

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-141-148>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАКТУЛОЗЫ В СОСТАВЕ КРИОКОНСЕРВАНТА ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ КЛЕТОК КРОВИ

А.А. Власов<sup>1</sup>, С.Ф. Андрусенко<sup>1</sup>, О.И. Анфиногенова<sup>1</sup>, А.Б. Эльканова<sup>1</sup>, А.А. Каданова<sup>1</sup>, У.Е. Сорокина<sup>1</sup>, Э.Е. Рыбчинская<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

**Введение.** Криоконсервация позволяет длительно сохранять биоматериал, однако существует ряд проблем, связанных с недостаточной эффективностью криоконсервантов и токсичностью ряда криокомпонентов, в связи с чем актуален поиск низкотоксичных биосовместимых криоагентов.

**Цель.** Оценка морфофункциональных особенностей форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой на основании показателей лейкоцитарных, тромбоцитарных и эритроцитарных параметров для хранения цельной крови при умеренно низкой температуре (–20 °С).

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 30 добровольцах-донорах женского пола в возрасте 18–23 лет. Объект исследования — периферическая венозная кровь, стабилизированная 3-замещенной калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты. При приготовлении модельного криоконсерванта был использован 0,9 % раствор хлорида натрия для поддержания изотонической концентрации. В качестве криопротекторов, проникающих в клетку, использовали глицерин и диметилсульфоксид, в качестве не проникающего — дисахарид лактулозу. Оптимизация состава криоконсерванта проводилась за счет варьирования массовых долей компонентов. Общий анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе «Гемалит 1270». Компьютерное цитоморфометрическое исследование проводили на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-Ц2».

**Результаты.** В ходе исследования в условиях сохранения образцов крови с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре –20 °С увеличивался процент сохранности лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов (88,6 ± 0,41, 92,1 ± 0,31, 91,4 ± 0,52% соответственно) с сохранением форменных элементов крови в физиологически активном состоянии после оттаивания по сравнению с образцами крови, сохранявшимися при комнатной температуре.

**Выводы.** Выявлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови в образцах с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре –20 °С. Преимущества данного криоконсерванта: возможность его длительного хранения без потери криопротекторных свойств, обеспечение криопротектором стабилизации форменных элементов крови к воздействию субмерзненно низкой температуры –20 °С, применение нетоксичного дисахарида лактулозы, не проникающего внутрь клетки. Разработанный криоконсервант является эффективным в условиях замораживания при –20 °С и доступным (все компоненты производятся на территории Российской Федерации). Исследования в данном направлении позволят более эффективно использовать аутодонорство во избежание ряда осложнений при трансфузии компонентов крови.

**Ключевые слова:** криоконсервация; криопротекторы; эритроциты; лейкоциты; тромбоциты; лактулоза; морфофункциональные свойства

**Для цитирования:** Власов А.А., Андрусенко С.Ф., Анфиногенова О.И., Эльканова А.Б., Каданова А.А., Сорокина У.Е., Рыбчинская Э.Е., Доменюк Д.А. Использование лактулозы при криоконсервировании клеток крови для персонализированной терапии. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2024;26(4):141–148. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-141-148>

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Соответствие принципам этики:** 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.

**Потенциальный конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Власов Александр Александрович [aiecs-aspirini@yandex.ru](mailto:aiecs-aspirini@yandex.ru)

**Статья поступила:** 30.09.2024 **После доработки:** 07.11.2024 **Принята к публикации:** 08.11.2024

## USE OF LACTULOSE IN THE COMPOSITION OF BLOOD CELL CRYOPRESERVATIVES

Aleksander A. Vlasov<sup>1</sup>, Svetlana F. Andrusenko<sup>1</sup>, Oksana I. Anfinogenova<sup>1</sup>, Aishat B. Elkanova<sup>1</sup>, Anna A. Kadanova<sup>1</sup>, Uliana E. Sorokina<sup>1</sup>, Elvira E. Rybchinskaya<sup>1</sup>, Dmitriy A. Domenyuk<sup>2</sup>

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

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

**Introduction.** Cryopreservation allows for long-term conservation of biomaterials. The insufficient efficacy of available cryopreservatives and the toxicity of a number of cryocomponents renders the search for low-toxic biocompatible cryoagents highly relevant.

**Objective.** Assessment of morphological and functional features of blood cells in a lactulose-based cryopreservative for storing whole blood at moderately low temperatures (minus 20 °C) using leukocyte, platelet, and erythrocytes parameters.

