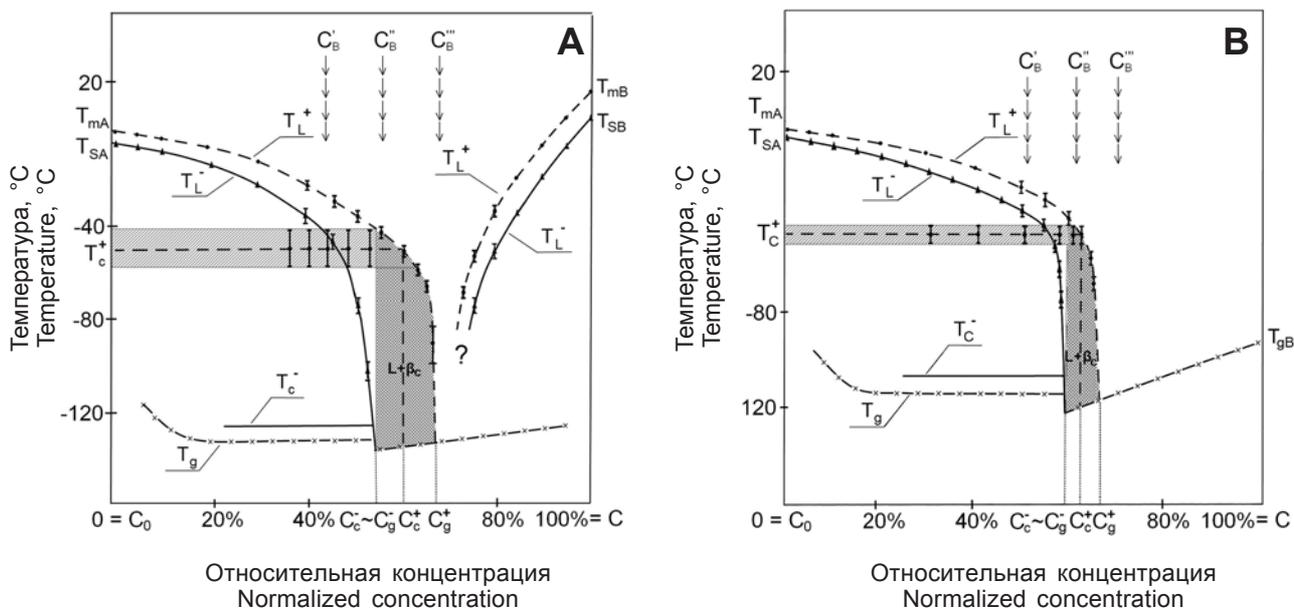
According to the trajectory of warming the particles of the cluster phase  $\beta_c$  are formed and then melt in a solution within the  $T_g \dots T_c^+$  temperature range. Formation of the maximal amount of the clustered phase  $\beta_c$  in this case corresponds to the deviation of the liquid phase concentration from the values of  $T_L^-$  diagram by  $\Delta C_{as}'$ . This deviation causes a volume effect  $\Delta V_{as}'$ , which affects the shape of the obtained tensodilatograms. In particular, in the tensodilatogram of the solution with a concentration of 57% glycerol satisfying the condition  $C_B' < C_g^-$  (see Fig. 2, B), the stage 2 corresponds to cluster crystallization, which is accompanied by an increase in the system volume, i. e.

$$\Delta V_{as}' = \Delta V_{as}' + \Delta V_{L'}' \quad (3)$$

where  $\Delta V_{L'}'$  – increase in the system volume due to thermal expansion of liquid fractions arised in the sample after devitrification.

Stage 3 in Fig. 2B depicts the cluster phase melting. Stage 4 terminating at the temperature  $T_{L1}^+$  corresponds





**Рис. 3.** Диаграммы состояний водных растворов ДМСО (А) и глицерина (В), полученные в режиме охлаждения со скоростями  $\dot{T}^- = \dot{T}^+ = 1$  град/мин; охлаждение – сплошная линия, отогрев – пунктирная линия.

**Fig. 3.** State diagrams of DMSO (A) and glycerol (B) solutions obtained during cooling with the rates  $\dot{T}^- = \dot{T}^+ = 1$  deg/min; cooling is represented by solid line, dashed line denotes thawing.

