

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ ПРИ УМЕРЕННО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

А. А. Власов<sup>1</sup> ✉, С. Ф. Андрусенко<sup>1</sup>, Е. В. Денисова<sup>1</sup>, А. Б. Эльканова<sup>1</sup>, А. А. Каданова<sup>1</sup>, Е. А. Мельченко<sup>1</sup>, Н. Н. Сокульская<sup>1</sup>, Д. А. Доменюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

<sup>2</sup> Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

Криопротекторы позволяют долгосрочно хранить биоматериалы. Несмотря на имеющиеся успехи в криоконсервации, существует ряд проблем, связанных с разрушением клеточных оболочек, из-за недостаточной эффективности и токсичности некоторых компонентов. В связи с этим, важное значение имеет разработка нетоксичных криоконсервантов, эффективно работающих при низких температурах. Целью работы было оценить морфофункциональные особенности форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой с учетом воздействия умеренно низкой температуры (–40 °С). Были исследованы форменные элементы крови (лейкоциты, эритроциты, тромбоциты), полученные от 30 условно здоровых добровольцев-доноров женского пола в возрасте 18–23 лет. Общий анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе «Гемалит 1270». Компьютерное цитоморфометрическое исследование проводили на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-Ц2». По результатам исследования установлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови после одних суток хранения при температуре –40 °С при добавлении разработанного криоконсерванта с лактулозой: для эритроцитов —  $85,3 \pm 0,30\%$  ( $p < 0,05$ ), для тромбоцитов —  $75 \pm 0,71\%$  ( $p < 0,05$ ), для лейкоцитов —  $90,1 \pm 0,91\%$  ( $p < 0,05$ ) от значений, зарегистрированных до замораживания. Результаты демонстрируют потенциал использования лактулозы в качестве нетоксичного компонента для криоконсервирующих систем, что расширит спектр применяемых криоконсервантов и позволит проводить анализ морфофункциональных параметров образцов замороженной цельной крови при крупномасштабных исследованиях.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, лактулоза, умеренно низкая температура

**Вклад авторов:** А. А. Власов — концепция исследования, проведение и интерпретация результатов; С. Ф. Андрусенко — дизайн исследования, анализ литературы, написание статьи; Е. В. Денисова, А. А. Каданова, Н. Н. Сокульская — сбор информации; А. Б. Эльканова, Е. А. Мельченко — обработка данных; Д. А. Доменюк — редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Северо-Кавказского федерального университета (протокол № 002 от 11 июля 2024 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Александрович Власов  
ул. Пушкина, д. 1, г. Ставрополь, 355017, Россия; avlasov@ncfu.ru

**Статья получена:** 17.07.2024 **Статья принята к печати:** 25.08.2024 **Опубликована онлайн:** 17.09.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.038

## MORPHOFUNCTIONAL STATE OF CRYOPRESERVED BLOOD CELLS AT MODERATE LOW TEMPERATURE

Vlasov AA<sup>1</sup> ✉, Andrusenko SF<sup>1</sup>, Denisova EV<sup>1</sup>, Elkanova AB<sup>1</sup>, Kadanova AA<sup>1</sup>, Melchenko EA<sup>1</sup>, Sokulskaya NN<sup>1</sup>, Domenyuk DA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

<sup>2</sup> Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

Cryoprotectants enable the long-term storage of biomaterials. Despite progress in cryopreservation, there are a number of problems associated with damage to the cell membranes that result from insufficient efficacy and toxicity of some components. In this regard, it is important to develop non-toxic cryopreservation agents performing well at low temperature. The study was aimed to assess morphofunctional features of blood cells in the lactulose-based cryopreservation agent considering the effects of moderate low temperature (–40 °C). Blood cells (leukocytes, erythrocytes, platelets) collected from 30 conditionally healthy female voluntary donors aged 18–23 years were assessed. The complete blood count test was performed using the Gemalight 1270 automated hematology analyzer. Computerized cytomorphometric assessment was performed using the MECOS-C2 hardware and software complex. The study results showed morphological and functional integrity of blood cells after the 24 h storage at the temperature of –40 °C when added the lactulose-based cryopreservation agent developed: erythrocytes —  $85.3 \pm 0.30\%$  ( $p < 0.05$ ), platelets —  $75 \pm 0.71\%$  ( $p < 0.05$ ), leukocytes —  $90.1 \pm 0.91\%$  ( $p < 0.05$ ) of the values reported before freezing. The findings demonstrate the potential of using lactulose as a non-toxic component of cryopreservation systems, which will expand the range of cryopreservation agents used and make it possible to analyze morphofunctional parameters of frozen whole blood samples when conducting large-scale studies.

**Keywords:** cryopreservation, erythrocytes, leukocytes, platelets, lactulose, moderate low temperature

**Author contribution:** Vlasov AA — study concept, procedure, interpretation of the results; Andrusenko SF — study design, literature review, manuscript writing; Denisova EV, Kadanova AA, Sokulskaya NN — data acquisition; Elkanova AB, Melchenko EA — data processing; Domenyuk DA — manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the North Caucasus Federal University (protocol No. 002 dated 11 July 2024); all subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander A. Vlasov  
Pushkina, 1, Stavropol, 355017, Russia; avlasov@ncfu.ru

**Received:** 17.07.2024 **Accepted:** 25.08.2024 **Published online:** 17.09.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.038

Одним из приоритетных и перспективных направлений в современной биологии, а также экспериментальной и клинической медицине является оптимизация методов криоконсервации биоматериалов с возможностью пролонгированного сохранения их функциональных и фенотипических особенностей. При этом способы криоконсервации биоматериала должны обладать низкой

токсичностью и поддерживать клеточные механизмы гомеостаза. Существенное замедление метаболизма в клетке начинается при температуре –70 °С, поэтому применяют консервирование с использованием жидкого азота, но это требует громоздкого дорогостоящего оборудования, регулярного пополнения запасов жидкого азота, что сказывается на себестоимости

хранения материала. Кроме того, такой тип консервации способствует изменению тромбогенности [1], в связи с чем востребованы эффективные криоконсерванты с максимальным сохранением биологических свойств консервируемых биообъектов.

