



**Univerzita Komenského v Bratislave**

Fakulta matematiky, fyziky a informatiky



**Mgr. Katarína Čechová**

Autoreferát dizertačnej práce

**VLASTNOSTI VODY V NANOPÓROCH SKÚMANÉ POZITRÓNVOU ANIHILÁCIOU**

na získanie akademického titulu philosophiae doctor

v odbore doktorandského štúdia:

**4.5.1. Jadrová a subjadrová fyzika**

Miesto a dátum:  
**Bratislava, 2019**

**Dizertačná práca bola vypracovaná** v dennej forme doktorandského štúdia

**na** Fyzikálnom ústave SAV Bratislava

**Predkladateľ:** Katarína Čechová  
Fyzikálny ústav SAV  
Dúbravská cesta 9  
845 11 Bratislava

**Školiteľ:** RNDr. Ondrej Šauša, CSc.  
FÚ SAV Bratislava

Študijný odbor: 4.5.1. Jadrová a subjadrová fyzika

**prof. RNDr. Jozef Masarik, DrSc.**  
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky UK  
Mlynská dolina, 842 48, Bratislava

predseda odborovej komisie

# OBSAH

Ciele dizertačnej práce .....	4
ÚVOD.....	4
<b>1. Teoretická časť</b> .....	<b>5</b>
1.1 Metóda PALS .....	6
1.2 Aparatúra na meranie PALS .....	6
1.3 Princíp metódy PALS .....	6
<b>2. Dosiahnuté výsledky dizertačnej práce</b> .....	<b>8</b>
2.1 VODA .....	8
2.2 DMSO .....	11
2.3 Binárna zmes DMSO-voda.....	14
2.4 Zmes DMSO-voda v nízkych koncentráciách .....	15
<b>ZÁVER</b> .....	<b>25</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>27</b>
<b>Literatúra</b> .....	<b>28</b>
<b>Zoznam publikácií</b> .....	<b>29</b>

## CIELE DIZERTAČNEJ PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce je snaha vysvetliť procesy, ktorými voda prechádza pri zmene teploty a ako tieto procesy vplyvajú na jej vlastnosti. Fyzikálne vlastnosti vody môžu byť ovplyvňované aj kryoprotektívnymi látkami. V prípade sledovania roztoku vody s kryoprotektívnou látkou dimetylsulfoxid (DMSO) pozorujeme abnormálne správanie sa systému vzhľadom na teplotu tuhnutia a topenia. Práve tieto teplotné parametre vysoko ovplyvňuje koncentrácia DMSO v roztoku. Z toho dôvodu informácie o štruktúre zmesi DMSO-voda sú dôležitým krokom pre pochopenie kryoprotektívnych vlastností.

Ciele dizertačnej práce je možné zhrnúť do nasledujúcich bodov:

1. Štúdium fyzikálnych vlastností vody, kryoprotektívnej látky DMSO a ich zmesí v objemovom a uväznenom stave (v póroch nanometrových rozmerov modelovej matrice) pomocou metódy pozitronovej anihilačnej časovej spektroskopie (PALS).
2. Sledovanie nízkych objemových koncentrácií zmesi DMSO-voda a zameranie sa na precíznejšie spoznanie kryoprotektívneho efektu na molekulárnej úrovni.
3. Skúmanie zmien mikroštruktúrneho voľného objemu týchto látok v procesoch tuhnutia a topenia meraním dób života ortopozitronia.
4. Sledovanie vplyvu kryštalizácie vody, DMSO a ich zmesi na tvorbu pozitronia.
5. Skúmanie vplyvu veľkosti a geometrie pórov matrice na procesy tuhnutia a topenia skúmaných látok v mezopóroch.

## ÚVOD

Predkladaná práca je venovaná výskumu fyzikálnych vlastností vody, DMSO a ich zmesi pomocou metódy pozitronovej anihilačnej časovej spektroskopie (PALS).

Metóda PALS je jadrovofyzikálna metóda, ktorá umožňuje skúmať mikroštruktúru materiálov prostredníctvom procesov vzniku a zániku pozitronia, čím umožňuje sledovať fyzikálne a chemické vlastnosti materiálov. Pomocou tejto metódy môžeme štruktúru látky sledovať až na úrovni niekoľkých nanometrov. V dizertačnej práci je popísaný nielen princíp PALS metódy, ale je tu uvedená aj interpretácia nameraných anihilačných charakteristík skúmaných látok v objemovom a uväznenom stave.

Voda je dôležitá zlúčenina nachádzajúca sa všade okolo nás, častokrát býva uväznená v póroch tuhých látok. Skúmanie vody v makroskopických objemoch a vody uväznenej v póroch nanometrových rozmerov má význam pre vykreslenie jej dynamického správania sa. Ak sa menia vonkajšie parametre je viditeľný rozdiel v správaní sa objemovej aj uväznenej vody. Objasnenie jej fyzikálnych vlastností a poznanie procesov, ktorými prechádza je potrebné pre rôzne odvetvia - napr. aj pre pochopenie biologických procesov. Experimenty uvedené v tejto práci boli zamerané na sledovanie tých vlastností vody, ktoré sú najdôležitejšie pre účely zmrazovania a uchovávaní buniek pri nízkych teplotách. Nadviazali sme na výskum Jána Lakotu [21], ktorý skúmal viabilitu kmeňových buniek v závislosti od použitej koncentrácie DMSO pri ich zmrazovaní. Zaoberali sme sa otázkou, aký fyzikálny mechanizmus je zodpovedný za efekt kryoprotektívnych vlastností DMSO. Sledovali sme nízke objemové koncentrácie a zamerali sme sa na precíznejšie spoznanie kryoprotektívneho efektu zmesi DMSO-voda na molekulárnej úrovni pomocou metódy PALS. Zistené poznatky by v budúcnosti mohli prispieť k efektívnemu vysvetleniu princípu metódy kryokonzervácie a mohli by napomôcť k ďalšiemu úspešnému posunu pri zmrazovaní väčších biologických štruktúr.

# 1. TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Metóda PALS

Pozitronová anihilačná spektroskopia pomocou interakcie pozitronu a elektrónu umožňuje skúmať rôzne vlastnosti daného prostredia. Rádioaktívny žiarič  $\beta^+$  emituje pozitron, ktorý následne vstupuje do hmotného prostredia, kde postupnými zrážkami pomerne rýchlo (niekoľko ps) spomaľuje a difunduje usporiadaným systémom atómov alebo molekúl materiálu. Pritom môže dochádzať k priamej anihilácii voľného pozitronu, alebo k interakcii s elektrónom za vzniku viazaného stavu nazývaného pozitronium (parapozitronium pPs alebo ortopozitronium oPs). Tieto stavy sa líšia dobami života - v prípade pPs a priamej anihilácie sú to stovky ps a v prípade oPs v dôsledku pick-off procesu sú to rádovo ns v závislosti od veľkosti voľných objemov v látke. Doba života pozitronu  $\tau$  predstavuje časový rozdiel medzi vznikom sprievodného  $\gamma$ -kvantu z  $\beta^+$  premeny v zdroji pri emisii pozitronu a anihilačným kvantom vyžiareným pri jeho anihilácii vo vzorke.

Prostredie v ktorom sa pozitron nachádza má veľký vplyv na jeho anihiláciu. Ak sa v materiáli nachádza nečistota alebo defekt (lokálny voľný objem), potom sa zvyšuje pravdepodobnosť výskytu pozitronu v takomto mieste - pozitron sa tu lokalizuje. Tým sa zmení aj doba života pozitronu v závislosti od lokálnej hustoty elektrónov v mieste lokalizácie, čo sa prejaví v časovom spektre anihilácie prítomnosťou ďalšej komponenty.

Pozitron v hmotnom prostredí sa môže podieľať na viacerých procesoch ktoré v konečnom dôsledku vedú k jeho zániku. Jeden z dôležitých procesov pri študovaní vlastností a štruktúry látky predstavuje anihilácia ortopozitronia (oPs) prostredníctvom pick-off procesu. V tomto procese pozitron viazaný v atóme orto-pozitronia v pevnej látke anihiluje s elektrónom prostredia s vhodne orientovaným spinom, pričom dôjde k emisii dvoch  $\gamma$  kvánt a zároveň príde k skráteniu doby života na asi 1-4 ns [1].

Z kvantovo-mechanického modelu pozitronia je možné odvodiť vzťah medzi dobou života orto-pozitronia a veľkosťou nekonečne hlbkej potenciálovej jamy s polomerom  $R$ , v ktorej sa orto-pozitronium nachádza (model Tao-Eldrup)

$$\lambda_{po} = \frac{1}{\tau_3} = 2 \cdot \left[ 1 - \frac{R}{R + \Delta} + \frac{1}{2\pi} \sin\left(\frac{2\pi R}{R + \Delta}\right) \right] \quad 1.2$$

kde  $\tau_3$  predstavuje dobu života orto-pozitronia v ns,  $\Delta$  je hrúbka elektrónovej vrstvy v potenciálovej jame. Tu predpokladáme, že časové spektrum má tri komponenty s najdlhšou dobou života od pick-off anihilácie o-Ps.

Pozitronium v kondenzovaných médiách potrebuje pre svoju existenciu dostatočne veľký voľný priestor, väčší ako je rozmer Ps. V kvapalinách medzi molekulami je prirodzený intermolekulárny prázdny objem, ale nie je statický. Problém u Ps pri stanovení veľkosti voľného objemu nastáva v tom, že dochádza k interakcii Ps s molekulami kvapaliny v mieste, kde sa vytvorilo. Ps vytvorí bublinu, voľný objem, ktorý je väčší, než prirodzený medzimolekulový priestor v kvapaline [2,3,4,5].

V spektrách anihilácie pozitronu v kvapalinách môžeme rozlíšiť minimálne tri komponenty - jednu od anihilácie pozitronu a dve pochádzajúce od anihilácie pozitronia (kratšiu od anihilácie pPs a dlhú od anihilácie oPs). Práve prostredníctvom najdlhšej tretej zložky spektra  $\tau_{oPs}$  je možné študovať mnohé fyzikálne javy (ako napr. kryštalizácia), pretože sa prejavujú v zmenách lokálneho voľného objemu a teda aj v dĺžke doby života oPs. Pri vyšších teplotách, v kvapalnom stave študovanej látky, je možné pozorovať vznik bubliny, ktorý sa prejaví veľmi dlhou komponentou v spektre dôb života. Táto dlhá komponenta sa pripisuje oPs, ktoré sa stabilizovalo v kvapaline v bubline s polomerom  $R$ , ktorý je daný rovnováhou medzi nulovou energiou pozitronia  $E_0(R)$

$$E_0(R) = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2m_{Ps} R^2} \quad 1.3$$

a energiou kvapaliny, ktorá je daná vnútorným povrchovým napätím bubliny  $\sigma$  a tlakom kvapaliny  $p$

$$E_0(R) = \frac{4}{3} \pi R^3 p + 4\pi R^2 \sigma \quad 1.4$$

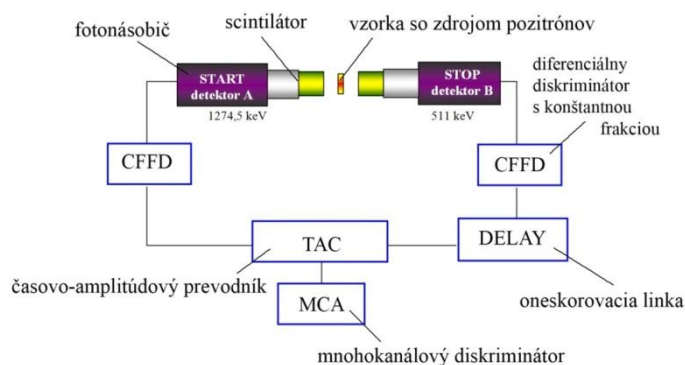
Za predpokladu modelu nekonečne hlbkej potenciálovej jamy dostaneme potom výraz definujúci veľkosť bubliny

$$R^4 = \frac{\pi \hbar^2}{16m_o} \left( \sigma + \frac{Rp}{2} \right)^{-1} \quad 1.5$$

v ktorom  $R$  je hodnota polomeru od ktorého závisí aj priemerná doba života oPs [6,7,8,9].

## 1.2 Aparatúra na meranie PALS

Technika merania PALS je založená na meraní časového intervalu medzi emisiou pozitronu zo zdroja  $^{22}\text{Na}$ , kedy sa zároveň pri emisii pozitronu vyžiari aj  $\gamma$  kvantum s energiou 1274,5 keV a ktoré sa pri meraní využíva ako signál štart. Ako signál stop sa registruje vyžiarené anihilačné kvantum s energiou 511 keV vznikajúce pri anihilácii pozitronu. Schéma spektrometra je na obr.1.