Так, согласно диаграммам (рис. 3, А, В; сплошные линии) при охлаждении раствора с исходной концентрацией  $C'_B < C_g^-$  в нем при температуре  $T_L^-$  начинается образование кристаллов льда  $A_s$ , которое заканчивается при достижении температуры  $T_g$  и концентрации  $C_g^-$ . В случае последующего нагрева с той же абсолютной скоростью изменения температуры этому раствору соответствует диаграмма состояний, построенная по точкам  $T_L^+$  и  $T_c^+$  (см. рис. 3, А, В; пунктирные линии). Поэтому соответствующая отогреву раствора фазовая траектория, указанная в координатах « $T - C_B$ », будет отклоняться от траектории охлаждения.

Согласно траектории отогрева в интервале температур  $T_g \dots T_c^+$  в растворе образуются и затем плавятся частицы кластерной фазы  $\beta_c$ . Образование максимального количества кластерной фазы  $\beta_c$  при этом соответствует отклонению концентрации жидкой фазы от значений диаграммы  $T_L^-$  на  $\Delta C'_{aS}$ . Это отклонение вызывает объемный эффект  $\Delta V'_{aS}$ , который отражается на виде получаемых тензодилатограмм. Так, на тензодилатограмме раствора с удовлетворяющей условию  $C'_B < C_g^-$  концентрацией глицерина 57% (см. рис. 2, В), стадия 2 соответствует кластерной кристаллизации, которая сопровождается увеличением объема системы, а именно:

$$\Delta V'_{aS} = \Delta V'_{aS} + \Delta V'_{L'} \quad (3)$$

где  $\Delta V'_{L'}$  – увеличение объема системы за счет

to the melting of  $A_s$  ice crystals formed during pre-cooling. Stage 5 demonstrates thermal expansion of the solution with concentration  $C'_B$  in accordance with the expression (1).

In its turn, cooling the solution with concentration  $C''_B > C_g^-$ , as proceeds from diagrams (see. Fig. 3), will lead to a complete vitrification at the temperature of  $T_g$  without any intermediate phase transitions. Further heating of the solution is described by a curve characteristic to a cluster crystallization with a maximal volume effect  $\Delta V''_{aS}$ . Melting processes of the formed  $\beta_c$  phase particles are completed at the temperature  $T_c^+$ . Tensodilatograms shown in Fig. 2C correspond to the trajectories of cooling and heating. It is seen that during the solution cooling, a thermal contraction with subsequent vitrification is observed. During thawing a sharp extra increase in the solution volume occurs due to cluster crystallization (stage 2). In this case, stage 3 reflects the subsequent melting of cluster phase  $\beta_c$  and there is no stage 4, corresponding the melting of individual ice crystals  $A_s$ .

With further rise in the initial solution concentration the amount of  $\beta_c$  phase formed during thawing and the level of corresponding volume effects diminish dramatically and become equal to zero at  $C_B \geq C_g^+$ . The tensodilatograms shown in Figs. 1D and 2D correspond to a behaviour of the solution with an initial concentration of  $C'''_B \geq C_g^+$ .

The dependence of the mass  $m_{\beta_c}$  of forming  $\beta_c$  phase on the  $C_B$  concentration passes through a maximum within the  $C_0 \dots C_g$  concentration range. Such an

теплового расширения образовавшихся в образце после расстеклования жидких фракций.

Стадия 3 на рис. 2, В отображает процесс плавления кластерной фазы. Стадия 4, завершающаяся при температуре  $T_{L1}^+$ , соответствует плавлению кристаллов льда  $A_S$ , образовавшихся в процессе предварительного охлаждения. Стадия 5 отображает тепловое расширение раствора с концентрацией  $C_B'$  в соответствии с выражением (1).

В свою очередь охлаждение раствора концентрации  $C_B'' > C_g^-$  согласно диаграммам (см. рис. 3) приведет к его полному стеклованию при температуре  $T_g$  без каких-либо промежуточных фазовых переходов. Последующему нагреву этого раствора соответствует траектория, согласно которой в нем происходит кластерная кристаллизация с максимальным объемным эффектом  $\Delta V_{as}'''$ . Процессы плавления образовавшихся частиц фазы  $\beta_c$  завершаются при температуре  $T_c^+$ . Данным траекториям охлаждения и нагрева соответствуют тензодилатограммы, представленные на рис. 2, С. Видно, что в процессе охлаждения раствора наблюдается его тепловое сжатие с последующим стеклованием. При отогреве происходит резкое дополнительное увеличение объема раствора, обусловленное кластерной кристаллизацией (стадия 2). Стадия 3 в данном случае отражает последующее плавление кластерной фазы  $\beta_c$ , а стадия 4, соответствующая плавлению отдельных кристаллов льда  $A_S$ , отсутствует.