Наилучшие результаты достигаются при использовании комбинированных криоконсервантов, содержащих как проникающие, так и непроникающие криопротекторы. Однако, несмотря на имеющиеся успехи в криоконсервации, существует ряд проблем, связанных с разрушением клеточных оболочек, из-за недостаточной эффективности [2] и токсичности ряда компонентов [3–5]. Целесообразным является внесение липидов, белков и углеводов в качестве компонентов природного происхождения [6–10], а также многоатомных спиртов [11] для уменьшения токсического действия компонентов, входящих в состав криоконсерванта, в том числе при замораживании венозной крови человека [12]. Выраженным защитным действием на клеточные мембраны обладает трегалоза [13–16], для которой подтвержден синергический эффект в комбинации с диметилсульфоксидом (ДМСО) [17].

Одним из направлений совершенствования криоконсервации является поиск новых нетоксичных компонентов, таких как лактулоза. В ходе исследований лактулозы данных о токсическом, тератогенном или мутагенном действии в опытах на животных и в клинических исследованиях с участием людей получено не было [18]. При этом отмечены защитные свойства лактулозы, повышающей выживаемость кислотолюбивых культур при заморозке. Внесение до 3% лактулозы в смесь с кислотолюбивыми микроорганизмами способствовало увеличению числа жизнеспособных клеток культуры при замораживании продукции до температуры  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  [19]. Есть данные, что лактулоза в сочетании с лецитином оказывает криопротекторное действие на пробиотики при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [20]. Таким образом, использование лактулозы может найти применение в практической деятельности для сохранения биологических объектов при замораживании в качестве нетоксичного компонента криоконсервантов.

Образцы свежей цельной крови наиболее предпочтительны для анализа, однако к недостаткам работы со свежей кровью относятся необходимость ее быстрого анализа после взятия биопробы и ограниченное число повторных анализов, которые могут быть выполнены без дополнительного взятия крови [21]. Описан опыт криоконсервирования в полевых условиях капиллярной крови с последующим анализом методом цитометрии, связанной с необходимостью немедленного анализа образцов [22], однако аналогичных данных о криоконсервировании венозной крови нет. Кроме того, актуальна сохранность гемопоэтических стволовых клеток периферической крови как процедура лечения гематологических, онкологических и аутоиммунных заболеваний [23].

Цель работы — оценить морфофункциональные особенности форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой с учетом воздействия умеренно низкой температуры ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Критерии включения пациентов в исследование: условно здоровые доноры в возрасте 18–23 лет женского пола в

первой фазе менструального цикла, в количестве 30 человек, отсутствие хронических заболеваний в период обострения. Объект исследования — периферическая венозная кровь, стабилизированная КЗ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) *in vitro*.

Из числа проб периферической венозной крови, полученных от добровольцев доноров, были сформированы три группы. В контрольную группу вошли 10 образцов крови, в которой исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре  $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В 1-ю опытную группу вошли 10 образцов крови, в которые был внесен криоконсервант. Данные образцы исследовали по истечении 4 ч, при температуре  $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Во 2-ю опытную группу вошли 10 образцов крови, в которые был внесен криоконсервант, при этом образцы были введены в состояние холодового анабиоза при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  на 24 ч. Далее образцы размораживали и исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре  $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

При приготовлении модельного криоконсерванта были использованы растворы солей, поддерживающие изотоническую концентрацию. В качестве проникающих в клетку криокомпонентов использовали глицерин и ДМСО, в качестве не проникающего дисахарид лактулозу. Конечный состав модельного криоконсерванта имел следующие соотношения компонентов, об. %: глицерин (чда, Россия) — 20, ДМСО (хч, Россия) — 10, лактулоза (торговая марка «Лактусан» по ТУ 9229-004-53757476-04; Россия) — 2,5, хлорид натрия (чда, Россия) — 0,25, натрий фосфорнокислый двузамещенный (чда, Россия) — 0,25, вода для инъекций (Дальхимфарм; Россия) — до 100%.

Раствор криоконсерванта автоклавируют (без ДМСО) при 1,2 атм в течение 30 мин. Готовый раствор хранили в холодильнике при  $+2$  —  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Стерилизацию ДМСО осуществляли с использованием установки стерилизующей фильтрации и хранили в стерильных пробирках при температуре  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Раствор ДМСО вносили в готовый стерильный криоконсервант непосредственно перед замораживанием образцов крови.