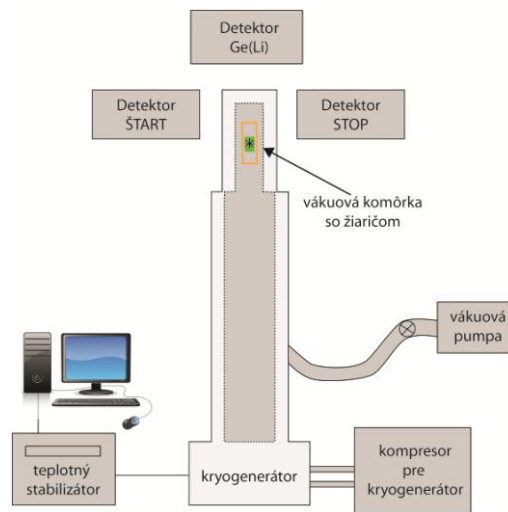
Obr. 1. Schéma aparatury na meranie dób života pozitronov [6]

Detektory sa skladajú z plastických scintilátorov alebo  $\text{BaF}_2$  kryštálov, ktoré sú opticky spojené s rýchlymi fotonásobičmi. Fotonásobiče konvertujú fotóny na analógové elektrické impulzy a tie sú ďalej spracovávané diskriminátormi s konštantnou frakciou (CFDD). Tento typ diskriminátorov produkuje časový signál z detektora, ktorý je nezávislý od amplitúdy signálu. Diskriminátory produkujú logické impulzy z rýchlych signálov z anódy fotonásobiča, ktoré sú ďalej vedené na vstup časovo-amplitúdového konvertora (TAC Canberra 2145). V stop vetve je pripojené ešte dodatočné oneskorovacie zariadenie (DELAY Polon 1506) aby konvertor pracoval v optimálnom časovom režime a na určenie časovej kalibrácie meracieho systému. TAC premieňa časový rozdiel medzi registráciou štartovacieho a anihilačného kvanta na amplitúdu výstupného signálu. Výstup z TAC sa potom uloží do pamäti mnohokanálového analyzátoru (MCA Adcam Analyst EG&G Ortec).

## 1.3 Princíp merania PALS

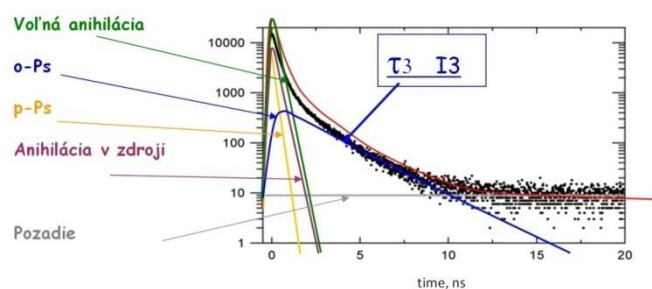
Vzorka s materiálom a zdrojom žiarenia je umiestnená do vákuovej komory, v ktorej je prostredníctvom medeného nosiča sprostredkovaný tepelný kontakt s chladiacim okruhom héliového kryogenerátora. Kryogenerátor umožňuje merania v širokom teplotnom intervale 14-335 K. Merania sa robia v niekoľkých teplotných režimoch. Vzorka sa najprv rýchlo schladí z izbovej teploty (300 K) na 20 K s priemernou rýchlosťou chladenia 2,5 K/min. Následne sa začne vzorka ohrievať zvyšovaním teploty s teplotným krokom 5-20 K, pričom sa postupne premeriava celý teplotný interval 14-335 K. Potom sa pokračuje cyklom pomalého chladenia, kde sa z teploty 300 K postupuje s určitým teplotným krokom až k teplote 14 K. V týchto teplotných režimoch sa sledujú teplotné závislosti zmeny doby života ortopozitronia, pomocou ktorých dokážeme charakterizovať veľkosť priestorov, v ktorých pozitronium anihiluje (pick-off proces). Z nameraných dát máme možnosť určiť vlastnosti elektrónov s ktorými pozitron interaguje v rôznych časoch svojej existencie a tiež vidieť proces, v ktorom sa pozitron (resp. pozitronium) zúčastňuje od vzniku až po okamih anihilácie. Schéma elektrického zapojenia aparatury pre meranie doby života je na obr.2. V schéme celkového usporiadania detektorov a kryoaparatury je zakreslené aj chladenie vzorky, ktoré je zabezpečené kryogenerátorom JANIS

CCS-450. Kryogenerátor umožňuje merania v teplotnom rozsahu 12-500 K. Jeho činnosť je založená na expanzii plynného hélia v uzavretom okruhu [10]. Riadenie a kontrola teplotných cyklov je zabezpečené teplotným stabilizátorom LAKE SHORE Cryotonics 331 s teplotnou stabilitou 0,2 K, ktorý je ovládaný pomocou PC.



Obr. 2. Schéma elektrického zapojenia aparatury pre meranie doby života

Spektrá dôb života pozitronov sa spracúvajú numerickou analýzou, ktorá umožňuje určiť hodnoty dôb života pozitronia  $\tau_j$  a intenzity tvorby pozitronia  $I_j$ . Tieto hodnoty prispievajú k výslednému spektru. V prípade, že sa v skúmanom materiáli tvorí pozitronium, potom v spektre dôb života sa vytvoria aspoň tri rozlíšiteľné komponenty priemernej doby života. Najdlhší časový interval doby života v póroch je od cca 0,7 do 100 ns a zodpovedá komponente o-Ps. Najkratšia priemerná doba života sa vzťahuje k p-Ps a je okolo 125 ps. Pomer intenzít týchto dvoch zložiek je 3:1. Ďalšia zložka spektra, kde sa hodnoty dôb života pohybujú okolo 300-400 ps pochádza od anihilácie voľných alebo zachytených pozitronov. Vzhľadom k typu a vlastnostiam skúmanej látky môžu byť v spektre prítomné aj ďalšie odlišiteľné komponenty (obr.3).



Obr. 3. Výsledné spektrum dôb života pozitronov

## 2. DOSIAHNUTÉ VÝSLEDKY DIZERTAČNEJ PRÁCE

Na základe predpokladu, že pozitronium sa lokalizuje do diery v štruktúre tuhej látky a pomocou poloempirického vzťahu

$$\tau_{pick-off} = (\lambda_0 P)^{-1} = 0,5 \cdot \left[ \frac{\Delta R}{R + \Delta R} - \frac{1}{2\pi} \sin\left(2\pi \frac{\Delta R}{R + \Delta R}\right) \right]^{-1} \quad 2.1$$

je možná korelácia pravdepodobnosti pick-off anihilácie ortopozitronia s polomerom diery, v ktorej anihilácia nastáva [2,3]. Tento vzťah medzi dobou života ortopozitronia a veľkosťou diery poskytuje jedinečnú možnosť robiť priame merania veľkosti lokálneho voľného objemu tuhej látky a najmä jej zmeny v závislosti na teplote. Vo vzorke vody, DMSO a ich zmesi v rôznych koncentráciách sa zmerala teplotná závislosť doby života ortopozitronia  $\tau_{ops}(T)$  a intenzity tvorby pozitronia  $I_{ps}(T)$ .

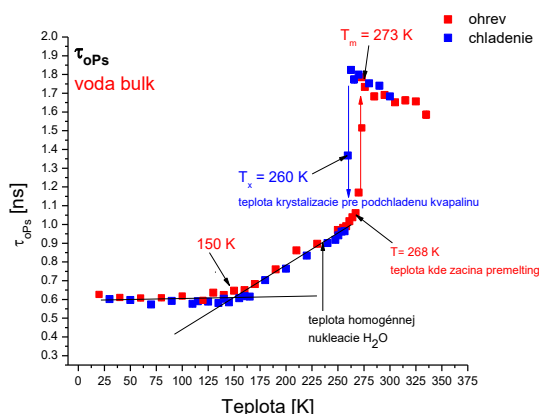
### 2.1 VODA

#### 2.1.1 VODA - doby života $\tau_{ops}$

**OBJEMOVÝ STAV: Doby života  $\tau_{ops}$**  (obr.4a): Merali sa anihilačné charakteristiky a skúmali sa fázové prechody v procesoch chladenia a ohrevu vody, ktoré vykazujú zjavnú kinetickú závislosť. Pre oblasť nízkych teplôt 20-150 K je  $\tau_3$  prakticky konštantná (okolo 0,61 ns). S rastúcou teplotou sa začínajú voľné objemy  $V_h$  zväčšovať. Nárast  $V_h$  v oblasti 150-268 K sa vysvetľuje záchytným oPs v teplotne-kreovaných defektoch v kryštalickej štruktúre ľadu, hlavne vakancii [11]. Nad teplotou okolo 268 K pozorujeme ešte väčší nárast  $V_h$  tesne pred  $T_m$ , pričom procesy tu prebiehajúce nie sú ešte celkom objasnené (premelting procesy). Tieto ale nie sú totožné s procesmi popísanými v správaní sa  $V_h$  v  $T_m$ . Prudký nárast voľných objemov pozorujeme pri teplote topenia kryštalickej fázy  $T_m = 273$  K. Nad touto teplotou s ďalším ohrievaním systému veľkosť voľných objemov (Ps bubliny) klesá [11]. V ľade v rozsahu teploty 1 K pod  $T_m$  sa nachádzajú miesta, v ktorých sa môže vytvárať v dôsledku lokálneho prehriatia vplyvom blobu (dodanej energie od pozitronu, ktorý vytvorí blob) tzv. blobová kvapka, čiže kvapalná voda, ktorá má väčšiu hustotu než okolitý ľad, čo spôsobí vygenerovanie malého voľného objemu v oblasti blobu. Pri tomto procese dochádza k rozštiepeniu ortopozitronovej komponenty, pričom jedna komponenta má vyššie hodnoty, spôsobené dodatočným voľným objemom vygenerovanej lokálne prehriatej kvapaliny a druhá komponenta zodpovedá dobe života ortopozitronia vo vode [12,13]. Tento efekt môže byť zodpovedný za pozorované maximálne hodnoty dôb života na rozhraní fázových prechodov v cykle ohrevu aj v cykle chladenia [14,15]. V cykle pomalého chladenia vzorky sa teplota znižovala až na 28 K, pričom voda podliehala podchladeniu. V stave podchladenej kvapaliny voda prechádza z kvapalnej fázy do viac usporiadaného stavu. Tento prechod je sprevádzaný poklesom dôb života oPs a nárastom intenzity tvorby  $I_{ps}$ , pretože dochádza ku kryštalizácii v objeme vzorky. Voda sa pod teplotou  $T_m$  vo väčšine prípadov stáva podchladenou a kryštalizuje v závislosti od množstva kryštalizačných jadier. Čím viac jadier je prítomných, tým

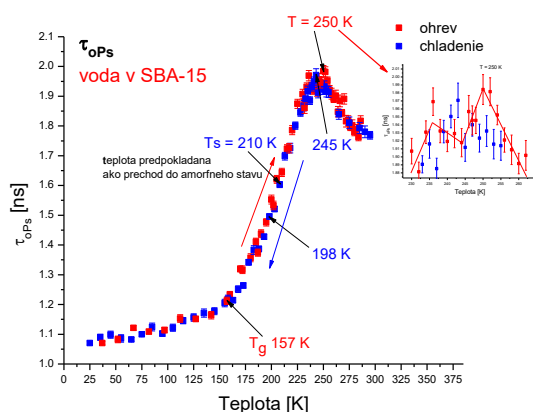


skôr voda skryštalizuje - to znamená že kryštalizuje pri vyššej teplote. Čistá voda môže zostať v podchladenom stave až po teplotu homogénnej nukleácie 235 K [16].



Obr. 4a) Teplotná závislosť dôb života oPs vo vode v bulkovom stave.

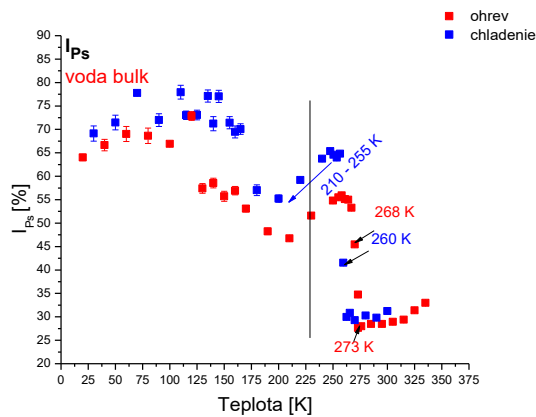
**UVÄZNENÝ STAV: Doby života  $\tau_{ops}$  (4b):** Ohrevom z nízkej teploty je viditeľný mierny nárast dôb života oPs v tuhom stave až po teplotu 157 K, kedy dochádza k väčšiemu nárastu voľných objemov. Tento bod môžeme považovať za fázový prechod  $T_g$  do sklovitého stavu. Pod bodom  $T_g$  sa systém nachádza v tuhom stave prejavujúc sa zmenšovaním voľných objemov. Časť látky nad  $T_g$  je podchladená kvapalina vo vysoko viskóznom stave a malá časť pravdepodobne v kryštalickom stave, nakoľko sa prejavuje zmena (nárast) v dobách života malým skokom pri teplote  $T=250$  K. Tento bod charakterizuje roztopenie systému a nad ním sa uväznená látka nachádza v klasickom kvapalnom stave. Bod roztopenia systému uväznenej vody je posunutý nižšie o 23 K oproti objemovej vode. Krivka dôb života jednoznačne ukazuje na zmenšovanie sa voľných objemov pri znižujúcej sa teplote v procese chladenia, pričom efekt kryštalizácie je nevýrazný, skôr ide o prejav amorfnej štruktúry.