При дальнейшем увеличении концентрации исходного раствора количество образующейся при отогреве фазы  $\beta_c$  и величина соответствующих объемных эффектов начинают резко уменьшаться и становятся равными нулю при  $C_B \geq C_g^+$ . Поведению раствора с исходной концентрацией  $C_B''' \geq C_g^+$  соответствуют тензодилатограммы, представленные на рис. 1, D и 2, D.

Установлено, что зависимость массы образующейся  $\beta_c$ -фазы  $m_\beta$  от концентрации  $C_B$  в интервале концентраций  $C_0 \dots C_g$  проходит через максимум. Такой характер зависимости  $m_\beta(C_B)$  в этом интервале концентраций легко объяснить на основе модели кластерной кристаллизации. Согласно этой модели величина  $m_\beta$  в интервале концентраций  $C_0 \dots C_g$  будет нарастать по мере увеличения количества молекул криопротекторного вещества и комплексов  $A_n B_m$ , способных образовывать кластеры. В дальнейшем величина  $m_\beta$  будет уменьшаться до нуля, поскольку в интервале  $C_c \dots C_g$  недостаточно молекул воды  $A$ . В результате зависимость  $m_\beta(C_B)$  проходит через максимум в диапазоне концентраций  $C_B = C_c$  [18].

Модель кластерной кристаллизации [2, 17, 18] объясняет и существенное различие между тензодилатограммами, соответствующими отогреву

appearance of dependence  $m_\beta(C_B)$  in the concentration range is easily explained on the basis of the cluster crystallization model. According to this model the index  $m_\beta$  will enhance within the  $C_0 \dots C_g$  concentration range with the rise in the amount of cryoprotective agent molecules and associates  $A_n B_m$ , capable of forming clusters. Thereafter the  $m_\beta$  value will be reduced to zero, since there are not enough water molecules  $A$  in the  $C_c \dots C_g$  interval. Finally, the dependence  $m_\beta(C_B)$  passes through a maximum at  $C_B = C_c$  [19].

Cluster crystallization model [12–14] explains also a significant difference between tensodilatograms corresponding to a heating of aqueous solutions of glycerol (see Fig. 2) and DMSO (see Fig. 1). In the first case, the envelope consisting of cluster particles is entirely amorphous, since glycerol does not crystallize in used in this research regimens of cooling-heating (Fig. 4). In these solutions, no phase transitions occur and there is only an usual thermal contraction or expansion of the liquid phase in accordance with the expression (2) and the reaching the plateau at  $T < T_g$ , which corresponds to the solution vitrification.

At the same time, the envelopes of cluster particles formed during cooling-heating of DMSO aqueous solutions may contain crystalline fragments. This is due to the crystallization ability of DMSO and confirmed by the tensodilatograms of its highly concentrated solutions (Fig. 5). These tensodilatograms also demonstrate that DMSO crystallization is accompanied with a significant decrease in the system volume and *vice versa* its melting results in an increase of the latter. As a result, the formation of cluster particles in DMSO

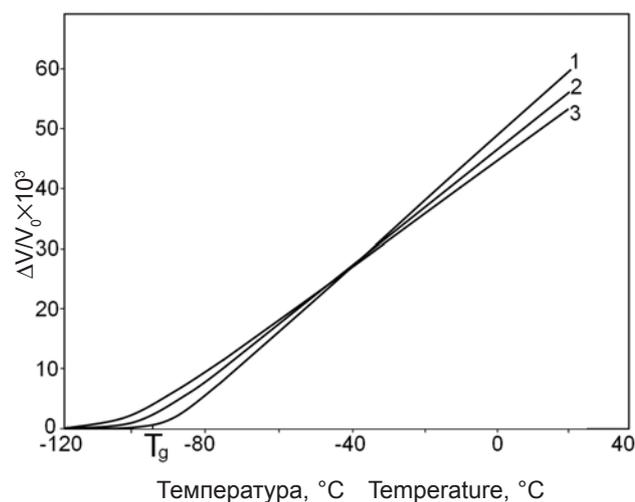


Рис. 4. Тензодилатограммы отогреваемых водных растворов с концентрацией глицерина: 1 – 100%; 2 – 90%; 3 – 80%.