В образцы 1-й и 2-й опытных групп добавляли с помощью дозатора криоконсервант в соотношении кровь : криоконсервант как 2 : 1 по объему. Пробирки герметизировали пробками, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Далее образцы 1-й опытной группы спустя 4 ч исследовали при температуре  $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Образцы 2-й опытной группы помещали в морозильную камеру электроморозильника с температурой  $-20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  в хладагент в виде раствора 38–45 об.% этилового спирта 96 об.% с температурой холодовой адаптации  $-26$ – $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , объем замораживаемого образца составил 10% от объема хладагента, выдерживали в нем 30 мин и перемещали для окончательного замораживания и хранения в камеру электроморозильника с температурой  $-40 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  на 24 ч. После этого образцы размораживали в водяной бане UT-4334 (ULAB; Россия) при покачивании (2–3 раза/с) в ручном режиме при температуре  $+40 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин. Далее исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре  $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Компьютерное цитоморфометрическое исследование клеток крови выполняли на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-Ц2» («Медицинские компьютерные системы»; Россия). Для проведения *in vitro* диагностических тестов образцов крови в лабораторных условиях использовали автоматический гематологический анализатор «Гемалайт 1270» (Dixon; Россия). Для

Таблица 1. Лейкоцитарные показатели ОАК в группах исследований ( $X \pm m$ ;  $p$ )

Показатели ОАК	Контрольная группа ( $n = 10$ )	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	Достоверность различия, $p$
WBC, $\times 10^9/\text{л}$	$5,60 \pm 0,92$	$4,55 \pm 0,74^*$	$4,14 \pm 0,85^{**}$	$p < 0,01$
Lym, %	$38,31 \pm 1,35$	$25,70 \pm 1,87^*$	$11,9 \pm 1,10^{**}$	$p < 0,01$
Gran, %	$56,20 \pm 3,67$	$51,10 \pm 2,05^*$	$45,3 \pm 2,71^{**}$	$p < 0,01$
Mid, %	$6,20 \pm 0,32$	$10,20 \pm 1,21$	$10,32 \pm 1,27$	$p \geq 0,2$
Сохранность, %	100	$81 \pm 0,89^*$	$90,1 \pm 0,91^{**}$	$p < 0,01$

Примечание: \* — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ( $p < 0,01$ ); \*\* — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ( $p < 0,01$ )

определения величины параметров RBC подсчитывали число клеток в суспензии клеток крови с разведением образца в соотношении 1 : 40 000. На гематологическом анализаторе определяли 21 лабораторный показатель, отражающий состояние лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного звена.

Для обработки полученных результатов использовали статистический пакет версии «IBM SPSS Statistic 23.0» (IBM Corp., Armonk, NY; USA). Характер распределения величин изучаемых показателей оценивали с помощью  $W$ -критерия Шапиро–Уилка. Уровень статистической значимости межгрупповых различий при соответствии распределения значений показателя закону нормального распределения оценивали с помощью параметрического  $t$ -критерия Стьюдента для несвязанных выборок, для показателей с ненормальным распределением — при помощи непараметрического  $U$ -критерия Манна–Уитни. Для показателей с нормальным распределением вычисляли среднее значение ( $X$ ), ошибку среднего ( $m$ ) и стандартное отклонение ( $\delta$ ). Межгрупповые различия считали достоверными (статистически значимыми) при вероятности ошибки ( $p$ )  $\leq 0,05$  (5% вероятности).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ лейкоцитарных показателей крови проводили в контрольной группе до внесения криоконсерванта. В 1-й опытной группе по истечении 4 ч с момента внесения криоконсерванта при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C. Во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом после 24-часовой инкубации при температуре  $-40 \pm 1,0$  °C (табл. 1).

При анализе лейкоцитарных данных, как в 1-й, так и во 2-й опытных группах, наблюдается тенденция к снижению показателей, однако количественное и процентное соотношение осталось в пределах референсного диапазона.

Проводили анализ компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре  $-40 \pm 1,0$  °C (табл. 2).

Полученные данные имеют тенденцию к снижению показателей, однако значения укладываются в пределы референсного диапазона изменений. При этом в 1-й и во 2-й опытных группах с внесенным криоконсервантом показатели демонстрируют стабильные значения: число ядер всего — 1, число сегментов ядра всего — 1, число включений/дырок в ядре — 0 и число хвостов ядра — 2.

Анализ эритроцитарных показателей проводили в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре  $-40 \pm 1,0$  °C (табл. 3).

При сравнительном анализе показателей общего анализа крови в контрольной группе, в 1-й и 2-й опытных группах при воздействии умеренно низкой температуры наблюдается тенденция к снижению показателей, однако количественное и процентное соотношение осталось в пределах референсных значений характеристик форменных элементов.

Таблица 2. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии в группах исследований ( $X \pm m$ ;  $p$ )

Свойства объекта	Контрольная группа ( $n = 10$ )	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	Достоверность различия, $p$
Площадь клетки, $\text{мкм}^2$	$70 \pm 4,19$	$59 \pm 4,75$	$70 \pm 3,98$	$p \geq 0,1$
Формфактор клетки	$14,11 \pm 1,62$	$18,01 \pm 1,23$	$17,2 \pm 1,45$	$p \geq 0,1$
Индекс поляризации клетки	$0,16 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$p \geq 0,1$
Оптическая плотность цитоплазмы	$0,66 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$	$p \geq 0,1$
Площадь ядра, $\text{мкм}^2$	$52 \pm 3,85$	$40 \pm 3,21^*$	$32 \pm 2,24^{**}$	$p < 0,01$
Формфактор ядра	$14,3 \pm 2,1$	$13,1 \pm 2,88$	$13,9 \pm 2,88$	$p \geq 0,05$
Поляризация ядра	$0,06 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,001^*$	$0,16 \pm 0,01^{**}$	$p < 0,01$
Ядерно-клеточное отношение	$0,74 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,01$	$p \geq 0,1$
Доля дополнения ядра	$0,04 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,001$	$p \geq 0,1$