Obr. 4b) Teplotná závislosť dôb života  $\tau_{ops}$  vo vode v uväznenom stave v SBA-15.

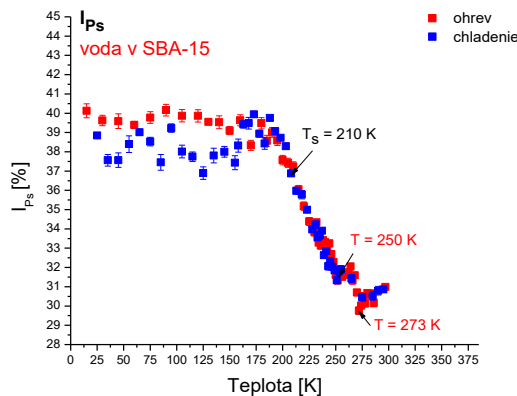
## 2.1.2 VODA - intenzita tvorby Ps $I_{Ps}$

**OBJEMOVÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.5a): Komplexná intenzita vykazuje výraznú zmenu v cykle ohrevu pri topení vzorky v okolí bodu kryštalizácie 268 K a taktiež v okolí  $T_m=273$  K. Tvorba pozitronia v oblasti  $T_m$  je na úrovni 27% a dosahuje minimum, ktoré sa dá vysvetliť prítomnosťou väčšieho počtu silne tetrahedrálne viazaných molekúl vody, ktoré sa viažu vodíkovými väzbami a ďalších vodných klastrov. Populácia týchto klastrov narastá s poklesom teploty. Okrem toho sa zistila odchýlka od správania sa extrapolovaného povrchového napätia pod hodnotou teploty nukleácie vody 235 K [17]. Takéto javy môžu niesť zodpovednosť za zníženie tvorby Ps (komplexnej intenzity získanej z LT programu) pri poklese teploty v cykle chladenia v teplotnom rozhraní 255-210 K.



Obr. 5a) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  vo vode v objemovom stave.

**UVÄZNENÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (5b): Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps v uväznenom stave sa prejavuje miernou hysteréziou pri nízkych teplotách, ktorá súvisí s históriou meracích cyklov. Intenzita tvorby Ps nad cca 190 K s teplotou klesá až k bodu  $T=273$  K, ktorý predstavuje najnižšiu hodnotu intenzity tvorby Ps, len na úrovni 30%.

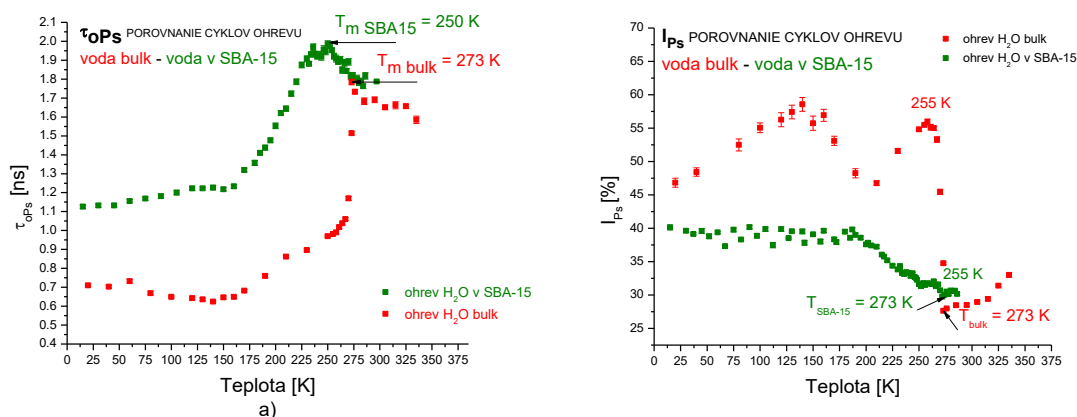


Obr. 5b) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  vo vode v uväznenom stave v SBA-15.

## 2.1.3 POROVNANIE HODNÔT cyklov ohrevu

### doby života $\tau_{ops}$ a intenzity tvorby Ps $I_{Ps}$ vo vode v bulku a v uväznenom stave

Porovnaním výsledkov správania sa objemovej a uväznenej vody v cykle ohrevu sa ukazuje, že usporiadanie molekúl je v týchto dvoch systémoch odlišné (obr.6a,b). Vlastnosti objemovej vody závisia od afinity medzi susednými molekulami, čo má za následok vytváranie siete vodíkových väzieb. Následkom uväznenia môže nastať narušenie vodíkovej konfigurácie v dôsledku blízkosti rozhrania. Štruktúra a dynamika molekúl vody v matrici sú ovplyvňované koeficientom plnenia, veľkosťou a geometriou póru a taktiež interakčnými silami na jeho povrchu.



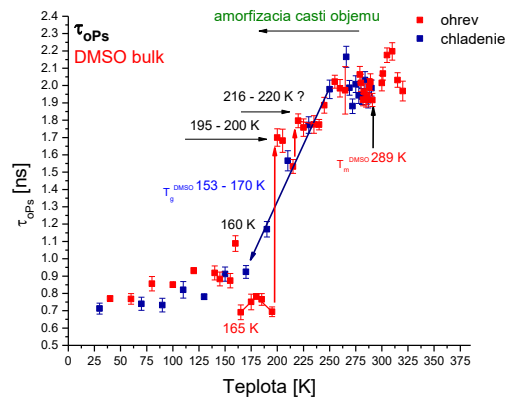
Obr. 6 Porovnanie teplotnej závislosti dôb života  $\tau_{ops}$  (a) a intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  (b) s v cykle ohrevu v bulku a v uväznenom stave.

## 2.2 DMSO

### 2.2.1 DMSO - doby života $\tau_{ops}$

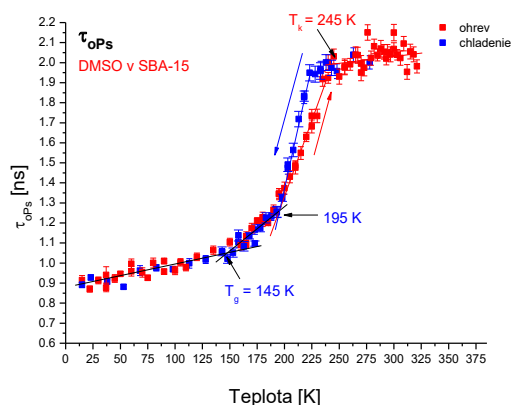
**OBJEMOVÝ STAV: Doby života  $\tau_{ops}$**  (obr.7a): Vzorka bola schladená z izbovej teploty na 20 K, rýchlosť chladenia zabezpečil prechod z kvapalného do sklovitého stavu a zabránilo sa tak kryštalizácii. Vyhodnotením spektier sme pre veľmi nízke teploty dostali doby života  $\tau_{ops}$ , ktoré konvergujú k hodnote 0,75 ns, pričom sa voľné objemy mierne zväčšujú s narastajúcou teplotou. Tento stav zodpovedá tuhej sklovitej fáze. Sklovitý stav pozorujeme v teplotnom rozhraní 20-155 K, teplotu 155 K môžeme považovať za spodnú hranicu  $T_g$ . Pri ohrievaní nad 160 K došlo k výraznej zmene voľných objemov ktorá môže indikovať zmenšenie medzimolekulových priestorov. „Jama“ začínajúca okolí bodu 165 K počas ohrevu predstavuje rozrušenie pôvodnej amorfnej štruktúry v okolí tejto teploty. Počas ohrievania nastala zmena štruktúry látky a došlo k jej tesnejšiemu usporiadaniu, voľný objem sa zmenšil. Pri teplote 195 K sa začala štruktúra znovu preusporiadať, čo sa prejavilo expanziou veľkosti voľného objemu. V teplotnom rozmedzí 165-195 K bola teda štruktúra látky tesnejšie preusporiadaná, minimálne jej časť, pričom zbytok mohol zostať amorfný. Nad hodnotou 200 K došlo k prudkému nárastu veľkosti voľných objemov so zvyšujúcou sa teplotou. Aj skokové zmeny nad 200 K by mohli byť postupnými prechodmi vo viacstavovej podchladenej fáze, kedy najprv dochádza k čiastočnému roztopeniu (195-200 K) a ďalším ohrevom sa začínajú topiť ďalšie domény pravdepodobne typu klastrov (nad 200 K). Amorfný stav zostáva dominantný. Vysoké hodnoty voľných objemov nad 200 K a „jama“ naznačujú fakt, že aj po rozotpení tesnej štruktúry sa systém správa prevažne amorfne a jeho čiastkové štruktúry sa topia v jednotlivých krokoch. Na krivke je možné pozorovať ďalší nárast voľných objemov pri teplote  $T_m=289$  K, čo

pripisujeme finálnemu roztopeniu kryštalickej fázy, ktorej je málo. Pri chladení je viditeľná závislosť zmeny voľných objemov s klesajúcou teplotou, čo je typickou vlastnosťou amorfných látok. Teplotu dynamického prechodu podchladenej kvapaliny na sklovitú štruktúru zaznamenávame ako prechod  $T_g=165\pm 15$  K a v rozhraní teplôt 165-200 K sa prejavuje expanzia a kontrakcia mikroštruktúralneho voľného objemu. Použitá kaptónová fólia má veľmi malé póry a hladký povrch, čo pravdepodobne znemožňuje tvorbu kryštalizačných jadier a preto je DMSO dobre amorfné. DMSO v objeme má však veľmi komplikovanú štruktúru, čomu zodpovedajú aj naše experimentálne výsledky. Momenálne nevieme ohodnotiť presný podiel amorfnej a kryštalickej fázy v procesoch ohrevu a chladenia.



Obr. 7a) Teplotná závislosť dôb života oPs v DMSO v bulkovom stave

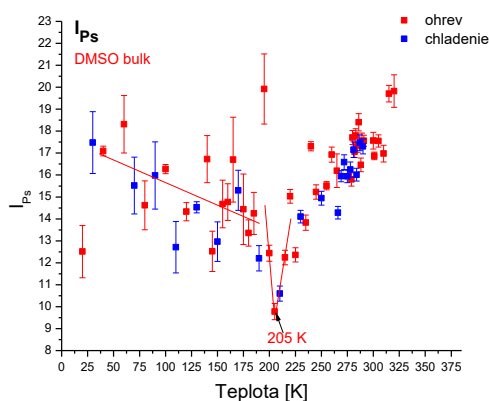
**UVÄZNENY STAV: Doby života  $\tau_{ops}$**  (obr. 7b): Teplotná závislosť dôb života ortopozitronia DMSO v matrici SBA-15 má špecifický priebeh. Je tu vidieť dvojestupňový prechod do sklovitého stavu a výrazná hysterezia v teplotnom intervale (190-240 K) medzi cyklami ohrevu a chladenia v podchladenom stave meranej vzorky. V bode  $T=245$  K nevidieť výraznejšie zmeny v dobách života. Z toho sa dá predpokladať, že v mezopóroch matrice je prítomná amorfná fáza DMSO.



Obr. 7b) Teplotná závislosť dôb života oPs v DMSO v uväznenom stave v SBA-15.

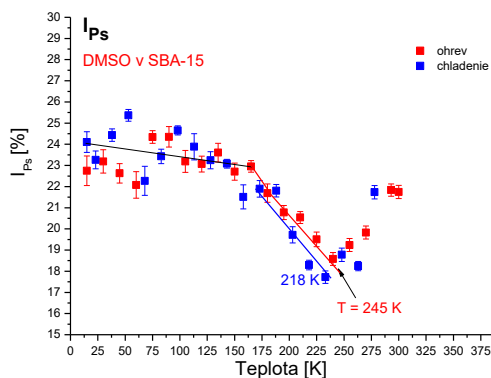
## 2.2.2 DMSO - intenzita tvorby Ps $I_{Ps}$

**OBJEMOVÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.8a): Teplotná závislosť tvorby Ps je zobrazená na obr. 8a. Nie sú tu dobre rozlíšiteľné oblasti jednotlivých štruktúr, avšak je rozpoznateľný rozdiel v tvorbe Ps v tuhom sklovitom stave oproti štruktúre pri vyšších teplotách, kde je prítomné minimum v okolí 205 K. Toto minimum sa vyznačuje najnižšou intenzitou tvorby Ps, len na úrovni 10% [18].