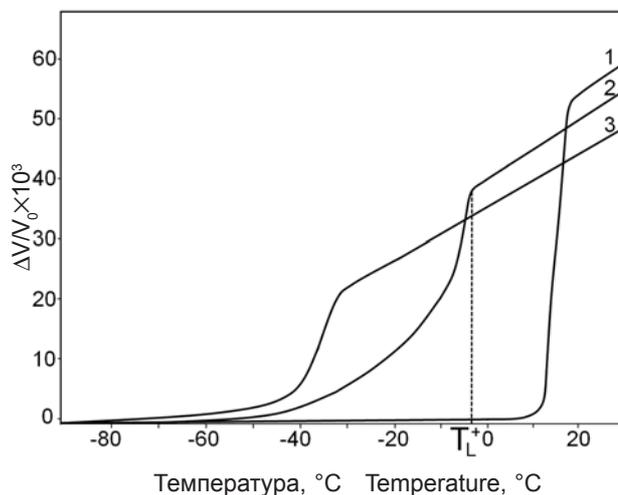
Fig. 4. Tensodilatograms of thawed aqueous solutions with glycerol concentration of: 1 – 100%, 2 – 90%, 3 – 80%.



водных растворов глицерина (см. рис. 2) и ДМСО (см. рис. 1). В первом случае оболочка кластерных частиц полностью аморфная, поскольку при используемых в данной работе режимах охлаждения-нагрева глицерин не кристаллизуется (рис. 4). В этих растворах не происходит фазовых переходов и наблюдается обычное тепловое сжатие или расширение жидкой фазы согласно выражению (2) и выход на плато при  $T < T_g$ , что соответствует стеклованию раствора.

В то же время оболочки кластерных частиц, образующихся при охлаждении-нагреве водных растворов ДМСО, могут содержать кристаллические фрагменты. Это обусловлено способностью ДМСО к кристаллизации, что подтверждают тензодилатограммы его высококонцентрированных растворов (рис. 5). Из этих тензодилатограмм также следует, что кристаллизация ДМСО сопровождается существенным уменьшением объема системы и, наоборот, его плавление приводит к увеличению последнего. В результате при образовании кластерных частиц в водных растворах ДМСО объем системы может уменьшаться (см. рис. 1, стадия 2): увеличение объема системы при образовании ядра частицы из микрокристаллов льда  $a_s$  компенсируется уменьшением объема при образовании кристаллических фрагментов  $b_s$  в ее оболочке. Соответственно, плавление частиц фазы  $\beta_c$  проходит с увеличением объема (см. рис. 1, стадия 3). Стадия 4 на этих рисунках соответствует плавлению кристаллов льда  $A_s$ , образовавшихся при предварительном охлаждении раствора. Эта стадия отсутствует на рис. 1, D, поскольку представленная тензодилатограмма соответствует исходным концентрациям в интервале  $C_c^+ \dots C_g^+$ , при которых кристаллы  $A_s$  не образуются.

Для сравнения полученных результатов с данными дифференциального термического анализа и дифференциальной сканирующей калориметрии на рис. 1, B приведена термограмма водного раствора ДМСО с концентрацией  $C_B = 40\%$ , полученная при его нагреве [21]. На термограмме эндотермический пик I соответствует плавлению кластерных частиц, а эндотермический пик II – плавлению кристаллов льда  $A_s$ . Поскольку тепловые эффекты от плавления ядра кластера и его кристаллической оболочки суммируются, то на получаемых с помощью дифференциального термического анализа или дифференциальной сканирующей калориметрии термограммах плавление кластерных частиц отражается одним пиком. Это не позволяет делать выводы о структуре кластеров, которая играет определяющую роль в формировании возможных механизмов повреждения биологических объектов при кластерной кристаллизации. Одним из основных



**Рис. 5.** Тензодилатограммы отогреваемых водных растворов с концентрацией ДМСО: 1 – 100%; 2 – 90%; 3 – 80%.

**Fig. 5.** Tensodilatograms of thawed aqueous solutions with DMSO concentration of: 1 – 100%, 2 – 90%, 3 – 80%.

aqueous solutions may be accompanied with the system volume decrease (see Fig. 1, stage 2): an increase in the system volume during the formation of particle's core from ice microcrystals  $a_s$  is compensated by a volume reduction when forming the crystalline fragments  $b_s$  in its envelope. Accordingly, melting of  $\beta_c$  phase particles occurs with increasing the volume (see Fig. 1, stage 3). Stage 4 in these Figures corresponds to melting of ice crystals  $A_s$  formed during the solution preliminary cooling. This stage is absent in Fig. 1D, since the represented tensodilatogram corresponds to initial concentrations within  $C_c^+ \dots C_g^+$  range, whereat no formation of  $A_s$  crystals occurs.