**Materials and methods.** The study was conducted using peripheral venous blood of 30 female donor volunteers aged 18–23 years. Samples of peripheral venous blood were stabilized by 3-substituted potassium salt of ethylenediaminetetraacetic acid. The cryopreservative was prepared using a 0.9 % sodium chloride solution to maintain the isotonic concentration. Glycerin and dimethyl sulfoxide were used as cell-penetrating cryoprotectors; lactulose disaccharide was used as a non-penetrating cryoprotector. The composition of the obtained cryopreservative was optimized by varying the mass fractions of the components. Clinical blood tests were performed using a Gemalite 1270 automatic hematology analyzer. A computer cytomorphometric study was performed in the MEKOS-C2 hardware and software environment.

**Results.** The conservation of blood samples using the developed cryopreservative for 24 h at a temperature of minus 20 °C increased the percentage of preserved leukocytes, erythrocytes, and platelets to 88.6±0.41 %, 92.1±0.31 %, and 91.4±0.52 %, respectively. The blood cells retained their physiological activity after thawing compared to blood samples stored at room temperature.

**Conclusions.** The morphological and functional safety of blood cells in samples stored with the developed cryopreservative was revealed after 24 h of storage at minus 20°C. The advantages of this cryopreservative include the possibility of its long-term storage without loss of cryoprotective properties, stabilizing

© А.А. Власов, С.Ф. Андрусенко, О.И. Анфиногенова, А.Б. Эльканова, А.А. Каданова, У.Е. Сорокина, Э.Е. Рыбчинская, Д.А. Доменюк, 2024

blood cells to the effects of sub-moderate low temperatures of minus 20 °C, the use of non-toxic lactulose disaccharide that does not penetrate into the cell. The developed cryopreservative proves effective in freezing conditions at minus 20 °C, being affordable in terms of cost (all components are manufactured in the Russian Federation). Further research in this direction will contribute to the development of safer blood donation approaches and reducing complications during transfusion of blood components.

**Keywords:** cryopreservation; cryoprotectors; erythrocytes; leukocytes; platelets; lactulose; morphofunctional properties

**For citation:** Vlasov A.A., Andrusenko S.F., Anfinogenova O.I., Elkanova A.B., Kadanova A.A., Sorokina U.E., Rybchinskaya E.E., Domenyuk D.A. Use of lactulose in the composition of blood cell cryopreservatives. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):141–148. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-141-148>

**Funding:** the study was performed without sponsorship.

**Compliance with the principles of ethics:** the study was approved by the Ethics Committee of the North-Caucasus Federal University (Protocol No. 002 dated July 11, 2024). All participants signed a voluntary informed consent to participate in the study.

**Potential conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

✉ Aleksander A. Vlasov [alecs-aspirini@yandex.ru](mailto:alecs-aspirini@yandex.ru)

**Received:** 30 Sep. 2024 **Revised:** 7 Nov. 2024 **Accepted:** 8 Nov. 2024

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема сохранения клеток крови вне организма является весьма актуальной для практической медицины. Криоконсервация позволяет длительно хранить биобразцы без изменений клеточной структуры с поддержанием их функциональной активности. Использование жидкого азота требует громоздкого, дорогостоящего оборудования, регулярного пополнения его запасов, что сказывается на себестоимости хранения материала и перевозки образцов [1], в связи с чем востребованы эффективные криоконсерванты для температурного диапазона от -20 до -80 °C. Для криоконсервации характерным недостатком является возможное разрушение клеточных оболочек, возникающее вследствие недостаточной эффективности существующих криоконсервантов [2]. В то же время криоагенты должны обладать низкой токсичностью [3, 4], использование которых не будет приводить к потере фенотипических и функциональных свойств биоматериала, в связи с чем существует потребность в поиске низкотоксичных биосовместимых криоагентов [5].

Наилучшие результаты достигаются при использовании комбинированных криоконсервантов, включающих эндо- и экзоцеллюлярные криопротекторы [6]. Для уменьшения токсического действия криосистем дополнительно вносят в качестве криоагентов природного происхождения липиды, белки, углеводы [7–10], аминокислоты [11] и многоатомные спирты [12]. Одним из перспективных классов криопротекторов являются низкомолекулярные углеводы [13]. Выраженным защитным действием на клеточные мембраны обладает и дисахарид трегалоза [14]. Смеси сахаров и полиолов рассматриваются в качестве естественной эвтектической системы [15]. В настоящее время в литературе недостаточно экспериментальных данных о влиянии ряда углеводов на клетки при использовании их в качестве криопротекторов, в частности дисахарида лактулозы. Лактулоза — безопасное соединение для всех возрастных групп, в том числе для детей младше одного года [16]. При исследовании лактулозы данных о токсическом, тератогенном и мутагенном действии в клинических исследованиях с участием людей получено не было [17]. При этом отмечены защитные свойства лактулозы на микроорганизмы при их заморозке [18, 19].