Obr. 8a) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v DMSO v objemovom stave.

**UVÄZNENÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.8b): Na grafe intenzity tvorby Ps v závislosti na teplote sa dajú rozlíšiť oblasti prechodu jednotlivých fáz. Samotná štruktúra systému je viac usporiadaná ako v objemovom stave. V metastabilnom stave  $I_{Ps}$  s teplotou klesá. Pík minima tvorby Ps je posunutý k vyšším teplotám (okolo 245 K) oproti objemovému stavu (okolo 205 K). Po roztopení vzorky môžeme vidieť mierny nárast intenzity tvorby Ps v kvapaline.

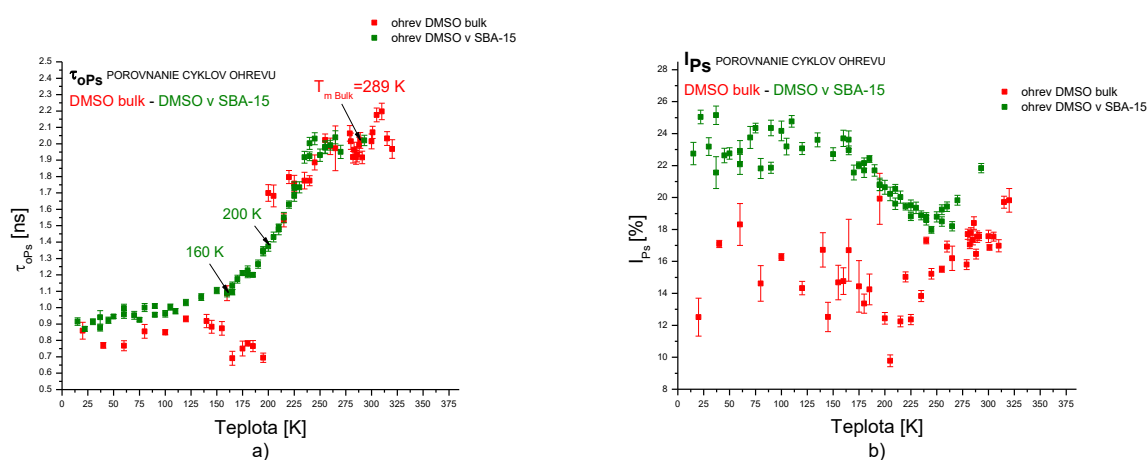


Obr. 8b) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v DMSO v uväznenom stave v SBA-15.

## 2.2.3 POROVNANIE HODNÔT cyklov ohrevu

### dooby života $\tau_{ops}$ a intenzity tvorby Ps $I_{Ps}$ v DMSO v bulku a v uväznenom stave

Porovnaním cyklov ohrevu v teplotných závislostiach dôb života oPs a intenzity tvorby Ps medzi systémami objemovej a uväznenej kryoprotektívnej látky DMSO vidíme rozdiely v ich správaní (obr.9a, b). Je to predovšetkým v potlačení kryštalizácie alebo inej formy minimalizovania voľného objemu (preusporiadanie klastrov) nad  $T_g$  pre uväznený systém (cca nad 160 K) a jeho topenia okolo 200 K. V uväznenom systéme tieto teploty predstavujú zmeny v expanzii voľného objemu. Za týmto javom sa môže skrývať iný typ dynamiky molekúl, než aký je v objemovej fáze. Nižšia hodnota dôb života (resp. voľného objemu) pre objemovú vzorku by mohla naznačiť, že časť objemu je tesnejšie usporiadaná, a teda obsahuje aj kryštalickú fázu, čo potvrdzuje už vyššie spomenutá prítomnosť skokovej zmeny doby života nad tabuľkovou hodnotou  $T_m$  pre DMSO.

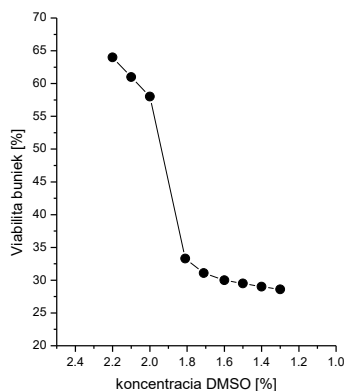


Obr. 9 Porovnanie teplotnej závislosti dôb života  $\tau_{oP}$  (a) a intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  (b) s v cykle ohrevu v bulku a v uväznenom stave.

## 2.3 BINÁRNA ZMES DMSO-VODA

DMSO patrí medzi intracelulárne kryoprotektíva, ktoré sa využívajú pri zmrazovaní buniek. Kryoprotektívum prenikne do bunky a nahradí vnútrobunkovú vodu. Znižuje bod tuhnutia a zväčšuje podiel nezmrzenej kvapaliny aj pri nízkych teplotách pod bodom tuhnutia. [19,20].

DMSO je potrebné použiť v takej koncentrácii, aby si ešte zachovával svoje kryoprotektívne účinky, avšak nesmie byť použitý v príliš vysokých koncentráciách, nakoľko má negatívne účinky na živý systém. Štandardne sa využíva 10% roztok, avšak je tendencia výrazne znižovať túto koncentráciu. Ján Lakota sa zaoberal experimentami, kde sledoval viabilitu kmeňových buniek pri kryokonzervácii v závislosti od použitej koncentrácie DMSO. Z výsledkov zistil, že DMSO si zachováva svoje kryoprotektívne účinky až po hranicu koncentrácie 2,0% [21] v zmesi s vodou. Na grafe viability buniek závislej od koncentrácie DMSO (obr.10) je viditeľná výrazná skoková zmena v počte buniek, ktoré už neprežili kryokonzerváciu pri koncentrácii 1,8% DMSO, pretože sa tu strácajú kryoprotektívne účinky [21,22]. Cieľom je zistiť, aký fyzikálny mechanizmus je zodpovedný za kryoprotektívny efekt a prečo je rozdiel medzi 2,0% a 1,8% roztokom taký zásadný.



**Obr. 10** Graf viability kmeňových buniek pri kryokonzervácii v závislosti od použitej koncentrácie DMSO [Zdroj: Ján Lakota]

Podľa výsledkov z našich experimentov sa ukazuje, že existuje súvislosť medzi kryoprotektívnymi účinkami DMSO a správaním sa lokálneho voľného objemu pri nízkych teplotách v sledovaných roztokoch [23]. Rozdielová plocha medzi krivkami chladenia a ohrevu, ktorá sa prejavila v teplotnom intervale 140-260 K, predstavuje hysteréziu úmernú kryoprotektívnemu efektu u skúmaných zmesí. Taktiež sa ukázal vplyv štruktúrnych prechodov v DMSO v rozhraní teplôt 165-200 K, pričom je viditeľné, že kryoprotektívny vplyv sa prenáša aj na vodu v miere zodpovedajúcej koncentrácii kryoprotektíva.

V štádiu tuhnutia a topenia sme sa zamerali na precíznejšie spoznanie ich priebehu pomocou voľnoobjemového pohľadu vo vybraných kryoprotektívnych zmesiach DMSO-voda (10% - kryoprotektívny štandard, 2% - hraničná koncentrácia pre uchovávanie buniek, 1,8% - výrazný pokles kryoprotektívnych účinkov).

## 2.4 Zmes DMSO-voda v nízkych koncentráciách

### 2.4.1 Zmes 10% DMSO-voda

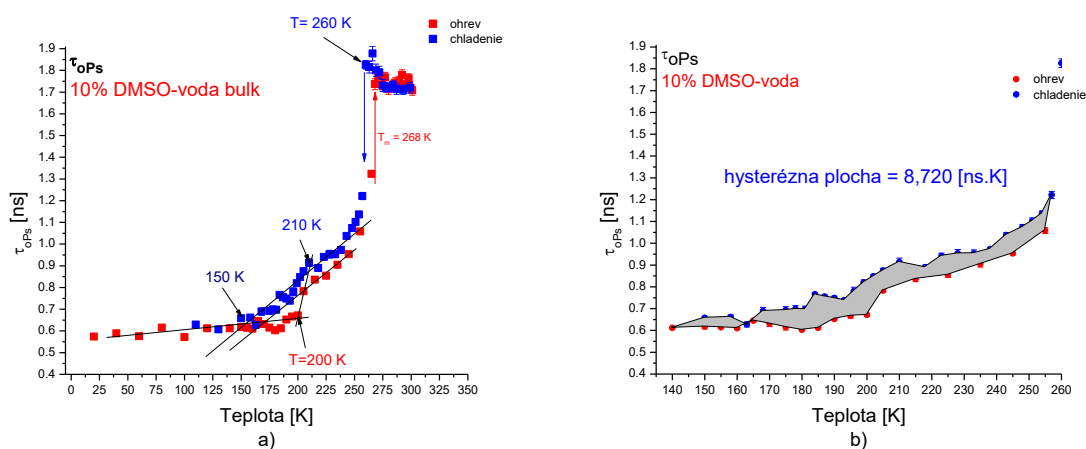
#### 2.4.1.1 - 10%DMSO-voda - doby života $\tau_{ops}$

**OBJEMOVÝ STAV: Doby života  $\tau_{ops}$**  (obr. 11a): Na rozdiel od čistej vody, táto zmes vykazovala rozdiel v cykloch ohrevu a chladenia (hysterézia-obr.11b) aj v oblasti teplôt 140-260 K a je tu možná súvislosť medzi veľkosťou hysterézie a hodnotou viability buniek u skúmaných zmesí [21]. Veľkosť rozdielovej hysteréznej plochy je však možné ovplyvňovať rýchlosťou ohrevu. Môžeme ju ale považovať za mieru straty amorfnej fázy a korelovať ju s kryoprotektívnym účinkom DMSO v danej koncentrácii. Práve v 10% koncentrácii zmesi DMSO-voda sú viditeľné najväčšie rozdiely medzi krivkami chladenia a ohrevu, čo predstavuje najväčší podiel amorfnej fázy na začiatku pri chladení vzorky. Efekt tesnejšieho upakovania štruktúry (kryštalizácie) pri ohrievaní, podobne ako u čistého DMSO je však z hľadiska kryokonzervácie nežiaduci a preto sa pre biologické účely proces pomalého ohrevu nevyužíva.

Doba života ortopozitrónia je úmerná priemernej veľkosti voľného objemu a poklesom teploty dochádza k jeho relatívnemu zmenšovaniu. Hysterézne správanie sa voľných objemov bolo pozorované výraznejšie nad 165 K, nakoľko bol lokálny voľný objem tesnejšie usporiadaný pretože sa pravdepodobne zvýšil podiel kryštalických

domén. Kryštalizácia v tejto zmesi nastala v dôsledku zvyšujúcej sa teploty systému - tzv. rekryštalizáciou. K tesnejšiemu usporiadaniu v systéme dochádza práve v teplotnej oblasti 165-200 K vplyvom pridanej kryoprotektívnej látky DMSO, pričom dochádza k strate amorfnej frakcie, ktorá bola prítomná počas rýchleho chladenia (vyššie hodnoty voľného objemu v cykle pomalého chladenia to tiež naznačujú). U čistej vody v tejto teplotnej oblasti sa žiadna hysterezia nepozorovala a u nej predpokladáme tiež kryštalický stav. Pri sledovaní vplyvu kryoprotektívnej látky na vlastnosti vody vidíme aj posuv v teplote topenia k nižším hodnotám,  $T_m=268\text{K}$ . Nad touto teplotou je systém už kvapalný.

V procese chladenia je pravdepodobné, že pod bodom  $T=260\text{K}$  nastáva zmena štruktúry látky a to dominantná kryštalizácia (ukazuje to prudká zmena doby života oPs, resp. lokálneho voľného objemu) a v menšej miere vzniká aj amorfna fáza. To potvrdzujú vyššie hodnoty voľného objemu v krivke chladenia, čo znamená menej usporiadaný systém.



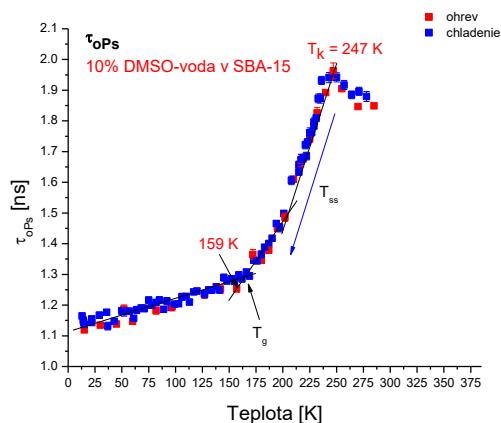
Obr. 12a) Teplotná závislosť dôb života  $\tau_{oPs}$  v zmesi 10% DMSO-voda v objemovom stave, b) Hysterézná plocha medzi cyklom ohrevu a chladenia v zmesi 10% DMSO-voda

**UVÄZNENÝ STAV: Doby života  $\tau_{ops}$**  (obr.11c): Po prudkom schladení vzorky na 14 K sa začalo s cyklom pomalého ohrevu až na izbovú teplotu. Pri ohrievaní z nízkej teploty je vidieť mierny nárast voľných objemov v tuhom stave až po teplotu v okolí bodu  $T=159\text{K}$ , kedy dochádza k zväčšeniu nárastu  $\tau_{oPs}$ . Kryštalizačný efekt (ostrý pokles doby života) v tejto štruktúre nie je badateľný, preto predpokladáme prítomnosť amorfnej štruktúry.