The obtained results could be compared with the data of differential thermal analysis and differential scanning calorimetry, *e. g.* Fig. 1, B shows a thermogram obtained during heating of DMSO aqueous solution with concentration  $C_B = 40\%$  [19]. In the thermogram an endothermic peak I corresponds to melting of cluster particles and endothermic peak II depicts the melting of ice crystals  $A_s$ . Since thermal effects resulting from melting of cluster core and its crystalline envelope are summed, the thermograms obtained by means of differential thermal analysis or differential scanning calorimetry have only one peak for the melting of particles. This does not enable to draw conclusions about the structure of the clusters, which plays a decisive role in the formation of possible mechanisms of injury to biological objects in cluster crystallization. One of the major factors in this case, as well as during melting, is the structure of cluster particle envelope. If during its formation the molecules

факторов в этом случае, как и при плавлении, является структура оболочки кластерной частицы. Если при ее образовании молекулы криопротекторного вещества переходят в кристаллическое состояние, то сопровождающие этот процесс объемные эффекты будут отрицательными по величине и скомпенсируют увеличение объема от образования ядра частицы из молекул воды. В результате суммарный объемный эффект при образовании кластера будет минимальным, особенно если учесть, что это происходит спонтанно, то есть ядро и оболочка образуются практически одновременно. В случае аморфной структуры оболочки кластерной частицы она будет образовываться со значительным увеличением объема, сравнимым с объемными эффектами при кристаллизации воды. Это может вызвать существенные изменения структуры замороженных биосистем, особенно на этапах кластерной кристаллизации криопротекторных растворов.

Анализ экспериментально полученных в данной работе тензодилатограмм подтверждает гипотезу кластерной кристаллизации растворов с НВ-взаимодействующими компонентами. Согласно этой гипотезе [2, 17, 18], при исходных концентрациях  $C_B < C_g$  кластерные частицы фазы  $\beta_c$  состоят из микрокристаллов льда  $a_s$ , окруженных молекулами криопротекторного вещества  $B$ , находящимися в аморфном  $b_g$  или кристаллическом  $b_s$  состояниях [2, 17]. Возможность образования микрокристаллов  $a_s$  здесь возникает при достаточно низких температурах, когда размер критических зародышей кристаллов льда минимизируется настолько, что они могут образовываться при соединении комплексов  $A_n B_m$  в кластеры без разрыва водородных АВ-связей. При этом необходимо, чтобы количество молекул воды, находящихся в образуемом кластере, удовлетворяло условию возникновения критического зародыша в конкретном температурном интервале [7]. Естественно, что в этом случае вначале кластеры будут образовываться из комплексов с максимальным количеством связанной воды, а по мере понижения температуры в процесс будут включаться менее гидратированные молекулы. Это объясняет тот факт, что образование кластеров фазы  $\beta_c$  происходит в широком диапазоне температур  $T_{c0} \dots T_g$ , а не при  $T = T_{eut} = const$ , как это требует эвтектическая кристаллизация.

Кроме того, сделанные нами предположения [2] о структуре кластерных частиц объясняют природу большинства регистрируемых объемных эффектов, сопровождающих фазовые переходы в исследуемых криопротекторных растворах. Разницу в кинетике кристаллизации и последующего плавления водных растворов ДМСО и глицерина можно объяснить с помощью представлений о тонкой структуре кластерных частиц. Они дают

of cryoprotective substances transform into a crystalline state, then the accompanying this process volume effects will be negative in value and will compensate an increase in volume caused by the particle core formation from water molecules. The resulting total volume effect during cluster formation will be minimal, especially if considering a spontaneous occurrence of the latter, *i. e.*, the core and envelope are formed almost simultaneously. In the case of amorphous structure of cluster particle envelope it is formed with a substantial increase in volume, similar to volume effects during water crystallization. This can cause drastic changes in the structure of frozen biological systems, especially at the stages of the cluster crystallization of cryoprotective solutions.

An analysis of the tensodilatograms experimentally obtained in this study supports the hypothesis of cluster crystallization of the solutions with HB-interacting components. According to this hypothesis [12–14] at initial  $C_B < C_g$  concentrations the cluster particles of  $\beta_c$  phase are composed of ice microcrystals  $a_s$  surrounded by the molecules of cryoprotective agent  $B$ , being either in amorphous  $b_g$  or crystalline  $b_s$  states [13, 14]. The possibility of microcrystals  $a_s$  formation appears at quite low temperatures, when the size of the critical ice crystal nuclei are so small that they can be formed by joining the  $A_n B_m$  associates into clusters without breaking the hydrogen  $A-B$  bonds. Herewith the number of water molecules in a cluster formed should satisfy the conditions of a critical nucleus emergence within a particular temperature range [5]. Naturally, in this case the clusters will be formed primarily from the associates with the maximum amount of bound water and the process will involve the less hydrated molecules with decrease of the temperature. This explains the fact that the formation of clusters of the  $\beta_c$  phase occurs over a wide temperature range  $T_{c0} \dots T_g$ , and not at  $T = T_{eut} = const$ , as required by eutectic crystallization.