В настоящее время возросла потребность в постоянном наличии запасов полноценной крови и ее компонентов [20]. Образцы свежей цельной крови являются наиболее предпочтительными для анализа, но недостатком работы с ней является необходимость ее быстрого анализа после взятия биопробы и ограниченное количество повторных проверок, которые могут быть выполнены без дополнительного взятия крови [21]. Описан опыт криоконсервирования в полевых условиях капиллярной крови с последующим анализом методом цитометрии [22], однако аналогичных данных о криоконсервировании венозной крови нет. Таким образом, актуален анализ морфофункциональных параметров криоконсервированной цельной венозной крови в аспекте поиска критериев, позволяющих увеличить сроки хранения стабилизированных образцов крови без особых изменений аналитических методик и определяемых показателей крови.

Цель работы — оценка морфофункциональных особенностей форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой на основании лейкоцитарных, тромбоцитарных и эритроцитарных параметров для хранения цельной крови при умеренно-низкой температуре (-20 °C).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено с участием 30 здоровых женщин-доноров в возрасте 18–23 лет. Все участницы были распределены по фазе менструального цикла (фолликулярная фаза). Критериями включения в исследование было отсутствие у женщин хронических заболеваний в периоде обострения, вредных привычек и видимых признаков аллергического или инфекционного заболевания. Всеми участницами было подписано информированное согласие об участии в исследовании. Объектом исследования была периферическая венозная кровь, стабилизированная 3-замещенной калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (КЗ ЭДТА) *in vitro*. Пробы венозной крови объемом 15 мл отбирали однократно в утренние часы из локтевой вены в специализированные вакуумные пробирки для гематологических исследований с КЗ ЭДТА.

Из числа проб были сформированы три группы. В контрольную группу включили 10 образцов крови, в которой исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре +20 ± 1,0 °C. В 1-ю опытную группу было включено 10 образцов крови,

в которые предварительно был внесен модельный криоконсервант. Данные образцы исследовали по истечении 4 ч при температуре  $+20 \pm 1,0$  °С. Во 2-ю опытную группу вошли 10 образцов крови, в которые был внесен модельный криоконсервант, с последующим введением образцов в состояние холодного анабиоза при температуре  $-20 \pm 1,0$  °С на 24 ч для оценки сохранности образцов после однократного цикла замораживания/оттаивания. Далее образцы размораживали и исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре  $+20 \pm 1,0$  °С.

При приготовлении модельного криоконсерванта был использован 0,9 % раствор хлорида натрия для поддержания изотонической концентрации. В качестве криопротекторов, проникающих в клетку, использовали глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), в качестве не проникающего — дисахарид лактулозу. Оптимизация состава криоконсерванта проводилась за счет варьирования массовых долей компонентов. Конечный состав модельного криоконсерванта имел следующие соотношения компонентов: глицерин (г/мл) — 20%, ДМСО (хч) — 10%, лактулоза (торговая марка «Лактусан» по ТУ 9229-004-53757476-04) — 2,5% и изотонический (0,9%) раствор хлорида натрия до 100%. Приготовленный раствор автоклавировали (без ДМСО) при 1,2 атм в течение 30 мин и хранили в холодильнике при температуре  $+2...+4$  °С. При соприкосновении с воздухом ДМСО окисляется, распадаясь на соединения, усиливающие токсичность химического вещества, поэтому автоклавированию не подлежит. Стерилизацию ДМСО осуществляли методом стерилизующего фильтрования с последующим хранением ДМСО в стеклянных стерильных пробирках при температуре  $-10$  °С. Размораживание ДМСО проводилось на водяной бане УТ-4334 («УЛАВ», Россия) при температуре  $37 \pm 1$  °С. ДМСО вносили в готовый стерильный модельный криоконсервант непосредственно перед замораживанием опытных образцов.

В образцы 1-й и 2-й опытных групп добавляли с помощью дозаторов сменного объема модельный криоконсервант в количестве 500 мкл при соотношении венозная кровь / криоконсервант 2:1 по объему. Пробирки герметизировали пробками, содержимое перемешивали в течение 10 мин с использованием орбитального шейкера (PSU-10i, Латвия). Далее спустя 4 ч образцы 1-й опытной группы исследовали при температуре  $+20 \pm 1,0$  °С. Образцы 2-й опытной группы помещали в морозильную камеру электроморозильника с температурой  $-20 \pm 1,0$  °С и выдерживали 24 ч. После этого образцы размораживали на водяной бане УТ-4334 («УЛАВ», Россия) в ручном режиме при температуре  $+37 \pm 1$  °С в течение 1 мин. Далее исследовали характеристики

и параметры форменных элементов крови при температуре  $+20 \pm 1,0$  °С. Компьютерное цитоморфометрическое исследование клеток крови выполняли на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-Ц2» («Медицинские компьютерные системы», Россия). При проведении *in vitro* диагностических тестов общего анализа крови (ОАК) в лабораторных условиях использовали автоматический гематологический анализатор «Гемалайт 1270» (Dixon, Россия).