Amorfna štruktúra vzniká pri znižovaní teploty ako dôsledok prudkého chladenia alebo uväznenia v malých nanometrových póroch systému, ale taktiež môže byť prejavom kryoprotektívneho účinku DMSO. Bod prechodu do plató  $T_k=247\text{K}$  je posunutý k nižšej teplote (o 21 K) oproti  $T_m$  v bulkovom stave, ktorý charakterizuje prechod do kvapalného stavu s nízkou viskozitou. Závislosť nad touto teplotou je podobná čistej vode.

V cykle chladenia vzorky sa teplota znižovala z 280 K až na 12 K a zmes pritom podliehala podchladeniu. V stave podchladenej kvapaliny štruktúra prechádzala do sklovitého stavu, čo sa prejavilo poklesom dôb života oPs a zmenou smernice teplotnej závislosti v  $T_g$ . Uväznená zmes DMSO s vodou v matici SBA-15 vykazovala náznak rovnakej amorfnej štruktúry v procese ohrevu aj chladenia.

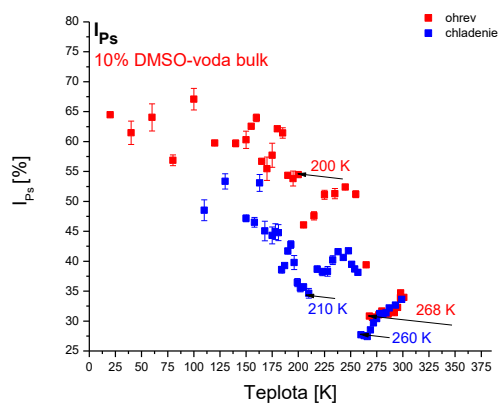




Obr.11c) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 10% DMSO-voda v objemovom stave

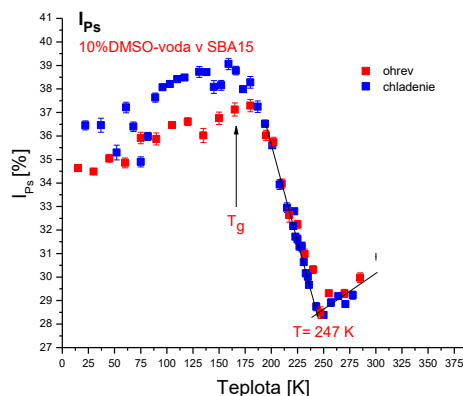
#### 2.4.1.2 - 10%DMSO-voda - intenzita tvorby Ps $I_{Ps}$

**OBJEMOVÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.12a): Závislosť intenzity tvorby pozitronia na teplote je kvalitatívne veľmi podobná čistej vode, avšak na grafe zmesi je viditeľný výrazný rozdiel medzi cyklami ohrevu a chladienia a hodnoty sú celkovo posunuté k nižšej teplote vplyvom prítomnosti DMSO.



Obr. 12a) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 10% DMSO-voda v objemovom stave.

**UVÄZNENÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.12b): Intenzita tvorby Ps má priebeh zobrazený na obr.6.19. Pri veľmi nízkych teplotách v cykle ohrevu pozorujeme mierny nárast intenzity tvorby Ps až po teplotu 159 K, kedy dosahuje hodnotu okolo 40%. Pod týmto teplotným bodom nastáva výrazná zmena, prudký pokles tvorby Ps, ktorý klesá na hodnotu 28% pri teplote  $T=247$  K. Potom nasleduje opäť mierny nárast intenzity spojený s nízkoviskóznou kvapalinou nad týmto teplotným bodom, podobne ako u kvapalnej vody. V uväznenom stave ale absentuje výrazne široké maximum v oblasti teplôt 210-247 K. V cykle chladienia sú hodnoty podobné, avšak na grafe je viditeľné hysterézne správanie sa v oblasti nízkych teplôt.

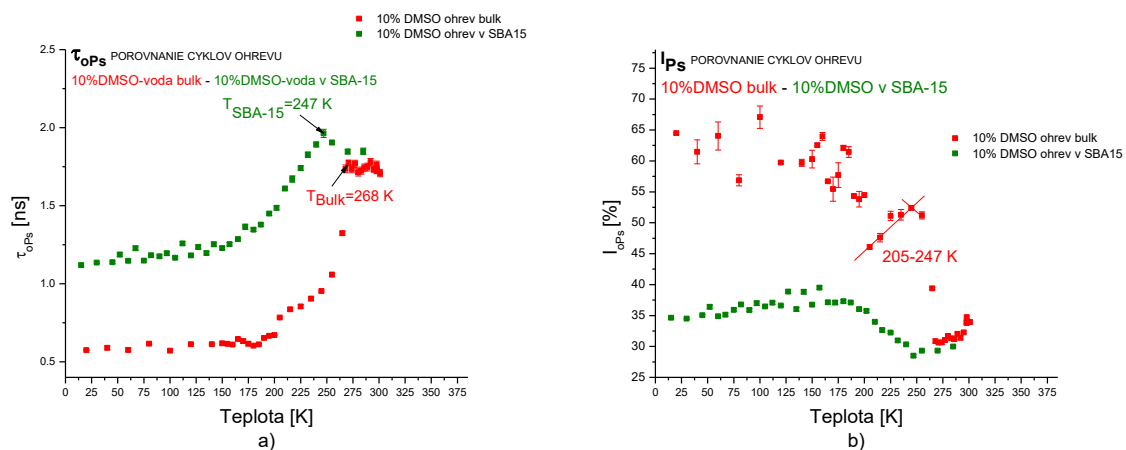


Obr. 12b) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 10% DMSO-voda v uväznenom stave v SBA-15.

### 2.4.1.3 POROVNANIE HODNÔT cyklov ohrevu v zmesi 10%DMSO-voda doby života $\tau_{oPs}$ a intenzity tvorby Ps $I_{Ps}$ v bulku a v uväznenom stave

**Doby života  $\tau_{oPs}$ :** Pri porovnávaní výsledkov správania sa objemovej a uväznenej zmesi v cykle ohrevu sa ukazuje, že teplotná závislosť doby života oPs pri nízkych teplotách má usporiadanú tuhú štruktúru, avšak v uväznenom stave nedochádza ku kryštalizácii, ale iba k amorfizácii štruktúry (obr.13a). Bod charakterizujúci prechod do kvapalného stavu je v uväznenom stave posunutý k nižšej hodnote oproti bulkovému stavu. Pod týmto bodom zaznamenávame pokles v dobách života oPs, ktorý je oveľa výraznejší v uväznenom systéme, v objeme je priebeh poklesu oveľa miernejší.

**Intenzita tvorby Ps** je oveľa nižšia v matrici SBA -15 (len na úrovni ~ 35%) oproti objemovému stavu kvôli konkurenčnej anihilácii pozitronov v skeletone matrice, pričom v objeme má intenzita oveľa zložitejší priebeh a hlavne má prítomný široký pík v oblasti cca 205-247 K (obr.13b). To by znamenalo, že tento pík je spojený s procesmi prebiehajúcimi iba v usporiadanejšej fáze (tvorba kryštálov a klastrov v podchladenej kvapaline), čo je veľmi dôležitý poznatok.



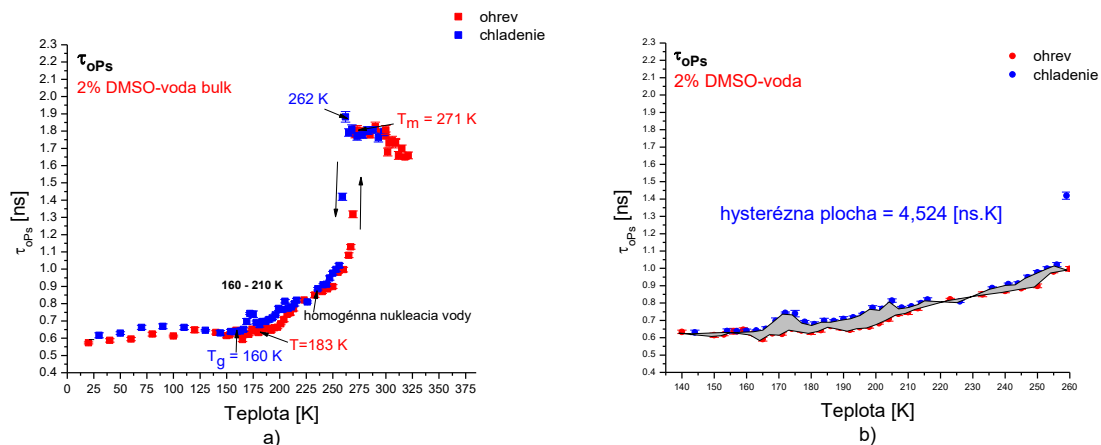
Obr.13a) Porovnanie teplotnej závislosti dôb života  $\tau_{oPs}$  v cykle ohrevu zmesi 10% DMSO-voda v bulku a v SBA-15,

b) Porovnanie teplotnej závislosti intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v cykle ohrevu zmesi 10% DMSO-voda v bulku a v SBA-15.

## 2.4.2 Zmes 2% DMSO-voda

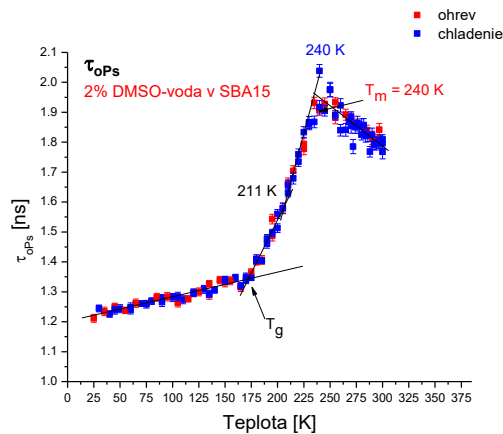
### 2.4.2.1 - 2%DMSO-voda - doby života $\tau_{oPs}$

**OBJEMOVÝ STAV: Doby života  $\tau_{oPs}$**  (obr. 14a): Pri ohreve vzorky v oblasti nízkych teplôt pozorujeme dosť podobný priebeh ako u čistej vody s miernymi odchýlkami pri teplotách nad 150 K, menšími, než u 10% DMSO. Pri teplote  $T_m=271$  K je pozorovaná prudká zmena hodnôt  $\tau_{oPs}$ , ktorú môžeme prisúdiť roztopeniu zmesi pri ohrevaní vzorky a prechod do kvapalného stavu. Teplotné merania v procese chladenia ukázali kryštalizáciu v okolí teplotného bodu 262 K (prudká zmena  $\tau_{oPs}$ , resp. voľného objemu). Postupným chladením získavame krivku chladenia a pod hranicou cca 160 K sa veľkosti voľných objemov už nemenia v dôsledku štruktúry systému nachádzajúceho sa v stabilnom stave. Stabilná a tuhá štruktúra pod touto hranicou už neovplyvňuje tvorbu klastrov a pohyby molekúl. Rozdiely v hodnotách v teplotnom rozhraní 160-210 K medzi cyklom chladenia a pomalého ohrevu sa prejavili hystereziou (ako dôsledok zmenšenia voľného objemu v dôsledku tesnejšieho upakovania štruktúry pri ohreve nad 160 K). Koncentrácia zmesi 2% DMSO-voda ešte vykazuje dosť výraznú hystereziu (obr.14b), takže je možné predpokladať že zmes obsahuje amofnú fázu, ktorá má kryoprotektívne účinky. Tieto merania sú v súlade s výsledkami experimentov Jána Lakotu, pri ktorých bolo zistené, že DMSO si zachováva svoje kryoprotektívne účinky až po hranicu koncentrácie 2,0% [21].