In addition, our assumptions [14] on the structure of the cluster particles explain the nature of the majority of the recorded volume effects accompanying the phase transitions in the studied cryoprotective solutions. Difference in the kinetics of crystallization and subsequent melting of DMSO and glycerol aqueous solutions can be explained by the notions of a fine structure of cluster particles. They provide an opportunity to formulate a new understanding of the mechanisms of biological objects injury in the low temperature range and explain the difference between protective properties of these cryoprotectants with quite the same ability to bind water molecules. The main role in this explanation is played by experimentally discovered effect of an abrupt increase in warmed glycerol solutions near the devitrification temperature. In this situation the structural features of these solutions at



возможность сформулировать новые представления о механизмах повреждения биообъектов в области низких температур и объяснить различие защитных свойств этих криопротекторов, обладающих практически одинаковой способностью связывать молекулы воды. Основную роль в этом объяснении играет обнаруженный экспериментально эффект резкого увеличения объема отогреваемых растворов глицерина вблизи температуры растеклования. В данной ситуации следует учитывать особенности структуры этих растворов при  $T \sim T_g$ . При этих температурах большинство жидких микрофаз представляют собой замкнутые в твердофазной матрице включения. Поэтому приводящая к увеличению объема системы кластерная кристаллизация вызывает в них рост давления, и, как следствие, пластические сдвиги в матрице [24] и повреждение замороженных биообъектов. Это обстоятельство требует детального изучения кластерной кристаллизации различных криопротекторных растворов. Вполне возможно, что для правильного подбора криопротекторных композиций и режимов охлаждения и отогрева криоконсервируемых с их помощью биообъектов потребуется определенная классификация криопротекторов по параметрам кластерной кристаллизации последних.

### Выводы

Таким образом, слабое взаимодействие между молекулами воды и криопротекторными веществами в растворах ДМСО и глицерина при низких температурах приводит к образованию кластерной фазы. При этом структура образующихся кластерных частиц зависит как от вида криопротекторного вещества, так и от концентрации исследуемого раствора. Это подтверждается наблюдаемыми объемными эффектами, которые сопровождают охлаждение и последующий нагрев раствора. Данные эффекты проходят через максимум в интервале концентраций криопротекторных веществ (30–70%): их снижение при  $C < 30\%$  связано с уменьшением образованных за счет водородных связей комплексов  $A_n B_m$  из-за недостаточного количества молекул криопротектора, а при  $C > 70\%$  – из-за уменьшения количества комплексов  $A_n B_m$  – в растворе, связанного с нехваткой молекул воды.

Построенные по регистрируемым зависимостям  $V = V(T)$  спаренные диаграммы состояний для водных растворов ДМСО и глицерина, включающие области существования кластерной фазы, полностью объясняют все наблюдаемые особенности кристаллизации-плавления данных растворов.

Полученные диаграммы состояний впервые используются для описания растворов со слабым межмолекулярным взаимодействием компонентов.

$T \sim T_g$  should be taken into account. At these temperatures, most liquid microphases are the inclusions, closed into solid-phase matrix. Therefore, the cluster crystallization, leading to an increase in the system volume, causes therein a pressure rise, resulting in the plastic shifts in the matrix [23] and, as a consequence, in an injury of the frozen biological objects. This fact requires a detailed study of the cluster crystallization of different cryoprotective solutions. It is entirely possible, that the proper selection of cryoprotective compositions as well as cooling and warming modes of cryopreserved biological objects requires a certain classification of cryoprotectants by the parameters of the cluster crystallization of the latter.

### Conclusions

Thus, a weak interaction between water molecules and cryoprotective substances in DMSO and glycerol solutions at low temperatures leads to the formation of a cluster phase. Herewith the structure of the formed cluster particles depends on the type of cryoprotective agent and concentration of the solution tested. This is confirmed by the observed volume effects that accompany cooling of the solution and subsequent heating. These effects pass through a maximum within the concentrations range of cryoprotective agents (30–70%). Their decrease at  $C < 30\%$  is related to reducing the formed by hydrogen binding associates  $A_n B_m$  due to small amount of cryoprotectant molecules. Meanwhile at  $C > 70\%$  this was due to a reduction in the number of associates  $A_n B_m$  in the solution related to a lack of water molecules.