Для обработки полученных результатов использовали программное обеспечение статистический пакет версии IBM SPSS Statistic 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, США). 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 (*M*), ошибку среднего (*m*) и стандартное отклонение ( $\delta$ ). Межгрупповые различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования проводили анализ состояния лейкоцитарного звена в опытных и контрольной группах (в 1-й опытной группе с криоконсервантом при температуре  $+20 \pm 1,0$  °С и 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре  $-20 \pm 1,0$  °С). Соответствующие данные представлены в таблице 1.

При анализе лейкоцитарных показателей как в 1-й, так и во 2-й опытных группах по сравнению с контролем отмечено статистически значимое снижение количества лейкоцитов, наиболее выраженное во второй опытной группе ( $3,94 \pm 0,87$ ) $\times 10^9$ /л ( $p < 0,01$ ) против ( $4,55 \pm 0,83$ ) $\times 10^9$ /л в первой опытной группе и ( $5,60 \pm 0,92$ ) $\times 10^9$ /л в контроле соответственно. При этом значение средних клеток достоверно увеличено как в 1-й, так и во 2-й группе в сравнении с контролем, что свидетельствует о снижении распознавания лейкоцитарных клеток анализатором крови. Несмотря на существенные межгрупповые различия, данный показатель находился в диапазоне физиологических референсных значений. Процент сохранности лейкоцитов в образцах крови с внесенным криоконсервантом (температура  $+20 \pm 1,0$  °С) составил  $81 \pm 0,89$  %, при воздействии отрицательных температур ( $-20 \pm 1,0$  °С) —  $88,6 \pm 0,41$ %.

Таблица 1. Лейкоцитарные показатели ОАК в группах исследований

Показатели ОАК	Контрольная группа <i>n</i> = 10	1-я опытная группа <i>n</i> = 10	2-я опытная группа <i>n</i> = 10
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	$5,60 \pm 0,92$	$4,55 \pm 0,83^*$	$3,94 \pm 0,87^*$
Лимфоциты, %	$38,31 \pm 4,21$	$25,70 \pm 3,14$	$25,70 \pm 2,17$
Гранулоциты, %	$56,20 \pm 5,23$	$51,10 \pm 4,24$	$51,10 \pm 3,21$
Процент средних клеток, %	$6,20 \pm 1,43$	$10,20 \pm 1,47^{**}$	$9,20 \pm 1,23^{**}$

Таблица составлена авторами по собственным данным

**Примечание:** данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ( $M \pm m$ );

\* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ( $p < 0,01$ );

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ( $p < 0,01$ ).

Компьютерная морфометрия позволяет получить математические характеристики клеточной популяции, а также дает возможность судить об активности внутриклеточных процессов [23]. Для оценки функционального состояния клеток проводили анализ компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов в контрольной группе и опытных группах (в 1-й опытной группе с криоконсервантом при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C и 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре  $-20 \pm 1,0$  °C). Соответствующие данные представлены в таблице 2.

Анализ данных компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов показал, что во 2-й группе (образцы с консервантом, замороженные при  $-20 \pm 1,0$  °C) значительно возросла оптическая плотность цитоплазмы (до  $1,03 \pm 0,01$  у.е.) как по сравнению с контролем ( $0,66 \pm 0,01$  у.е.), так и с 1-й опытной группой ( $0,50 \pm 0,01$  у.е.), что, вероятно, подтверждает увеличение проницаемости в клетку эндоцеллюлярных криоагентов.

Также проводили анализ эритроцитарных показателей в контрольной группе и опытных группах (в 1-й опытной группе с криоконсервантом при температуре  $+20 \pm 1,0$  °C и во 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре  $-20 \pm 1,0$  °C). Соответствующие данные представлены в таблице 3.

При выполнении общего анализа крови были получены значения, свидетельствующие об изменении количественных и расчетных показателей, а именно был достоверно снижен уровень общего гемоглобина

крови как в 1-й, так и во 2-й опытной группе ( $119,25 \pm 4,27$  и  $111,64 \pm 4,42$  г/л) по отношению к группе контроля соответственно.

Также отмечали снижение среднего содержания гемоглобина в эритроцитах в двух опытных группах в сравнении с контрольной группой. Данные показатели имеют тенденцию к снижению, что косвенно отражает картину предразведения исследуемой пробы, однако можно сказать, что консервант в условиях комнатной температуры не приводит к критически значимым изменениям компонентов крови. Снижение как общего гемоглобина, так и его среднего содержания в клетках говорит о процессах повышения трансмембранной проницаемости, при этом данные показатели в опытных группах не выходили за рамки референсного диапазона физиологически допустимых значений.