Obr.14a) Teplotná závislosť dôb života  $\tau_{oPs}$  v zmesi 2% DMSO-voda v objemovom stave, b) Hysterezná plocha medzi cyklami ohrevu a chladenia v zmesi 2% DMSO-voda

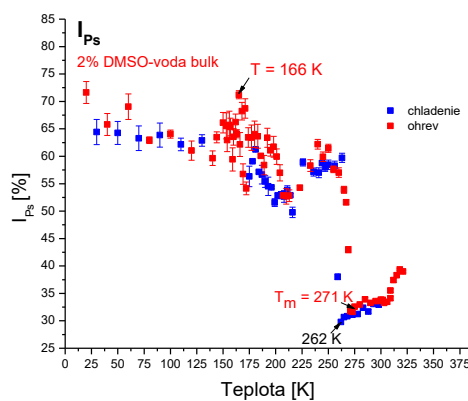
**UVÄZNENÝ STAV: Doby života  $\tau_{oPs}$**  (obr. 14c): Najprv sa vzorka schladila z izbovej teploty na teplotu 23 K a následne sa začala zahrievať. Pri nízkych teplotách do 160 K pozorujeme len mierny nárast dôb života  $\tau_{oPs}$ . Prvý výrazný zlom v teplotnej závislosti  $\tau_{oPs}$  je pri 160 K, ktorý zodpovedá teplote sklovitého prechodu. V oblasti podchladenej kvapaliny nad  $T_g$  je vidieť nárast, dokonca dvostupňový, voľných objemov s teplotou zmeny okolo 211 K až po teplotu  $T=240$  K, kedy dochádza k zastaveniu rastu. Túto teplotu možno považovať za prechod do kvapaliny s nízkou viskozitou, za touto prechodovou oblasťou nastáva pokles voľných objemov, podobne ako u čistej vody.



Obr. 14c) Teplotná závislosť tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 2% DMSO-voda v objemovom stave

#### 2.4.2.2 - 2%DMSO-voda - intenzita tvorby Ps $I_{Ps}$

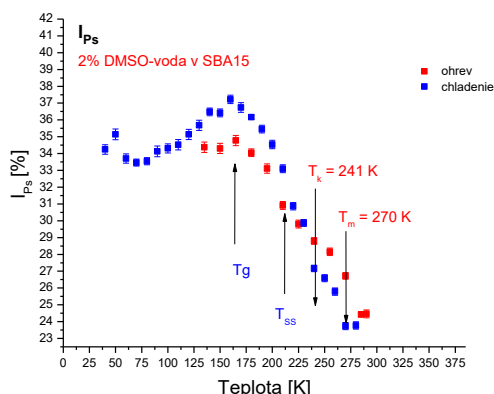
**OBJEMOVÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.15a): Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps má priebeh ukázaný na obr. 15a. Pri postupnom ohreve intenzita narastá najmä v oblasti teplotného bodu 166 K, kde dosahuje svoje maximum až okolo 70%. Ďalším ohrievaním systému nastáva pokles intenzity s ďalším lokálnym nárastom v oblasti píku 215 K -  $T_m$  a potom nasleduje oblasť prechodu z tuhej fázy do kvapalnej pri teplote  $T_m=271$  K. Tam intenzita prudko klesá až na hodnotu lokálneho minima (okolo 32%), ktoré je pozorované v cykle ohrevu. V cykle chladenia sú tieto hodnoty nižšie, intenzita tvorby Ps sa v minime pohybuje len na úrovni 29%, nakoľko kvapalina je podchladená o 9 K.



Obr. 15a) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 2% DMSO-voda v objemovom stave.

**UVÄZNENÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.15b): V oblasti nízkych teplôt pozorujeme pri ohreve nárast intenzity s teplotou, ktorý dosahuje maximum v bode  $T_g$  okolo 165 K (okolo 35%). Za týmto teplotným bodom intenzita klesá s pozorovaním jemných zmien v okolí teplôt, pri ktorých boli pozorované zmeny

v priebehu  $\tau_{oPs}(T)$ . Na obrázku 15b je viditeľný rozdiel medzi cyklom ohrevu a chladenia posúvajúci sa do oblasti  $T_g$  a nad touto teplotou.

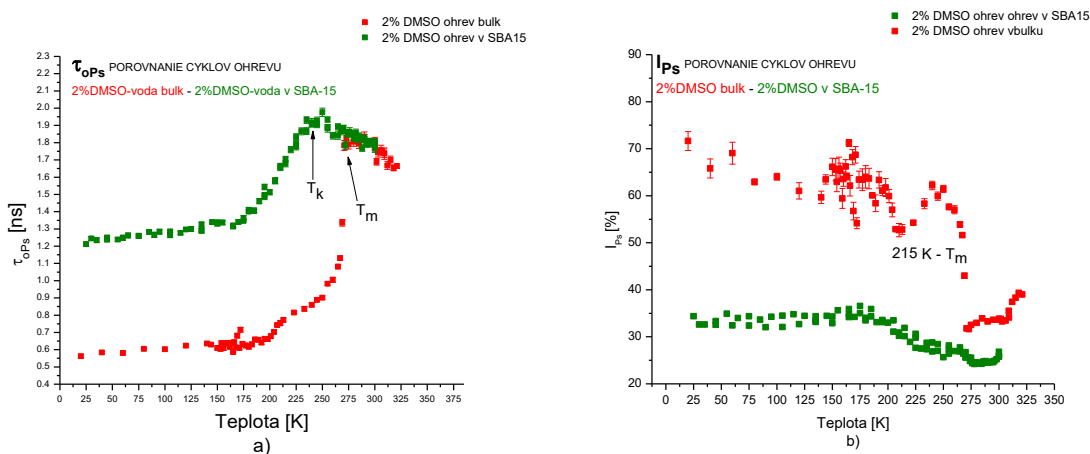


Obr. 15b) Teplotná závislosť intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 2% DMSO-voda v uväznenom stave.

### 2.4.2.3 POROVNANIE HODNÔT cyklov ohrevu v zmesi 2%DMSO-voda doby života $\tau_{ops}$ a intenzity tvorby Ps $I_{Ps}$ v bulku a v uväznenom stave

**OBJEMOVÝ STAV: Doby života  $\tau_{ops}$**  (Obr.16a ) Pri porovnávaní výsledkov správania sa objemovej a uväznenej zmesi sa ukazuje, že v bulkovom stave má systém čiastočne amorfnú štruktúru pri nízkych teplotách, ktorej podiel sa „rekryštalizovaním“ pri cykle ohrevu znižuje. Avšak v uväznenom stave nedochádza ku kryštalizácii, ale uväznená zmes je amorfná. Hysterézia medzi cyklom ohrevu a chladenia sa preukázala len v objemovom stave, v uväznenom stave sa hodnoty  $\tau_{ops}$  medzi oboma cyklami dobre reprodukovali. Bod topenia  $T_m$  charakterizujúci prechod z kryštalického do kvapalného stavu je v uväznenom stave nahradený teplotou  $T_k$ , teplotou kde dochádza u podchladenej kvapaliny k poklesu viskozity (oblasť tvorby Ps bublín) a je posunutý k nižšej teplote o 31 K oproti bulkovému stavu.

**UVÄZNENÝ STAV: Intenzita tvorby oPs** je oveľa nižšia v matrici SBA-15 (len na úrovni okolo 35%) oproti objemovému stavu (obr.16b). V objemovom stave má zložitejší priebeh pripomínajúci čistú vodu, zatiaľ čo v uväznenom stave nie je prítomný široký pík v oblasti teplôt 215 K -  $T_m$ .

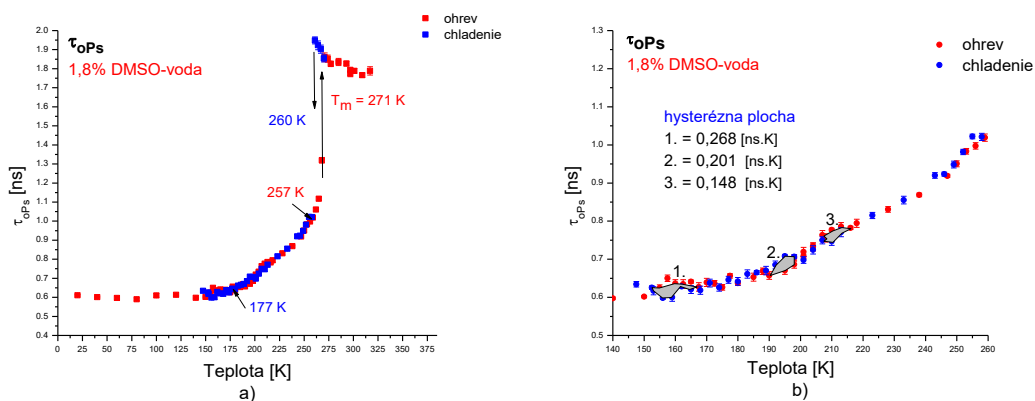


Obr. 16a) Porovnanie teplotnej závislosti dôb života v cykle ohrevu zmesi 2% DMSO-voda v bulku a v SBA-15  
 b) Porovnanie teplotnej závislosti intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v cykle ohrevu zmesi 2% DMSO-voda v objemovom stave a v SBA-15.

## 2.4.3 Zmes 1,8% DMSO-voda

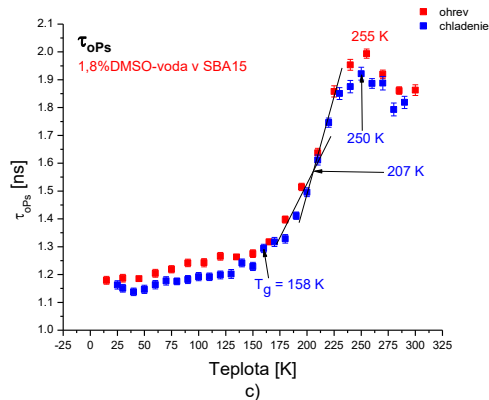
### 2.4.3.1 - 1,8%DMSO-voda - doby života $\tau_{oPs}$

**OBJEMOVÝ STAV: Doby života  $\tau_{oPs}$ :** Namerané hodnoty  $\tau_{oPs}$  a vzniknutá hysterézia sú uvedené na grafoch (obr.17a,b). V procese merania sa vzorka rýchlo schladila, na prechod do usporiadanejšej resp. čiastočne kryštalickej štruktúry bolo potrebné podchladenie pod teplotu cca 165 K, nad ktorou sa začal v oblasti 165-200 K strácať podiel amorfnej fázy pri rekryštalizácii. Dochádza tak k dodatočnej kryštalizácii v amorfných doménach. Fázový prechod topenia systému  $T_m=271$  K je posunutý len o 2 K k nižšej teplote oproti bulkovej vode, čo môžeme prisúdiť účinku DMSO. Pri chladení vzorky dochádza k podchladeniu kvapalnej zmesi a jej kryštalizácii. Toto sa prejavilo prudkým poklesom dôb života ortopozitrónia, resp. zmenšením voľných objemov pri teplote 260 K, čo je typický prejav fázového prechodu. V procese chladenia ešte dochádza k čiastočnej amorfizácii štruktúry vzorky, ale len veľmi malej prejavujúcou sa podstatne zredukovanou hysteréziou oproti zmesi s 10% a 2% koncentráciou DMSO. Táto čiastočná amorfizácia vzniká vplyvom kryoprotektívneho účinku DMSO. Medzi krivkami chladenia a ohrevu vznikli 3 malé hysterézne plochy, ktoré predstavujú minimálny rozdiel v štruktúre látky vygenerovanej pri chladení a ohreve. Preto tu predpokladáme prítomnosť len veľmi malého podielu amorfnej fázy. Práve táto malá zmena koncentrácie (0,2%) [21] je zodpovedná za podstatnú zmenu v správaní sa vzorky. V dôsledku toho zmes stráca kryoprotektívne účinky [21] a viabilita buniek pri kryokonzervácii prudko klesá (Lakota 21,22). Zostáva otázka, aké procesy sú zodpovedné za takúto výraznú zmenu v tak nízkej koncentrácii kryoprotektívnej látky, ktorá spôsobí veľké zmeny v štruktúre zmesi pri kryokonzervácii. Najpravdepodobnejšie vysvetlenie tohto javu môže byť vplyv dôležitosti teplotnej oblasti 165-200 K práve v procese ohrevu. DMSO, táto prevažne amorfizujúca látka, v zmesi s vodou vytvára pri chladení časť amorfneho objemu, (v závislosti od koncentrácie DMSO) a v inkriminovanej teplotnej oblasti podlieha preusporiadaniu štruktúry, čiastočne rekryštalizuje. Keďže pri 1,8% DMSO je rekryštalizácia minimálna, predpokladáme, že aj amorfnej fázy vzniklo pri prudkom chladení minimum.



Obr.17a) Teplotná závislosť dôb života  $\tau_{oPs}$  v zmesi 1,8% DMSO-voda v objemovom stave, b) Hysterézna plocha medzi cyklami ohrevu a chladenia v zmesi 1,8% DMSO-voda.