Примечание: \* — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ( $p < 0,01$ ); \*\* — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ( $p < 0,01$ )

Таблица 3. Эритроцитарные показатели ОАК в группах исследований ( $\bar{X} \pm m$ ;  $p$ )

Показатели ОАК	Контрольная группа ( $n = 10$ )	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	Достоверность различия, $p$
RBC, $\times 10^{12}/л$	4,62 $\pm$ 0,23	4,08 $\pm$ 0,21	3,5 $\pm$ 0,55	$p \geq 0,05$
HGB, г/л	131 $\pm$ 5,27	119,25 $\pm$ 5,48*	101,3 $\pm$ 4,73**	$p \geq 0,1$
MCV, фл	86,3 $\pm$ 4,32	84,3 $\pm$ 4,14	80,6 $\pm$ 3,38	$p \geq 0,1$
HCT, %	39,3 $\pm$ 1,58	35,4 $\pm$ 1,49	30,4 $\pm$ 1,63	$p \geq 0,2$
MCH, пг	28,5 $\pm$ 1,37	26,2 $\pm$ 1,45	21,1 $\pm$ 1,52	$p \geq 0,05$
MCHC, г/л	336 $\pm$ 29,72	311 $\pm$ 23,46	266 $\pm$ 14,42	$p \geq 0,5$
RDW, %	12,2 $\pm$ 1,67	11,7 $\pm$ 1,48	10,3 $\pm$ 1,25	$p \geq 0,5$
Сохранность, %	100	89 $\pm$ 0,20*	85,3 $\pm$ 0,30**	$p < 0,01$

Примечание: \* — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ( $p < 0,01$ ); \*\* — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ( $p < 0,01$ )

Проводили анализ компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре  $-40 \pm 1,0$  °C (табл. 4).

Результаты сравнительного анализа контрольной и 1-й опытной группы демонстрируют тенденцию к снижению большей части показателей, однако полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов. Данные, полученные в ходе сравнительного анализа во 2-й опытной группе, демонстрируют тенденцию к снижению по всем показателям, при этом полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов и указывают на стабильность образцов на фоне криопротекторной нагрузки.

Анализ тромбоцитарных показателей проводили в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре  $-40 \pm 1,0$  °C (табл. 5).

При сравнительном анализе показателей общего анализа крови в контрольной и 1-й опытной группах при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C выявлена тенденция к снижению уровня ряда показателей, однако все значения лежат на границе референсного диапазона. При анализе данных тромбоцитарных показателей во 2-й опытной группе наблюдается тенденция к снижению значений, однако

количественное и процентное соотношение осталось в пределах условно допустимых референсных значений характеристик форменных элементов.

Проводили анализ компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 2-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре  $-40 \pm 1,0$  °C (табл. 6).

Анализ данных в контрольной и 1-й опытной группах при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C демонстрирует тенденцию к снижению большей части показателей, однако полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов. Данные, полученные в ходе сравнительного анализа во 2-й опытной группе, демонстрируют тенденцию к снижению уровня показателей, при этом укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты сравнительного анализа лейкоцитарных показателей контрольной и 1-й опытной группы с внесением криоконсерванта имели тенденцию к снижению большинства показателей, однако все значения укладывались в пределы референсного интервала. Такие показатели, как «число ядер всего — 1», «число сегментов ядра всего — 1», «число включений/дырок в ядре — 0» и «число хвостов ядра — 2», в контрольной группе и в 1-й опытной группе были идентичны. Полученные значения использовали в качестве сравнения с показателями

Таблица 4. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в группах исследований ( $\bar{X} \pm m$ ;  $p$ )

Свойства объекта	Контрольная группа ( $n = 10$ )	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	Достоверность различия, $p$
Площадь клетки, $\mu\text{км}^2$	46,6 $\pm$ 4,12	53,3 $\pm$ 4,68*	41,1 $\pm$ 2,42**	$p < 0,01$
Средний диаметр, $\mu\text{км}$	6,4 $\pm$ 1,14	7,8 $\pm$ 1,17	6,85 $\pm$ 1,16	$p \geq 0,1$
Фактор формы	13,5 $\pm$ 1,2	13,6 $\pm$ 1,2	12,7 $\pm$ 1,2	$p \geq 0,1$
Поляризация	0,096 $\pm$ 1,001	0,083 $\pm$ 0,001*	0,048 $\pm$ 0,001**	$p < 0,01$
Интегральная оптическая плотность (Кра), $\mu\text{км}^2$	16,4 $\pm$ 2,78	18,1 $\pm$ 2,91	16,2 $\pm$ 2,74	$p \geq 0,05$
Интегральная оптическая плотность (Зел), $\mu\text{км}^2$	20,3 $\pm$ 2,24	21,3 $\pm$ 2,31	19,8 $\pm$ 2,13	$p \geq 0,1$
Интегральная оптическая плотность (Син), $\mu\text{км}^2$	11,28 $\pm$ 2,11	12,95 $\pm$ 2,17	11,75 $\pm$ 2,15	$p \geq 0,1$

Примечание: \* — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ( $p < 0,01$ ); \*\* — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ( $p < 0,01$ )

Таблица 5. Тромбоцитарные показатели ОАК в группах исследований ( $\bar{X} \pm m$ ;  $p$ )