Сохранность эритроцитов в образцах крови с внешним криоконсервантом (температура  $+20 \pm 1,0$  °C) составила  $89,00 \pm 0,20$  %, при воздействии отрицательных температур ( $-20 \pm 1,0$  °C) —  $92,10 \pm 0,31$  %.

В ходе проведения компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в обеих опытных группах по сравнению с контрольной достоверно увеличивалась площадь клетки в 1-й группе (значение составило  $15,00 \pm 1,22$  мкм<sup>2</sup>), во 2-й группе —  $22,00 \pm 1,45$  мкм<sup>2</sup> против  $14,00 \pm 2,10$  мкм<sup>2</sup> в контроле. Значение среднего диаметра клетки имеет тенденцию к увеличению и в 1-й группе составляет  $6,11 \pm 0,91$  мкм, во 2-й группе —  $9,04 \pm 1,34$  мкм в сравнении

Таблица 2. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов в группах исследований

Свойства объекта	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	70,00 ± 4,16	59,00 ± 5,23	60 ± 5,92
Формфактор клетки, %	14,11 ± 5,12	18,01 ± 3,84	16,7 ± 4,33
Индекс поляризации клетки, %	0,16 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Оптическая плотность цитоплазмы, у.е.	0,66 ± 0,01	0,50 ± 0,01**	1,03 ± 0,01**
Площадь ядра, мкм <sup>2</sup>	52,00 ± 5,32	40,00 ± 4,88**	38 ± 4,41**
Форм-фактор ядра, %	14,30 ± 3,41	13,10 ± 2,88	11,4 ± 3,23
Поляризация ядра, %	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Ядерно-клеточное отношение, %	0,74 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,63 ± 0,01
Доля дополнения ядра, %	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ( $M \pm m$ );

\* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ( $p < 0,01$ );

♦ статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ( $p < 0,01$ ).

Таблица 3. Эритроцитарные показатели ОАК в группах исследований

Показатели ОАК	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,62 ± 0,24	4,08 ± 0,22	3,75 ± 0,41
Гемоглобин, г/л	131,00 ± 5,34	119,25 ± 4,27*	111,64 ± 4,42**
Средний объем эритроцита, фл	86,30 ± 4,36	84,30 ± 4,11	81,70 ± 3,47
Гематокрит, %	39,3 ± 1,55	35,40 ± 1,45	32,20 ± 1,27
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, пг	28,50 ± 0,30	26,20 ± 1,47*	23,70 ± 1,25**
Насыщение эритроцита гемоглобином, г/л	336,00 ± 29,74	311,00 ± 23,37	305,00 ± 19,89
Степень отклонения размера эритроцитов, %	12,20 ± 1,65	11,70 ± 1,44	10,50 ± 1,47

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ( $M \pm m$ );

\* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ( $p < 0,01$ );

♦ статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ( $p < 0,01$ ).

Таблица 4. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в группах исследований

Свойства объекта	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	14,00 ± 2,10	15,00 ± 1,22*	22,00 ± 1,45**
Средний диаметр клетки, мкм	6,11 ± 0,91	7,01 ± 1,12	9,04 ± 1,34
Фактор формы, %	0,16 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Поляризация, %	0,66 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,47 ± 0,01
Интегральная оптическая плотность (Кра), мкм <sup>2</sup>	52,00 ± 2,18	40,00 ± 2,25	38,00 ± 1,43
Интегральная оптическая плотность (Зел), мкм <sup>2</sup>	14,30 ± 2,15	13,10 ± 1,49	12,10 ± 1,43
Интегральная оптическая плотность (Син), мкм <sup>2</sup>	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01

Таблица составлена авторами по собственным данным

**Примечание:** данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ( $M \pm m$ );

\* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ( $p < 0,01$ );

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ( $p < 0,01$ ).

Таблица 5. Тромбоцитарные показатели ОАК в группах исследований

Показатели ОАК	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	230,08 ± 6,31	198,60 ± 5,36*	181,5 ± 5,71**
Средний объем тромбоцитов, фл	8,24 ± 1,31	7,56 ± 1,47	6,13 ± 1,54
Тромбокрит, %	2,23 ± 0,65	2,10 ± 0,74	2,03 ± 0,14
Коэффициент больших тромбоцитов, %	17,38 ± 3,31	21,24 ± 2,36	20,12 ± 3,51

Таблица составлена авторами по собственным данным

**Примечание:** данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ( $M \pm m$ );

\* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ( $p < 0,01$ );

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ( $p < 0,01$ ).