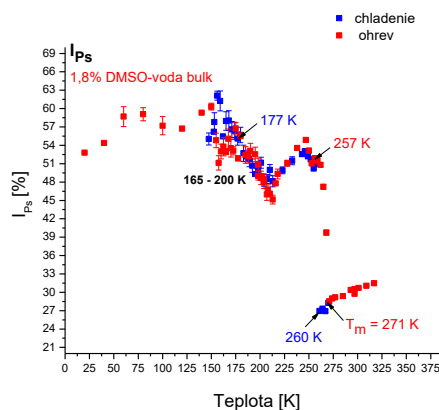
**UVÄZNENÝ STAV: Doby života  $\tau_{oPs}$**  (obr. 17c): Výsledky ukazujú hodnoty dôb života oPs, ktoré sa viac približujú k hodnotám čistej vody, preusporiadanie molekúl naznačuje lepšie usporiadanie štruktúry a menšie medzimolekulové priestory oproti koncentrácii 2% DMSO-voda v SBA-15.



Obr. 17c) Teplotná závislosť dôb života  $\tau_{oPs}$  v zmesi 1,8 % DMSO-voda v uväznenom stave v SBA-15.

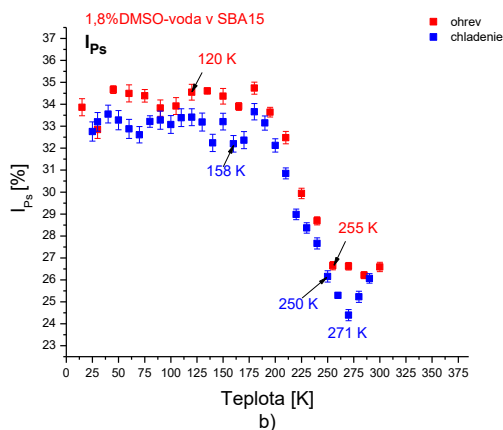
#### 2.4.3.2 - 1,8%DMSO-voda - intenzita tvorby Ps $I_{Ps}$

**OBJEMOVÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.18a): Hoci je štruktúra systému aj priebeh  $I_{Ps}(T)$  veľmi podobné objemovej vode, ešte je tu viditeľný slabý vplyv kryoprotektívnej látky. Aj keď hysterezia v nízkoteplotnej oblasti mizne, stále je vidieť posuv  $T_m$  k nižšej teplote a oproti vode je intenzita tvorby Ps nižšia.



Obr.18a) Teplotná závislosť tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 1,8 % DMSO-voda v objemovom stave

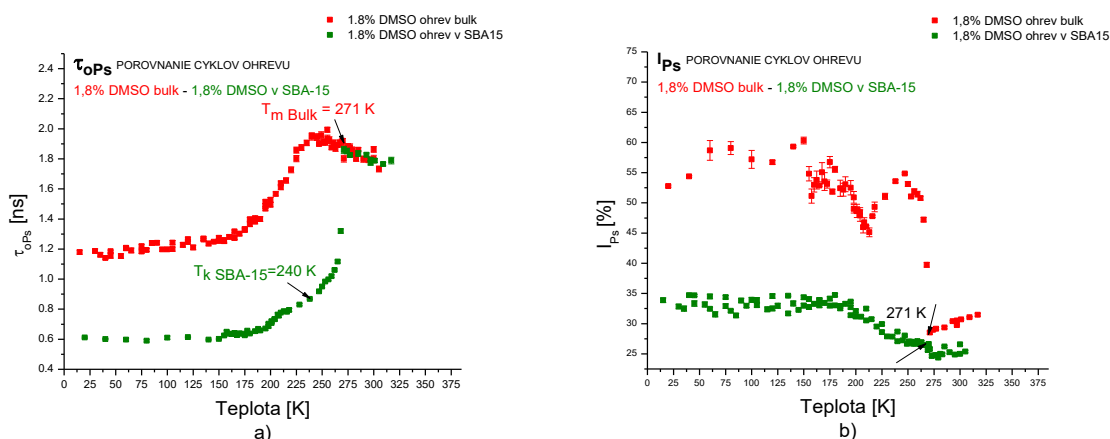
**UVÄZŇENÝ STAV: Intenzita tvorby Ps  $I_{Ps}$**  (obr.18b): Závislosť intenzity tvorby oPs na teplote môžeme rozdeliť do troch oblastí. Rozoznávame tu oblasť tuhého stavu pod teplotou 158 K. V tejto oblasti vidíme rozdiel medzi cyklom ohrevu a chladenia. Nad teplotou  $T_g$  dochádza k prudkému poklesu intenzity tvorby Ps až po teplotu 271 K, kde intenzita dosahuje svoje minimum len na úrovni okolo 26%.



Obr.18a) Teplotná závislosť tvorby Ps  $I_{Ps}$  v zmesi 1,8 % DMSO-voda v uväznením stave v SBA-15.

### 2.4.3.3 POROVNANIE HODNÔT cyklov ohrevu v zmesi 1,8%DMSO-voda doby života $\tau_{ops}$ a intenzity tvorby Ps $I_{Ps}$ v bulku a v uväznenom stave

Pri porovnávaní výsledkov správania sa objemovej a uväznenej zmesi sa ukazuje, že v objemovom stave má systém čiastočne amorfnú štruktúru pri nízkych teplotách, avšak v uväznenom stave nedochádza ku kryštalizácii, ale iba k amorfizácii štruktúry. Bod topenia  $T_m$  charakterizujúci prechod do kvapalného stavu je v uväznenom stave nahradený bodom  $T_k$  (začiatok oblasti platô) nachádzajúci sa v oblasti okolo 240 K, ich rozdiel je cca 31 K.



Obr.19a) Porovnanie teplotnej závislosti dôb života  $\tau_{ops}$  v cykle ohrevu zmesi 1,8 % DMSO-voda v bulku a v SBA-15  
 b) Porovnanie teplotnej závislosti intenzity tvorby Ps  $I_{Ps}$  v cykle ohrevu zmesi 1,8 % DMSO-voda v bulku a v SBA-15.

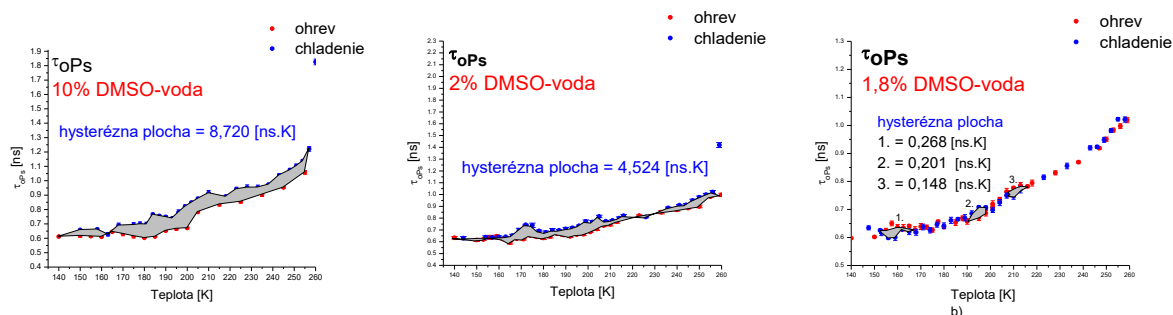


# ZÁVER

## Objemový stav

Môžeme predpokladať, že pri chladiacom procese skúmaných látok vzniká v objeme aj určitý podiel amorfnej časti, ktorý následne zväčšuje voľné objemy. Zvýšenie koncentrácie DMSO sa prejavilo aj zväčšením voľných objemov. Zmenšovanie voľných objemov sa pri znižovaní teploty neprejavuje rovnakou mierou, ale pod hranicou 205 K nastáva rýchlejšie klesanie s náznakom zložitejšieho preusporiadania štruktúry lokálneho voľného objemu v závislosti na množstve DMSO v zmesi. Je pravdepodobné, že aj pri chladení dochádza k pomalej kryštalizácii pod 200 K. Avšak v zmrazenom stave pod hodnotou 155 K by nemala nastať veľká zmena štruktúry, pretože tu nedochádza k zásadným zmenám voľných objemov a pod 140 K sa už voľné objemy prakticky nemenia. Pri ohrevaní systému z nízkych teplôt sa prejavila hysterézia, ktorá je najvýraznejšia nad 165 K. Lokálny voľný objem pri ohreve nad touto teplotou je tesnejšie usporiadaný, čo prisudzujeme zväčšenému podielu kryštalických domén. Tieto domény sa tvoria rekryštalizáciou pri zvyšovaní teploty najmä v rozmedzí teplôt 165-200 dôsledkom vplyvu DMSO premenením amorfnej časti systému. Závislosť lokálnych voľných objemov na teplote sa prejavuje ich zmenšovaním, pričom hodnoty sú nižšie ako pri chladení. Tým vzniká na grafe  $\tau_{oPs}(T)$  hysteréza rozdielová plocha, ktorú môžeme považovať za mieru straty amorfnej fázy a korelovať ju s kryoprotektívnym účinkom jednotlivých koncentrácií DMSO v zmesi (Tab.1, obr. 21a,b,c) [Lakota 21].

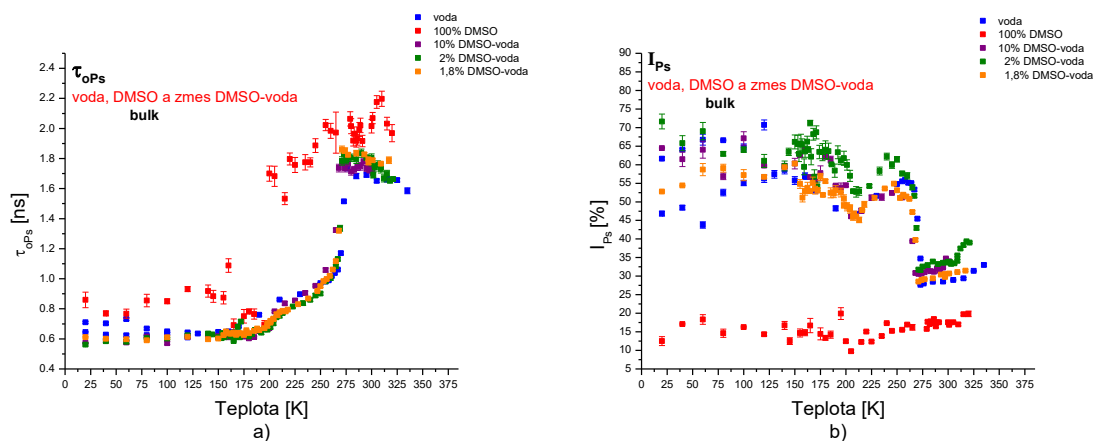
	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O+DMSO			DMSO
Koncentrácia DMSO	-	1.8%	2%	10%	100%
Hysteréza plocha $\tau_{oPs}$	-	0,617 ns.K	4,524 ns.K	8,720 ns.K	-
Viabilita buniek [Ján Lakota]	-	33 %	58 %	75 %	-



Obrázok 21) Porovnanie plôch hysterézie, ktorá vznikla v cykle chladenia a ohrevu  
a) v zmesi 10%DMSO-voda, b) v zmesi 2%DMSO-voda, c) v zmesi 1,8%DMSO-voda.

Tieto voľnoobjemové vlastnosti sledovaných zmesí ukazujú, že je nevyhnutné, aby ohrevanie vzorky bolo dostatočne rýchle, ak chceme zabezpečiť potlačenie kryštalizácie v danej teplotnej oblasti. Tým by sa vlastne simuloval efekt rýchleho rozmrazovania využívaného pri kryokonzervácii buniek. Rýchlym ohrevom zabránime tesnejšiemu usporiadaniu štruktúry a tým zabránime tvorbe kryštálikov ľadu. Tak nenastane kryštalizácia, ktorá je nežiaducim javom v zmrazovacom procese biologických materiálov. Najväčie rozdiely medzi krivkami chladenia a ohrevu vidíme v roztoku 10% zmesi čo znamená, že táto koncentrácia obsahuje aj najväčší podiel

amorfnej fázy na začiatku chladenia. Roztok 2% DMSO ešte vykazuje pomerne veľkú hystéziu, takže predpokladáme že obsahuje dostatočné množstvo amorfnej fázy, ktorá má kryoprotektívne účinky na vodu. Avšak koncentrácia 1.8% DMSO má hystéziu veľmi zredukovanú, a je tu viditeľný len minimálny rozdiel v štruktúre, ktorá sa vytvorila pri chladení a následnom ohreve vzorky. Predpokladáme preto, že táto štruktúra obsahuje už len veľmi malý podiel amorfnej fázy a teda má zanedbateľné kryoprotektívne účinky. Týmto zistením môžeme potvrdiť experimentálne hodnoty viability buniek [Lakota] v závislosti od koncentrácie kryoprotektívnej látky DMSO (obr.20).