Показатели ОАК	Контрольная группа ( $n = 10$ )	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	Достоверность различия, $p$
PLT, $\times 10^9/\text{л}$	$230,8 \pm 5,78$	$198,6 \pm 5,36^*$	$150,1 \pm 4,71^{**}$	$p < 0,01$
MPV, фл	$8,24 \pm 1,22$	$7,56 \pm 1,24$	$7,04 \pm 1,17$	$p \geq 0,1$
PCT, %	$2,23 \pm 0,31$	$2,1 \pm 0,24$	$1,97 \pm 0,71$	$p \geq 0,1$
P-LCR, %	$17,38 \pm 2,72$	$21,24 \pm 2,61$	$19,17 \pm 2,45$	$p \geq 0,05$
P-LCC, $\times 10^9/\text{л}$	$41,61 \pm 3,12$	$50,8 \pm 3,32$	$46,14 \pm 3,74$	$p \geq 0,05$
Сохранность, %	100	$86,2 \pm 0,31^*$	$75 \pm 0,71^{**}$	$p < 0,01$

Примечание: \* — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ( $p < 0,01$ ); \*\* — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ( $p < 0,01$ )

образцов, подвергнутых замораживанию. При анализе данных компьютерной цитометрии лейкоцитарных показателей крови до и после внесения криоконсерванта при замораживании до  $-40$  °C установлено, что во 2-й опытной группе показатели демонстрировали аналогичные значения по сравнению с группой контроля: число ядер всего — 1, число сегментов ядра всего — 1, число включений/дырок в ядре — 0 и число хвостов ядра — 2. При анализе показателей общего анализа крови и морфометрических характеристик лейкоцитов цельной крови в контрольной и опытных группах установили тенденцию к снижению их значений, однако все полученные данные не выходят за пределы допустимых значений характеристик форменных элементов. Так в контрольной группе показатели WBC —  $10^9/\text{л}$  составили  $5,60 \pm 0,92$  ( $p < 0,01$ ) в 1-й опытной группе —  $4,55 \pm 0,74$  ( $p < 0,01$ ), а во 2-й опытной группе —  $4,14 \pm 0,85$  ( $p < 0,01$ ). Показатели морфометрии лейкоцитов, такие как площадь клетки в  $\text{мкм}^2$  в контрольной группе составили  $70 \pm 4,19$  ( $p \geq 0,1$ ), в 1-й опытной группе —  $59 \pm 4,75$  ( $p \geq 0,1$ ), во 2-й опытной группе —  $70 \pm 3,98$  ( $p \geq 0,1$ ).

В полученных результатах сравнительного анализа компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в контрольной, 1-й и 2-й опытных группах с внесением криоконсерванта имела место тенденция к снижению уровня показателей, однако все значения укладывались в пределы референсного интервала. Анализ компьютерной цитоморфометрии эритроцитов во 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре замораживания  $-40$  °C показал тенденцию к снижению, однако полученные результаты указывают на стабильность образцов и укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов крови. Так в контрольной группе RBC  $\times 10^{12}/\text{л}$  составили  $4,62 \pm 0,23$  ( $p \geq 0,05$ ), в 1-й опытной группе —  $4,08 \pm 0,21$  ( $p \geq 0,05$ ), во 2-й опытной группе —  $3,5 \pm 0,55$  ( $p \geq 0,05$ ). Показатели морфометрии эритроцитов, такие как площадь клетки в  $\text{мкм}^2$ , в контрольной группе составили  $46,6 \pm 4,12$  ( $p < 0,01$ ),

в 1-й опытной группе —  $53,3 \pm 4,68$  ( $p < 0,01$ ) и 2-й опытной группе —  $41,1 \pm 2,42$  ( $p < 0,01$ ) соответственно.

По результатам сравнительного анализа уровни большинства тромбоцитарных показателей в контрольной группе и в 1-й опытной группе с криоконсервантом в условиях комнатной температуры имели тенденцию к снижению, однако все значения укладывались в пределы референсных значений характеристик форменных элементов. При анализе тромбоцитарных показателей во 2-й опытной группе с криоконсервантом при инкубации при температуре  $-40$  °C установлено, что количественное и процентное соотношение показателей имеет тенденцию к снижению, однако полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов крови. Так уровень PLT  $\times 10^9/\text{л}$  в контрольной группе составил  $230,8 \pm 5,78$  ( $p < 0,01$ ), в 1-й опытной группе —  $198,6 \pm 5,36$  ( $p < 0,01$ ), во 2-й опытной группе —  $150,1 \pm 4,71$  ( $p < 0,01$ ). Показатели морфометрии эритроцитов, такие как площадь клетки в  $\text{мкм}^2$  в контрольной группе составили  $7,7 \pm 0,21$  ( $p \geq 0,1$ ), в 1-й опытной группе —  $7,5 \pm 0,36$  ( $p \geq 0,1$ ), во 2-й опытной группе —  $7,2 \pm 0,31$  ( $p \geq 0,1$ ) соответственно.