с группой контроля  $7,01 \pm 1,12$  мкм. Увеличение как площади, так и диаметра эритроцитов свидетельствует о возможном повышении проницаемости в клетку примененного криоагента. Соответствующие данные представлены в таблице 4.

При сравнительном анализе тромбоцитарных показателей достоверно снижалось количество тромбоцитов. В 1-й группе значение составляло  $(198,60 \pm 5,36) \times 10^9/\text{л}$ , во 2-й группе  $(181,50 \pm 5,71) \times 10^9/\text{л}$  против контрольных значений на уровне  $(230,08 \pm 6,31) \times 10^9/\text{л}$ . Снижение количества клеток, вероятнее всего, обусловлено увеличением объема исследуемой пробы на фоне внесения криоконсерванта. В то же время отмечена тенденция к увеличению коэффициента больших тромбоцитов в обеих опытных группах в сравнении с группой контроля, соответствующие данные приведены в таблице 5.

Сохранность тромбоцитов в образцах крови с внесленным криоконсервантом (температура  $+20 \pm 1,0$  °C) составила  $86,20 \pm 0,31\%$ , при воздействии отрицательных температур ( $-20 \pm 1,0$  °C) —  $91,40 \pm 0,52\%$ .

Предположительно криоконсервант в какой-то степени активирует тромбоциты, что сопровождается их увеличением, однако все исследуемые показатели находились в диапазоне допустимых физиологических значений, следовательно, наблюдали реакцию адаптации тромбоцитов на воздействие чужеродного компонента, в частности криоконсерванта.

В ходе проведения компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в группах исследований отмечали статистически значимое увеличение площади клеток по сравнению с контролем, причем более выраженное в образцах 1-й группы (с внесленным исследуемым криоконсервантом) на уровне  $11,85 \pm 1,15$  мкм<sup>2</sup>, 2-й группы (с внесленным криоконсервантом и замораживанием) — на уровне

$9,12 \pm 1,12$  мкм<sup>2</sup>. Следует отметить, что, несмотря на существенные межгрупповые различия, данный показатель отражает картину активности площади тромбоцитов с последующей адаптацией после заморозки. Отмеченные изменения находились в диапазоне физиологических референсных значений. Соответствующие данные представлены в таблице 6.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнительном анализе показателей ОАК в опытных группах с внесением криоконсерванта (вне зависимости от температурных условий сохранения образцов крови) установлено достоверное снижение общего количества лейкоцитов, что, вероятно, обусловлено изменением соотношения жидкой части крови и форменных элементов в условиях введения криоконсерванта и сопряжено со снижением распознавания лейкоцитарных клеток анализатором крови. При этом было отмечено достоверное увеличение процента содержания средних клеток в образцах с температурой консервации  $-20 \pm 1,0$  °C. Вероятно, это связано с изменением морфологии лейкоцитов, на что указывают изменения в оптической плотности цитоплазмы лейкоцитов, выявленные при компьютерной цитоморфометрии. Данные изменения могут быть связаны и с эффектом влияния криоконсерванта, однако в образцах, подвергшиеся замораживанию, показатели были более стабильны.

При сравнительном анализе эритроцитарных показателей в группах с внесением криоконсерванта как в условиях положительной температуры, так и при замораживании образцов установлено достоверное снижение общего гемоглобина крови, среднего содержания гемоглобина в эритроцитах, при этом статистически значимых

Таблица 6. Показатели компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в группах исследований

Свойства объекта	Контрольная группа <i>n</i> = 10	1-я опытная группа <i>n</i> = 10	2-я опытная группа <i>n</i> = 10
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	7,70 ± 1,23	11,85 ± 1,15*	9,12 ± 1,12**
Мин. диаметр, мкм	2,65 ± 0,15	2,83 ± 0,54	2,72 ± 0,71
Макс. диаметр, мкм	4,03 ± 0,43	4,94 ± 0,33	4,81 ± 0,25
Ср. диаметр, мкм	3,44 ± 0,27	3,92 ± 0,78	3,88 ± 0,31
Фактор формы, %	12,90 ± 2,10	14,87 ± 2,88	13,10 ± 1,97

Таблица составлена авторами по собственным данным

**Примечание:** данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ( $M \pm m$ );

\* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ( $p < 0,01$ );

♦ статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ( $p < 0,01$ ).

изменений в концентрации эритроцитов не выявлено, что говорит об эффективности примененного криопротектора. В то же время по данным компьютерной цитоморфометрии увеличение площади клетки эритроцита и тенденция к увеличению среднего диаметра клетки и фактора формы эритроцитов в образцах с криоконсервантом и последующим замораживанием подтверждает трансмембранное проникновение криоагентов внутрь клеток.