The twin diagrams of state plotted by the recorded dependencies  $V = V(T)$  for DMSO and glycerol aqueous solutions, including the region of the cluster phase existence, fully explain all the observed features of the crystallization and melting of these solutions.

The obtained diagrams of state were for the first time used to describe the solutions with weak molecule-to-molecule relationship of the components.

### References

1. Bevan O.J., Goates R.J., Lamb J.D. Solid-liquid phase equilibria in water + ethylene glycol. *J Chem Thermodynamics* 1972; 4 (1): 123–126.
2. Bohon R.G., Conway W.T. DTA Studies of the glycerol-water system. *Thermochim Acta* 1972; 4 (3–5): 321–341.
3. Boutron P., Kaufman A. Metastable states in the system water-ethanol. Existence of a second hydrate, curious properties. *J Chem Phys* 1978; 68 (11): 5032–5041.
4. Boutron P., Kaufman A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2 propanediol. *Cryobiology* 1979; 16 (6): 557–568.
5. Cahn R.W., editor. *Physical metallurgy*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam; 1970: 1333.
6. Cocks F.H., Brower W.E. Phase diagram relationships in cryobiology. *Cryobiology* 1974; 1 (4): 340–358.
7. Friedel J, editor. *Dislocations*. Pergamon Press, Oxford; 1964.