По результатам анализа исследований, посвященных поиску новых эффективных криоконсервантов, большое количество работ посвящено криоконсервированию эритроцитов, нежели тромбоцитов и лейкоцитов. При использовании в качестве криоконсерванта раствора «Криосин» сохранность эритроцитов составила  $83,8 \pm 4,09\%$  [24]. При оценке жизнеспособности ядросодержащих клеток в лейкоконцентратах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования были получены следующие данные: в результате отмывания от ДМСО в жизнеспособном состоянии сохраняется существенно больше клеток, чем без отмывания —  $94,4\%$  против  $86,7\%$  [25]. При замораживании тромбоцитов крови доноров под защитой комбинированного криоконсерванта сохранялась их функциональная активность в пределах  $63,5$ – $88,8\%$  [26]. Таким образом,

Таблица 6. Показатели компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в группах исследований ( $\bar{X} \pm m$ ;  $p$ )

Свойства объекта	Контрольная группа ( $n = 10$ )	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ( $n = 10$ )	Достоверность различия, $p$
Площадь, $\text{мкм}^2$	$7,7 \pm 0,21$	$7,5 \pm 0,36$	$7,2 \pm 0,31$	$p \geq 0,1$
Мин. диаметр, $\text{мкм}$	$2,85 \pm 0,14$	$2,63 \pm 0,16$	$2,31 \pm 0,24$	$p \geq 0,1$
Макс. диаметр, $\text{мкм}$	$4,03 \pm 0,24$	$3,94 \pm 0,32$	$3,74 \pm 0,36$	$p \geq 0,1$
Средний диаметр, $\text{мкм}$	$3,44 \pm 0,13$	$3,29 \pm 0,16^*$	$3,03 \pm 0,21^{**}$	$p < 0,01$
Фактор формы	$12,9 \pm 2,18$	$12,3 \pm 1,21$	$12,1 \pm 1,74$	$p \geq 0,05$

Примечание: \* — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ( $p < 0,01$ ); \*\* — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ( $p < 0,01$ )

данные, полученные в ходе настоящего исследования, сопоставимы с результатами литературных данных по анализу сохранности отдельных форменных элементов крови в ходе криоконсервирования.

Разработанный криоконсервант с лактулозой является эффективным в условиях замораживания до  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  и доступным (все компоненты производятся на территории Российской Федерации), что расширяет спектр применяемых криоконсервантов и позволит провести анализ морфофункциональных параметров образцов замороженной цельной крови при крупномасштабных исследованиях в условиях чрезвычайных ситуаций, при ликвидации последствий аварий техногенного или природного происхождения, террористических актов, вооруженных конфликтов, хранения биоматериала в длительных экспедициях и отдаленных местностях. Кроме того, перспективен персонализированный подход к трансфузии компонентов крови при экстренной необходимости переливания собственной криоконсервированной цельной крови для снижения

риска влияния чужеродных комплексов на организм реципиента. Представленные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения влияния лактулозы в качестве криокомпонента на сохранность биообъектов.

## ВЫВОДЫ

В ходе обработки полученных данных выявлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови в разработанном криоконсерванте с лактулозой после замораживания в течение 24 ч при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ : для эритроцитов —  $85,3 \pm 0,30\%$  ( $p < 0,05$ ), для тромбоцитов —  $75 \pm 0,71\%$  ( $p < 0,05$ ), для лейкоцитов —  $90,1 \pm 0,91\%$  ( $p < 0,05$ ) от значений, зарегистрированных до замораживания. В свете современных исследований, посвященных поиску новых эффективных криоконсервантов, лактулоза может найти применение в качестве нетоксичного компонента при разработке криосоставов для сохранения биологических объектов при замораживании.

## Литература

- Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikolova N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One*. 2021; 16 (7): e0255114. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255114>.
- Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol* 19. 2021; 56. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>.
- Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine*. 2020; 15 (3): 1463–91. DOI: 10.2217/rme-2019-0145.
- Liu X, Pan Y, Liu F, He Y, Zhu Q, Liu Z, et al. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials*. 2021; 2021. Available from: [doi.org/10.1155/2021/9990709](https://doi.org/10.1155/2021/9990709).
- Заикина Е. В., Гончарова А. С., Позднякова В. В., Пандова О. В., Пржедецкий Ю. В., Воловик В. Г. и др. Обзор современных методов криоконсервации различных видов биологического материала. *Современные проблемы науки и образования*. 2022; 4. Доступно по ссылке: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31790>.
- Силокова Ю. Л., Станишевская О. И., Плешанов Н. В., Курочкин А. А. Эффективность использования комбинаций сахаридов в средах для криоконсервации спермы петухов. *Сельскохозяйственная биология*. 2020; 55 (6): 1148–58. DOI: 10.15389/agrobiol.2020.6.1148rus.
- Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and future perspectives for the cryopreservation of cord blood stem cells. *Transfus Med Rev*. 2021; 35 (2): 95–102. DOI: 10.1016/j.tmr.2021.01.003. PMID: 33640254.
- Tas RP, Sampaio-Pinto V, Wennekes T, van Laake LW, Voets IK. From the freezer to the clinic: Antifreeze proteins in the preservation of cells, tissues, and organs. 2021; 22 (3): 52162. DOI: 10.15252/embr.202052162. PMID: 33586846; PMCID: PMC7926221.
- Whaley D, Danyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplant*. 2021; 30: 963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617. PMID: 33757335; PMCID: PMC7995302.
- Li J, Wang H, Wang L, et al. Stabilization effects of saccharides in protein formulations: A review of sucrose, trehalose, cyclodextrins and dextrans. *Eur J Pharm Sci*. 2024; 192: 106625. DOI: 10.1016/j.ejps.2023.106625. Epub 2023 Nov 2. PMID: 37918545.
- Zhong Y, McGrath JK, Gong B. Dipropionates of sugar alcohols as water-soluble, nontoxic CPAs for DMSO-Free cell cryopreservation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021; 7 (10): 4757–62. DOI: 10.1021/acsbmaterials.1c00995. PMID: 34587440.
- Широких И. Г., Полежаева Т. В., Широких А. А., Худяков А. Н., Сергушкина М. И., Назарова Я. И. и др. Криозащитные свойства полисахаридосодержащей фракции *Hericium erinaceus* БП 16. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2020; 1: 5–11. DOI: 10.31857/S0002332920010129.
- Olsson C, Swenson J. Structural comparison between sucrose and trehalose in aqueous solution. *J Phys Chem B*. 2020; 124 (15): 3074–82. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b09701. PMID: 32223195; PMCID: PMC7311057.
- Janis BR, Priddy MC, Otto MR, Kopechek JA, Menze MA. Sonoporation enables high-throughput loading of trehalose into red blood cells. *Cryobiology*. 2021; 98: 73–79. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.005. PMID: 33359645.
- Xu B, Wang Z, Wang R, Song G, Zhang Y, Su R, et al. Metabolomics analysis of buck semen cryopreserved with trehalose. *Front Genet*. 2022; 13: 938622. DOI: 10.3389/fgene.2022.938622. PMID: 35991557; PMCID: PMC9386307.
- Yao J, Shen L, Chen Z, Zhang B, Zhao G. Hydrogel microencapsulation enhances cryopreservation of red blood cells with trehalose. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022; 8 (5): 2066–75. DOI: 10.1021/acsbmaterials.2c00051. PMID: 35394755.
- Murray A, Congdon TR, Tomás RMF, Kilbride P, Gibson MI. Red blood cell cryopreservation with minimal post-thaw lysis enabled by a synergistic combination of a cryoprotecting polyampholyte with DMSO/Trehalose. *Biomacromolecules*. 2022; 23 (2): 467–77. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00599. PMID: 34097399; PMCID: PMC7612374.
- Рябцева С. А., Храмов А. Г., Будкевич Р. О., Анисимов Г. С., Чулко А. О., Шпак М. А. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы. *Вопросы питания*. 2020; 89 (2): 5–20. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10012.
- Shpak M, Ryabtseva S, Bratsikhin A. Lactulose effect on viability of starter cultures. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 2019; 27: 162–7.
- Killer J, Bunešová VN, Modráčková N, Vlková E, Pechar R, Špíchal I. Lactulose in combination with soybean lecithin has a cryoprotective effect on probiotic taxa of bifidobacteria and Lactobacillaceae. *Lett Appl Microbiol*. 2023; 76 (2): ovad008. DOI: 10.1093/lambio/ovad008. PMID: 36657381.
- Dayal R, Beyls E, Vral A, et al. The micronucleus assay on cryopreserved whole blood. *J Vis Exp*. 2024; 204. DOI: 10.3791/65855. PMID: 38465937.