При анализе тромбоцитарных показателей установлено, что в крови с внесенным криоконсервантом (+20 ± 1,0 °C) статистически значимо снижалась концентрация тромбоцитов, что связано с изменением соотношения клеток к жидкой части крови. Отмечено более выраженное снижение показателя в образцах, сохранявшихся в условиях отрицательных температур, по сравнению с образцами первой группы (внесенным криоконсервантом и температурой +20 ± 1,0 °C), при этом его изменения не выходили за границы физиологической нормы. Тем самым применение данного способа консервации крови может быть использовано в формировании криоконсервированного банка тромбоцитарного гемоконцентрата. При компьютерной цитоморфометрии тромбоцитарных клеток установлено статистически значимое увеличение площади клетки. Скорее всего, увеличение данного показателя объясняется тем, что тромбоцит запускает процессы активации в ответ на контакт с чужеродным агентом в виде криоконсерванта. В то же время в образцах крови 2-й группы также с внесенным криоконсервантом, но при замораживании мы регистрировали менее выраженное увеличение площади тромбоцита, что, по всей видимости, объясняется запуском процессов адаптации к криоконсерванту при воздействии отрицательных температур, однако выявленная особенность требует дальнейшего изучения.

В ходе исследования в условиях сохранения образцов крови с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре -20 °C увеличивался процент сохранности форменных элементов клеток крови (лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов: 88,6 ± 0,41, 92,1 ± 0,31, 91,4 ± 0,52% соответственно) с сохранением форменных элементов клеток крови в физиологически активном состоянии после оттаивания по сравнению с образцами крови, сохранявшимися при комнатной температуре. Необходимо отметить, что в работах Г.Ю. Кирьяновой и соавт. при использовании в качестве криоконсерванта раствора «Криосин» процент сохранности эритроцитов составил 83,80 ± 4,09% [24]. В работах Н.В. Исаевой и соавт. при оценке жизнеспособности ядросодержащих клеток

в лейкоконцентратах на этапах их получения и замораживания было отмечено, что в жизнеспособном состоянии сохраняется 86,7 % [25]. В работах К.А. Ветошкина и соавт. при замораживании тромбоцитов крови доноров под защитой комбинированного криоконсерванта сохранялась их функциональная активность, но находилась лишь в пределах 63,5—88,8 % [26]. Исследовали также форменные элементы цельной крови после суточного хранения при температуре -40 °C, при этом морфологическая и функциональная сохранность клеток составила: для эритроцитов — 85,30 ± 0,30 %, для тромбоцитов — 75,00 ± 0,71 %, для лейкоцитов — 90,10 ± 0,91 % от значений, зарегистрированных до замораживания [27].

В работах И.Г. Широких и соавт. при исследовании действия полисахаридных фракций на криоконсервированную венозную кровь человека было установлено снижение осмолярности крови человека от 281 до 149 мОсм/л, что обусловлено взаимодействием функциональных групп полисахаридов с осмотически активными веществами плазмы крови и приводило к снижению осмолярности среды и ускорению кристаллизации воды [28]. Лактулоза (как и другие дисахариды) относится к непроницающим криопротекторам, и создает осмотическое давление, которое вызывает дегидратацию клеток и уменьшает степень образования льда внутри клеток. Криоэффект лактулозы, очевидно, близок к действию дисахарида трегалозы, выполняющего функции ингибитора роста кристаллов льда в ходе замораживания и перекристаллизации льда в процессе оттаивания, образуя высоковязкое стеклоподобное состояние [29]. Тем не менее криопротекторный эффект лактулозы еще полностью не определен и нуждается в дальнейшем изучении механизма его криозащитного действия.

Основные результаты исследования нашли свое отражение в патенте на изобретение [30]. Преимуществами использования разработанного нами криопротектора являются: возможность длительного хранения без потери криопротекторных свойств, обеспечение стабилизации форменных элементов клеток крови к воздействию суб-умеренно низкой температуры -20 °C, приготовление криопротектора не требует громоздкого, дорогостоящего оборудования, применение нетоксичного, не проникающего внутрь клетки дисахарида лактулозы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови в образцах с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре -20 °C. Разработанный

криоконсервант является эффективным в условиях замораживания при  $-20^{\circ}\text{C}$ , доступным (все компоненты производятся на территории Российской Федерации), что расширяет спектр применяемых криоконсервантов для проведения анализа морфофункциональных параметров образцов замороженной цельной крови при крупномасштабных исследованиях, для полевой медицины, при хранении биоматериала в длительных экспедициях и отдаленных местностях. Работы, проводимые в таком

направлении, позволят более эффективно использовать аутодонорство во избежание ряда осложнений при переливании компонентов крови.

На наш взгляд, представленные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения лактулозы в качестве криокомпонента для обеспечения сохранности клеток крови при более длительных сроках хранения.

