

# Определение температурных интервалов фазовых превращений в криозащитном растворе для разработки единого протокола замораживания-оттаивания биообъектов

Т.М. ГУРИНА, А.Л. КИРИЛЮК

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Determining the Temperature Ranges of Phase Transitions in Cryoprotective Solution for Development of Unified Protocol of Biological Objects' Freeze-Thawing

T.M. GURINA, A.L. KIRILYUK

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

Криоконсервирование – надежный способ долгосрочного сохранения биоматериала. При разработке протоколов замораживания-оттаивания, как правило, основное внимание уделяется режиму охлаждения в то время, как скорости охлаждения-нагрева находятся в тесной взаимосвязи и взаимозависимости. В практической криобиологии в последнее время все чаще используются контролируемые скорости на этапе охлаждения, однако оттаивание происходит традиционным способом – на водяной бане.

Цель данной работы – разработать оригинальную методику определения температурных интервалов использования контролируемых скоростей как на этапе охлаждения, так и на этапе нагрева для создания единого протокола замораживания-оттаивания, обеспечивающего максимальную сохранность биообъекта после криоконсервирования. При разработке единого протокола замораживания-оттаивания перспективным является подход, при котором изменение скоростей охлаждения-нагрева происходит в температурных интервалах, связанных с фазовыми и структурными преобразованиями в криозащитных средах сложного состава. Предельные значения этих температурных интервалов определяли методом термопластической деформации, который является разновидностью термомеханического анализа.

Для выявления вклада фазовых превращений, соответствующих каждому компоненту криозащитной среды сложного состава, исследовали экспериментальные термопластические кривые для дистиллированной воды, физиологического раствора, культуральных сред и соответствующих растворов криопротекторов. Сформулированы общие принципы выбора внешнего деформирующего напряжения для определения предельных значений рассматриваемых температурных интервалов для различных криозащитных сред, а также принцип выбора конкретного значения скорости охлаждения и нагрева в температурных интервалах, соответствующих следующим фазовым преобразованиям: кристаллизация (плавления) основной массы льда, кристаллизация (плавления) смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора, кристаллизация (плавления) эвтектики растворителя на основе культуральной среды, а также рекристаллизация перед соответствующими процессами плавления на этапе нагрева.

Методика разработки единого протокола замораживания-оттаивания с контролируемыми скоростями охлаждения-нагрева имеет универсальный характер и применима при криоконсервировании биообъектов с криозащитными средами сложного состава. Единый протокол может служить основой для разработки программного обеспечения для замораживателей с целью внедрения методики замораживания-оттаивания с контролируемыми скоростями в программных замораживателях.

Cryopreservation is a reliable way for long time preservation of biological material. When designing freeze-thawing protocols as a rule the great attention is paid only to cooling regimen while cooling and warming rates are closely interrelated and dependent. Nowadays in cryobiological practice the controlled cooling rates is mostly used, however thawing is still done with traditional water bath.

The research aim was to develop an original method of temperature ranges determination using controlled rates both at cooling and warming stages to create an unified freeze-thawing protocol providing a maximum preservation of biological object after cryopreservation. During development of unified freeze-thawing protocol the approach, in which a change of cooling-warming rates occurs within temperature ranges associated with phase and structural changes in composite cryoprotective media is perspective. Limit values of these temperature ranges were determined by thermoplastic deformation method, a type of thermomechanical analysis.

To identify the contribution of phase transitions corresponding to each component of composite cryoprotective medium, experimental thermoplastic curves for distilled water, physiological solution, cultural media, and appropriate cryoprotective solutions were studied. The general principles of external deforming stress selection to determine the limits of observed temperature ranges for different cryoprotective media, as well as the principle of choosing the specific value of cooling and warming rates within the temperature ranges appropriate to phase transitions such as: crystallization (melting) of the bulk of ice, crystallization (melting) of eutectic concentration mixture of cryoprotective solution, crystallization (melting) of culture medium solvent eutectics, as well as recrystallization prior to corresponding processes of melting during warming.

Method for development of unified freeze-thawing protocol with controlled cooling-warming rates is universal and applicable for cryopreservation of biological objects in composite cryoprotective media. Common protocol can serve as the basis for development of a software for freezers to implement the methods of freeze-thawing with controlled rates using programmable freezers.