22. Blackwell AD, Garcia AR, Keivanfar RL, et al. A field method for cryopreservation of whole blood from a finger prick for later analysis with flow cytometry. *Am J Phys Anthropol.* 2021; 174 (4): 670–85. DOI: 10.1002/ajpa.24251. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33595836.
23. Кит О. И., Гненная Н. В., Филиппова С. Ю., Чембарова Т. В., Лысенко И. Б., Новикова И. А. и др. Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023; 22 (11): 3691. DOI: 10.15829/1728-8800-2023-3691. EDN YTCCTM.
24. Кирьянова Г. Ю., Волкова С. Д., Касьянов А. Д., Гришина Г. В., Голованова И. С., Чечеткин А. В. Криоконсервирование эритроцитов при температурах  $-40^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ . *Вестник международной академии холода.* 2017; 1: 72–78. DOI: 10.21047/1606-4313-2017-16-1-72-78.
25. Исаева Н. В., Минаева Н. В., Утемов С. В., Шерстнев Ф. С., Зорина Н. А., Змеева Ю. С. и др. Жизнеспособность ядросодержащих клеток в лейкоконцентратах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования. *Бюллетень сибирской медицины.* 2023; 22 (2): 46–52. Available from: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>.
26. Ветошкин К. А., Утемов С. В., Шерстнев Ф. С., Князев М. Г., Костяев А. А. Результаты криоконсервирования донорских тромбоцитных концентратов при низких и ультранизких температурах. *Трансфузиология.* 2015. 2 (16): 22–27.