## Литература

1. Зинченко А.В., Манк В.В., Моисеев В.А. О фазовых переходах и физических состояниях системы вода-пропандиол // Доклады АН СССР. – 1978. – Т. 240. – С. 888–891.
2. Осецкий А.И. К теории диаграмм состояния криопротекторных растворов // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 102–117.
3. Осецкий А.И., Кирилук А.Л., Гурина Т.М. О возможном механизме повреждения криоконсервируемых биологических объектов за счет пластической релаксации давлений в замкнутых жидкофазных включениях // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №3. – С. 272–282.
4. Осецкий А.И., Севастьянов С.С. Микрообъемный сканирующий тензодилатометр для биофизических исследований // Science Rise. – 2015. – №2/2(7). – С. 106–111.
5. Статистическая физика / Под ред. Ю.А. Климонтович. – М.: Наука, 1982. – 608 с.
6. Статистическая физика / Под ред. Л.Д. Ландау, Е.М. Лившиц. – М.: Наука, 1964. – 568 с.
7. Физическое металловедение / Под ред. Р. Кана. – М.: Мир, 1968. – 490 с.
8. Хочачка П., Самеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. – М.: Мир, 1977. – 398 с.
9. Пат. №76143, Украина, МПК G01F17/00. Микрообъемный дилатометр / О.И. Осецкий, О.В. Давидова: №u2012 06833; заявл. 05.06.2016; опубл. 25.12.2012, Бюл. №24.
10. Bevan O.J., Goates R.J., Lamb J.D. Solid-liquid phase equilibria in water + ethylene glycol // J. Chem. Thermodynamics. – 1972. – Vol. 4, №1. – P. 123–126.
11. Bohon R.G., Conway W.T. DTA Studies of the glycerol-water system // Thermochim. Acta. – 1972. – Vol. 4, №3–5. – P. 321–341.
12. Boutron P., Kaufman A. Metastable states in the system water-ethanol. Existence of a second hydrate, curious properties // J. Chem. Phys. – 1978. – Vol. 68, №11. – P. 5032–5041.
13. Boutron P., Kaufman A. Stability of the amorphous state in the system water – 1,2-propanediol // Cryobiology. – 1979. – Vol. 16, №6. – P. 557–568.
14. Cocks F.H., Brower W.E. Phase diagram relationships in cryobiology // Cryobiology. – 1974. – Vol. 1, №4. – P. 340–358.
15. Dislocations / Friedel J. – Pergamon Press, Oxford, 1964. – 579 p.
16. Malsam J., Aksan A. Hydrogen bonding and kinetics/thermodynamics transitions of aqueous trehalose solutions at cryogenic temperature // J. Phys. Chem. B. – 2009. – Vol.113, №19. – P. 6792–6799.
17. Osetsky A.I. Peculiarities of state diagrams of aqueous solutions of cryoprotective agents // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59, №2. – P. 141–149.
18. Osetsky A.I. Thermodynamic aspects of cluster crystallization in cryoprotective solution // CryoLetters. – 2011. – Vol. 32, №3. – P. 216–224.
19. Pagnotta S.E., McLain S.E., Soper A.K. et al. Water and trehalose: how much do they interact with each other // J. Phys. Chem. B. – 2010. – Vol. 114. – P. 4904–4908.
20. Rasmussen D.H., Luyet B.J. Complementary study of some nonequilibrium phase transition in frozen solutions of glycerol, ethylene glycol, glucose and sucrose // Biodynamica. – 1969. – Vol. 10, №220. – P. 319–331.
21. Rasmussen D.H., MacKenzie A.P. Phase diagram for the system water-dimethylsulfoxide // Nature. – 1968. – Vol. 220, №174. – P. 1315–1317.
22. Towey J.J., Soper A.K., Dougan L. Preference for isolated water molecules in a concentrated glycerol-water mixture // J. Phys. Chem. B. – 2011. – Vol. 115. – P. 7799–7807.
23. Towey J.J., Soper A.K., Dougan L. Molecular insight into the hydrogen bonding and micro-segregation of a cryoprotectant molecule // J. Phys. Chem. B. – 2012. – Vol. 116. – P. 13898–13904.
24. Towey J.J., Soper A.K., Dougan L. What happens to the structure of water in cryoprotectant solutions? // Faraday Discussions. – 2013. – Vol. 167. – P. 159–176.
25. Zinchenko A.V., Zinchenko V.D. On phase transitions in the water-ethylene glycol system at subzero temperatures under non-isothermal conditions // CryoLetters. – 2001. – Vol. 22. – P. 191–198.
8. Hochachka P.W., Somero G.W. Strategies of biochemical adaptation. Philadelphia; 1973.
9. Klimontovich Y. Statistical physics. Moscow: Nauka; 1982.
10. Landau L.D., Lifshitz E.M. Statistical physics. Moscow: Nauka; 1964.
11. Malsam J., Aksan A. Hydrogen bonding and kinetics/thermodynamics transitions of aqueous trehalose solutions at cryogenic temperature. J Phys Chem B 2009; 113 (19): 6792–6799.
12. Osetsky A.I. Peculiarities of state diagrams of aqueous solutions of cryoprotective agents. Cryobiology 2009; 59 (2): 141–149.
13. Osetsky A.I. Thermodynamic aspects of cluster crystallization in cryoprotective solution. CryoLetters 2011; 32 (3): 216–224.
14. Osetsky A.I. To theory of diagrams of state for cryoprotective solutions. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2014; 24 (2): 102–117.
15. Osetsky A.I., Davydova O.V., inventors. Microvolumetric dilatometer. Patent of Ukraine №76143, IPC G01F17/00. 2012 December 25.
16. Osetsky A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M. On possible mechanism of damage in frozen-thawed biological objects due to pressure plastic relaxation in closed liquid phase inclusions. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2007; 17 (3): 272–282.
17. Osetsky A.I., Sevastianov S.S. Microvolumetric scanning tensodilatometer for biophysical studies. Science Rise 2015; 2 (7): 106–111.
18. Pagnotta S.E., McLain S.E., Soper A.K. et al. Water and trehalose: how much do they interact with each other. J Phys Chem B 2010; 114: 4904–4908.
19. Rasmussen D.H., MacKenzie A.P. Phase diagram for the system water – dimethyl sulfoxide. Nature 1968; 220 (174): 1315–1317.
20. Rasmussen D.H., Luyet B.J. Complementary study of some non-equilibrium phase transition in frozen solutions of glycerol, ethylene glycol, glucose and sucrose. Biodynamica 1969; 10 (220): 319–331.
21. Towey J.J., Soper A.K., Dougan L. Preference for isolated water molecules in a concentrated glycerol-water mixture. J Phys Chem B 2011; 115: 7799–7807.
22. Towey J.J., Soper A.K., Dougan L. Molecular insight into the hydrogen bonding and micro-segregation of a cryoprotectant molecule. J Phys Chem B 2012; 116: 13898–13904.
23. Towey J.J., Soper A.K., Dougan L. What happens to the structure of water in cryoprotectant solutions? Faraday Discussions 2013; 167: 159–176.
24. Zinchenko A.V., Mank V.V., Moiseyev V.A. et al. About phase transitions and physical states of water-propanediol system. DAN SSSR 1978; 240: P. 888–891.
25. Zinchenko A.V., Zinchenko V.D. On phase transitions in the water – ethylene glycol system at subzero temperatures under non-isothermal conditions. CryoLetters 2001; 22: 191–198.