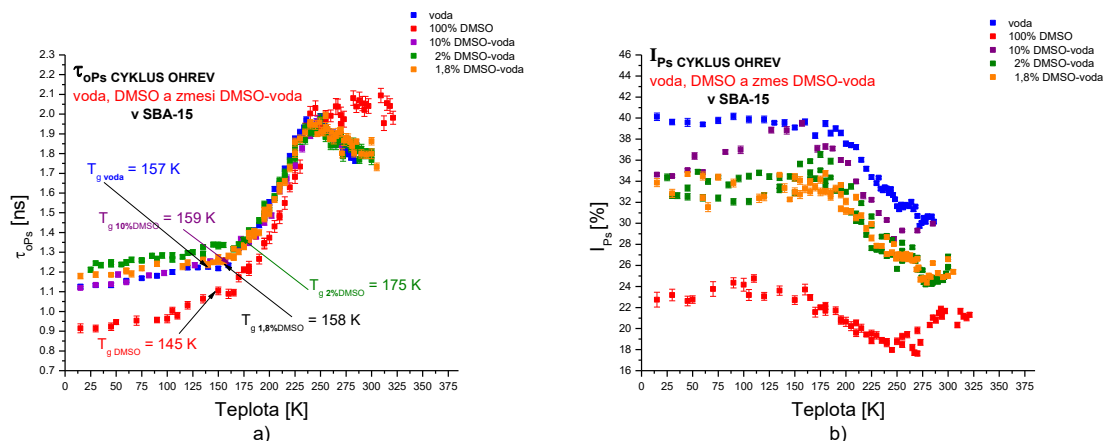
Obrázok 21a) Porovnanie teplotnej závislosti dôb života  $\tau_{0Ps}$  v cykle ohrevu pre všetky skúmané látky v objemovom stave, b) Porovnanie teplotnej závislosti tvorby  $I_{Ps}$  v cykle ohrevu pre všetky skúmané látky v objemovom stave.

## Uväznený stav

Uväznené systémy s mezopórmami o veľkosti 4 nm ukazujú v plnej miere dominanciu amorfného stavu v takomto uväznení ale zároveň ukazujú aj existenciu zmien v expanzii voľného objemu v okolí teploty 210 K a zmeny v  $I_{Ps}(T)$  korešpondujúce so zisteniami experimentov s uväznenou vodou pomocou NMR v oblastiach 180-190 K a 220-230 K ktoré sú interpretované ako zmeny dynamiky molekúl v tejto teplotnej oblasti. To naznačuje dôležitý vplyv preusporiadania molekulovej štruktúry – klastrovej štruktúry. V kvapalnom stave pre vodu a zmesi určuje priebeh dôb života dominantné zastúpenie vody s typickým poklesom  $\tau_{0Ps}(T)$  s nárastom teploty. U DMSO je to však relatívne stabilná hodnota.

**Doby života** v sklovitom stave u DMSO su výrazne nižšie než u vody a zmesí. Zároveň čisté DMSO má náznaky väčšieho počtu zmien expanzie lokálneho voľného objemu oproti vode a sledovaným zmesiam. Ukazuje to na tesnejšie upakované molekuly čistého DMSO v mezopóroch v sklovitom stave ako aj komplikovanejšie prejavy štruktúry pri ohreve. Je otázkou ďalšieho skúmania, aká dynamika sa za tým skrýva,

**Intenzity  $I_{Ps}(T)$**  pre vodu, 1,8 a 2,0% DMSO majú veľmi podobné teplotné správanie s konštantným plateau a postupným poklesom zhruba od 180-200 K. 10% DMSO má správanie viac podobné ku čistému DMSO s minimom nad 250 K (čisté DMSO má okolo 240-250K) Absolútne hodnoty  $I_{Ps}(T)$  pravdepodobne závisia aj od koeficientu plnenia. Očakávali by sa nižšie hodnoty u 10% DMSO, avšak nižší koeficient plnenia u tejto vzorky pravdepodobne spôsobil dodatočné voľné objemy na rozhraní matrica-uväznená látka a tak aj vyššiu hodnotu  $I_{Ps}(T)$ .



Obr. 22a) Porovnanie teplotnej závislosti dôb života  $\tau_{OPs}$  v cykle ohrevu pre všetky skúmané látky v uväznenom stave b) Porovnanie teplotnej závislosti intenzity tvorby  $Ps$   $I_{Ps}$  v cykle ohrevu pre všetky skúmané látky v uväznenom stave.

Tabuľka 13 Hodnoty teplotných bodov v cykle ohrevu v závislosti na koncentrácii DMSO v zmesi s vodou v uväznenom stave

Koncentrácia	$T_g$	$T_{ss}$
$H_2O$	157 K ( $\pm 5$ )	210 K ( $\pm 21$ )
100 % DMSO	145 K ( $\pm 6$ )	195 K ( $\pm 11$ )
10% DMSO- $H_2O$	159 K ( $\pm 14$ )	208 K ( $\pm 6$ )
2% DMSO- $H_2O$	175 K ( $\pm 11$ )	210 K ( $\pm 23$ )
1,8 % DMSO- $H_2O$	158 K ( $\pm 7$ )	200 K ( $\pm 10$ )

Tieto závery zároveň ukazujú smerovanie výskumu v ďalšom období. Je to porovnávanie výsledkov voľnoobjemových experimentov s výsledkami simulácií molekulovej dynamiky, sledovanie kryštalizácie vo väčších mezopóroch, kde kryštalizácia nie je úplne potlačená apod.

## SUMMARY

In this thesis we tried to explain the processes by which the water undergoes a change in temperature and how these processes affect its properties. We have investigated the effect of cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) on the physical properties of water because it causes abnormal behavior of the system with respect to freezing and melting point. We examined water, DMSO, and the DMSO-water mixture at low concentrations in both macroscopic volumes and trapped in nanometer-sized pores at temperature change. We have noticed a noticeable difference in the behavior of bulk and imprisoned substances and have attempted to portray their dynamic behavior.

The temperature parameters are highly influenced by the concentration of DMSO in solution. We monitored low volume concentrations and focused on more precise recognition of the cryoprotective effect of the DMSO-water mixture at the molecular level using the Positron Annihilation Time Spectroscopy (PALS) method. This technique makes it possible to investigate the microstructural free volume of materials through the processes of formation and extinction of positronium up to several nanometers. The results provide new information to help clarify the many empirical findings obtained by examining the effect of cryoprotectants on water in biological structures. These findings could, in the future, contribute to an effective explanation of the cryopreservation principle, and could help to further successfully advance the freezing of larger biological structures.

## LITERATÚRA

- [1] GARWIN R. L.: Physical Review 91, 1571 (1953)
- [2] TAO S.J.: The Journal of Chemical Physics 56, 5499 (1972)
- [3] ELDRUP M., D. Lightbody, SHERWOOD J. N.: Chemical Physics 63, 51-58, (1981)
- [4] FERRELL R.A.: Phys. Rev. 108, 167 (1957)
- [5] MOGENSEN O.E.-JACOBSEN F.M.: Chem. Phys. 73, 223 (1982)
- [6] ZGARDZIŃSKA B. K.: dizert. práca, Univerzita MCS, Fyzikálny ústav, Lublin, Poľsko (2008)
- [7] STEPANOV S.V.-BYAKOV VM-GANGULY B.N., et.al: A molecular basis of the bubble model of positronium annihilation in liquids, Phys B 322:68–79 (2002)
- [8] BYAKOV V. M.- STEPANOV S. V., Rad. Phys. Chem. 58, 687 (2000)
- [9] ZRUBCOVÁ J.: Štúdium vplyvu fyzikálnych parametrov na anihiláciu pozitronov v amorfných polyméroch, dizertačná práca, FÚ SAV Bratislava (2001)
- [10] Operating Instructions, Cryogenerator RW2, Leybold Vakuum GmbH, Cologne, Francúzsko (2001)
- [11] MOGENSEN O.E.- ELDRUP M.: Vacancies in pure ice studied by positron annihilation techniques. J Glaciology 21, p. 85-99 (1978)
- [12] KOTERA K.- SAITO T., YAMANAKA T.: Phys.Lett.A345, p. 184-190 (2005)
- [13] STEPANOV S.V., V. M. Byakov, G. Duplâtre, D. S. Zvezhinskiy, Y.V.Lomachuk, Phys. Status Solidi C6 2476–2481 (2009)
- [14] ŠAUSA O.-ISKROVÁ M.-SLÁVIKOVÁ B., et.al.: Positron annihilation in supercooled water and ice, Materials Science Forum 666: 115-118 (2010)
- [15] ZGARDZINSKA B., GOWOREK T.: Search for premelting at the end of positron track in ice, Physics Letters A, Volume 378, Issue 11-12, p. 915-917 (2014)
- [16] Findenegg G. H.- JAHNERT S.- AKCAKAYIRAN D, et.al.: Freezing and Melting of Water Confined in Silica Nanopores, ChemPhysChem, Vol. 9, Issue 18 (2008)
- [17] CHAPLIN M.: Water Structure and Science, <http://www1.lsbu.ac.uk/water/> (accessed : 08. 02. 2019)
- [18] MURTHY S. S. N.: Some Insight into the Physical Basis of the Cryoprotective Action of Dimethyl Sulfoxide and Ethylene Glycol, Cryobiology, Volume 36, Issue 2, Pages 84-96 (1998)
- [19] MATOUŠKOVÁ M.: Životaschopnosť = viabilita, počet živých buniek, (accessed : 05. 04. 2019)
- [20] Baudot A.- ALGER L., BOUTRON P.: Glass-Forming Tendency in the System Water-Dimethyl Sulfoxide, Cryobiology, Volume 40, Issue 2, pages 151-158 (2000)
- [21] LAKOTA J.: Autologous stem cell transplantation with stem cells preserved in the presence of 4,5 and 2,2% DMSO (1995)
- [22] FUCHSBERGER P.-LAKOTA J.: High-dose chemotherapy and autologous peripheral stem cell transplantation in patients with relapsing malignant lymphomas - first experience in Slovak Republic, Ann Oncol 6, 197-198 (1995)
- [23] WONG D. B.- SOKOLOWSKY K. P.- EL-BARQHOUTH M. I., et.al: Water Dynamics in Water/DMSO Binary Mixtures, The Journal of Physical Chemistry, 116, pages 5479-5490 (2012)

## ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ

KAVETSKY, T. - ŠAUŠA, Ondrej - ČECHOVÁ, Katarína - ŠVAJDLENKOVÁ, Helena - MAŤKO, Igor - PETKOVA, T. - BOEV, V. - ILCHEVA, V. - SMUTOK, O. - KUKHAZH, Y. - GONCHAR, M. *Network properties of ureasil-based polymer matrixes for construction of amperometric biosensors as probed by PALS and swelling experiments*. In Acta Physica Polonica A, 2017, vol. 132, no. 5, p. 1515-1518. (0.469 - IF2016). (2017 - Current Contents, WOS, SCOPUS). ISSN 1898-794X. Typ: **ADCA**

MAŤKO, Igor - ŠAUŠA, Ondrej - ČECHOVÁ, Katarína - JESENÁK, Karol. Water in calcium-montmorillonite. In 1st Journal of Thermal Analysis and Calorimetry Conference and 6th V4 and Thermoanalytical Conference. - Budapest, Hungary : Akadémiai Kiadó, 2017, p. 199. ISBN 978-963-454-098-4. Typ: **AFK**

KAVETSKYY, T.S. - ŠVAJDLENKOVÁ, Helena - KUKHAZH, Y. - ŠAUŠA, Ondrej - ČECHOVÁ, Katarína - MAŤKO, Igor - HOIVANOVYCH, N. - DYTISO, O. - PETKOVA, T. - BOEV, V. - ILCHEVA, V. *Swelling behavior of organic-inorganic ureasil-based polymers*. In NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics, 2018, p. 333-338. ISSN 1874-6500. Typ: **ADMB**

MAŤKO, Igor - ŠAUŠA, Ondrej - ČECHOVÁ, Katarína - JESENÁK, Karol. *Study of water in Ca-montmorillonite by thermal analysis and positron annihilation lifetime spectroscopy*. In Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2018, vol. 133, no. 1, p. 247 -254. (2.209 - IF2017). (2018 - Current Contents). ISSN 1388-6150. Typ: **ADCA**

ŠVAJDLENKOVÁ, Helena - ŠAUŠA, Ondrej - ČECHOVÁ, Katarína - BARTOŠ, Josef. *Dynamic free volume aspects of spin probe TEMPO in organic glass formers: polymer cis-1,4-poly(isoprene)*. In AIP Conference Proceedings : 9th International Conference on Times of Polymers and Composites, 2018, vol. 1981, art.no. 020056. ISSN 0094-243X. Typ: **ADMB**

BARTOŠ, Josef - ŠAUŠA, Ondrej - ŠVAJDLENKOVÁ, Helena - MAŤKO, Igor - ČECHOVÁ, Katarína. *Bulk and confined n-alkanes: n-undecane in unmodified vs modified silica gels by positron annihilation lifetime spectroscopy and electron spin resonance techniques*. Journal of Non-Crystalline Solids, Volume 511, Pages 1-9, May 2019. Typ: **ADCA**