## References

1. Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikolova N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One.* 2021; 16 (7): e0255114. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255114>.
2. Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol.* 2021; 56. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>.
3. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine.* 2020; 15 (3): 1463–91. DOI: 10.2217/rme-2019-0145.
4. Liu X, Pan Y, Liu F, He Y, Zhu Q, Liu Z, et al. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials.* 2021; 2021. Available from: [doi.org/10.1155/2021/9990709](https://doi.org/10.1155/2021/9990709).
5. Zaikina EV, Goncharova AS, Pozdnyakova VV, Pandova OV, Przhedekij YuV, Volovik V. G, et al. Обзор современных методов криоконсервации различных видов биологического материала. *Современные проблемы науки и образования.* 2022; 4. Доступно по ссылке: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31790>. Russian.
6. Silyukova YuL, Stanishevskaja OI, Pleshchanov NV, Kurochkin AA. Jeftektivnost' ispol'zovaniya kombinacij saharidov v sredah dlja kriokonservacii spermy petuhov. *Sel'skohozjajstvennaja biologija.* 2020; 55 (6): 1148–58. DOI: 10.15389/agrobiologija.2020.6.1148rus. Russian.
7. Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and future perspectives for the cryopreservation of cord blood stem cells. *Transfus Med Rev.* 2021; 35 (2): 95–102. DOI: 10.1016/j.tmv.2021.01.003. PMID: 33640254.
8. Tas RP, Sampaio-Pinto V, Wennekes T, van Laake LW, Voets IK. From the freezer to the clinic: Antifreeze proteins in the preservation of cells, tissues, and organs. 2021; 22 (3): 52162. DOI: 10.15252/embr.202052162. PMID: 33586846; PMCID: PMC7926221.
9. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplant.* 2021; 30: 963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617. PMID: 33757335; PMCID: PMC7995302.
10. Li J, Wang H, Wang L, et al. Stabilization effects of saccharides in protein formulations: A review of sucrose, trehalose, cyclodextrins and dextrans. *Eur J Pharm Sci.* 2024; 192: 106625. DOI: 10.1016/j.ejps.2023.106625. Epub 2023 Nov 2. PMID: 37918545.
11. Zhong Y, McGrath JK, Gong B. Dipropionates of sugar alcohols as water-soluble, nontoxic CPAs for DMSO-free cell cryopreservation. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021; 7 (10): 4757–62. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.1c00995. PMID: 34587440.
12. Shirokih IG, Polezhaeva TV, Shirokih AA, Hudyakov AN, Serghushkina MI, Nazarova Yal, et al. Kriozashhitnye svojstva polisaharidsoderzhashhej frakcii *Heridium erinaceus* BP 16. *Izvestija RAN. Serija biologicheskaja.* 2020; 1: 5–11. DOI: 10.31857/S0002332920010129. Russian.
13. Olsson C, Swenson J. Structural comparison between sucrose and trehalose in aqueous solution. *J Phys Chem B.* 2020; 124 (15): 3074–82. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b09701. PMID: 32223195; PMCID: PMC7311057.
14. Janis BR, Priddy MC, Otto MR, Kopechek JA, Menze MA. Sonoporation enables high-throughput loading of trehalose into red blood cells. *Cryobiology.* 2021; 98: 73–79. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.005. PMID: 33359645.
15. Xu B, Wang Z, Wang R, Song G, Zhang Y, Su R, et al. Metabolomics analysis of buck semen cryopreserved with trehalose. *Front Genet.* 2022; 13: 938622. DOI: 10.3389/fgene.2022.938622. PMID: 35991557; PMCID: PMC9386307.
16. Yao J, Shen L, Chen Z, Zhang B, Zhao G. Hydrogel microencapsulation enhances cryopreservation of red blood cells with trehalose. *ACS Biomater Sci Eng.* 2022; 8 (5): 2066–75. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.2c00051. PMID: 35394755.
17. Murray A, Congdon TR, Tomás RMF, Kilbride P, Gibson MI. Red blood cell cryopreservation with minimal post-thaw lysis enabled by a synergistic combination of a cryoprotecting polyampholyte with DMSO/Trehalose. *Biomacromolecules.* 2022; 23 (2): 467–77. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00599. PMID: 34097399; PMCID: PMC7612374.
18. Ryabceva SA, Hramcov AG, Budkevich RO, Anisimov GS, Chuklo AO, Shpak MA. Fiziologicheskie jeffekty, mehanizmy dejstvija i primenenie laktulozy. *Voprosy pitanija.* 2020; 89 (2): 5–20. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10012. Russian.
19. Shpak M, Ryabtseva S, Bratsikhin A. Lactulose effect on viability of starter cultures. *Journal of Hygienic Engineering and Design.* 2019; 27: 162–7.
20. Killer J, Bunešová VN, Modráčková N, Vlková E, Pechar R, Šplíchal I. Lactulose in combination with soybean lecithin has a cryoprotective effect on probiotic taxa of bifidobacteria and Lactobacillaceae. *Lett Appl Microbiol.* 2023; 76 (2): ovad008. DOI: 10.1093/lambio/ovad008. PMID: 36657381.
21. Dayal R, Beyls E, Vral A, et al. The micronucleus assay on cryopreserved whole blood. *J Vis Exp.* 2024; 204. DOI: 10.3791/65855. PMID: 38465937.
22. Blackwell AD, Garcia AR, Keivanfar RL, et al. A field method for cryopreservation of whole blood from a finger prick for later analysis with flow cytometry. *Am J Phys Anthropol.* 2021; 174 (4): 670–85. DOI: 10.1002/ajpa.24251. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33595836.
23. Кит ОИ, Гненная НВ, Филиппова СЮ, Чембарова ТВ, Лысенко ИБ, Новикова ИА, et al. Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023; 22 (11): 3691. DOI: 10.15829/1728-8800-2023-3691. EDN YTCCTM. Russian.
24. Кирьянова ГЮ, Волкова СД, Касьянов АД, Гришина ГВ, Голованова ИС, Чечеткин АВ. Криоконсервирование эритроцитов при температурах  $-40^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ . *Вестник международной академии холода.* 2017; 1: 72–78. DOI: 10.21047/1606-4313-2017-16-1-72-78. Russian.
25. Isaeva NV, Minaeva NV, Utemov SV, Sherstnev FS, Zorina NA, Zmeeva YuS, et al. Zhiznesposobnost' jadrosoderzhashhih kletok v lejkokoncentratah na jetapah ih poluchenija, zamorazhivaniya i dekriokonservirovaniya. *Bjulleten' sibirskoj mediciny.* 2023; 22 (2): 46–52. Available from: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>. Russian.
26. Vetoshkin KA, Utemov SV, Sherstnev FS, Knyazev MG, Kostjaev AA. Rezul'taty kriokonservirovaniya donorskih trombocitnyh koncentratov pri nizkih i ul'tranizkih temperaturah. *Transfuziologija.* 2015. 2 (16): 22–27. Russian.