## Литература / References

- Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikolaeva N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One*. 2021;16(7): e0255114. <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*. 2021;19(1):56. <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. <https://doi.org/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;2:1-14. <https://doi.org/10.1155/2021/9990709>
- Заикина ЕВ, Гончарова АС, Позднякова ВВ, Пандова ОВ, Пржедецкий ЮВ, Воловик ВГ и др. Обзор современных методов криоконсервации различных видов биологического материала. *Современные проблемы науки и образования*. 2022;4:135. Zaikina EV, Goncharova AS, Pozdnyakova VV, Pandova OV, Przhedetskiy YV, Volovik VG, et al. Review of modern methods of cryopreservation of various types of biological material. *Modern problems of science and education*. 2022;4:135 (In Russ.). <https://doi.org/10.17513/spno.31790>
- Тимохина ОВ, Гончаров АЕ. Характеристика криопротекторов, используемых для долговременного хранения донорских дендритных клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2021;3:102-8. Timohina OV, Hancharou AY. Characteristics of cryoprotectors used for long-term storage of donor dendritic cells. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2021;3:102-8 (In Russ.). <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-102-108>
- Силукова ЮЛ, Станишевская ОИ, Плешанов НВ, Курочкин АА. Эффективность использования комбинаций сахаридов в средах для криоконсервации спермы петухов. *Сельскохозяйственная биология*. 2020;55(6):1148-58. Silyukova YI, Stanishevskaya OI, Pleshanov NV, Kurochkin AA. Efficiency of using a combination of mono- and disaccharides in a diluent for freezing rooster semen. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2020;55(6):1148-58 (In Russ.). <https://doi.org/10.15389/agrobiologiya.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. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2021.01.003>
- 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. *EMBO Rep*. 2021;22(3):52162. <https://doi.org/10.15252/embr.202052162>
- Whaley D, Damiyank K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 2021;30:963689721999617. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- Ma J, Zhang X, Cui Z, Zhao M, Zhang L, Qi H. Investigation into antifreeze performances of natural amino acids for novel CPA development. *J Mater Chem B*. 2023;11(18):4042-9. <https://doi.org/10.1039/d3tb00131h>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.1c00995>
- Кит ОИ, Гненная НВ, Филиппова СЮ, Чембарова ТВ, Лысенко ИБ, Новикова ИА и др. Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(11):3691. Kit OI, Gnennaya NV, Filippova SYu, Chembarova TV, Lysenko IB, Novikova IA, et al. Cryostorage of peripheral blood hematopoietic stem cells in transplantology: current status and prospects. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(11):3691 (In Russ.). <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2023-3691>
- Dou M, Lu C, Sun Z, Rao W. Natural cryoprotectants combinations of l-proline and trehalose for red blood cells cryopreservation. *Cryobiology*. 2019;91:23-9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.002>
- Craveiro R, Castro V, Viciosa M, Dionísio M, Reis R, Duarte A, et al. Influence of natural deep eutectic systems in water thermal behavior and their applications in cryopreservation. *Journal of Molecular Liquids*. 2021;329:115533. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115533>
- Бордин ДС, Индейкина ЛХ, Винницкая ЕВ, Данилов МА, Сабельникова ЕА. Лактулоза: преимущества и место препарата в клинических рекомендациях. *Эффективная фармакотерапия*. 2023;19(35):42-9. Bordin DS, Indeikina LKh, Vinnitskaya EV, Danilov MA, Sabelnikova EA. Lactulose: The Advantages and Place of the Drug in Clinical Recommendations. *Effective pharmacotherapy*. 2023;19(35):42-9 (In Russ.). <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2023-19-35-42-49>
- Ait-Aissa A, Aider M. Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2014;49(5):1245-53. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12465>
- Рябцева СА, Храмов АГ, Будкевич РО, Анисимов ГС, Чулко АО, Шпак МА. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы. *Вопросы питания*. 2020;89(2):5-20. Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Budkevich RO, Anisimov GS, Chuklo AO, Shpak MA. Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose. *Voprosy pitaniia*. 2020;89(2):5-20 (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10012>
- 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. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovad008>
- Сидоркевич СВ, Гришина ГВ, Ремизова МИ, Красильщикова ИВ, Юдина ВА, Колесов АА. Влияние отрицательных температур, криопротекторов и криоконсервантов на структурно-функциональное состояние клеток крови. *Трансфузиология*. 2022;4:374-88. Sidorkevich SV, Grishina GV, Remizova MI, Krasilshchikova IV, Yudina VA, Kolesov AA. Influence of negative temperatures, cryoprotectors and cryopreservatives on the structural and

- functional state of blood cells. *Transfusiology*. 2022;4:374-88 (In Russ.).  
EDN: [IKXPOP](#)
21. Dayal R, Beyls E, Vral A, Baeyens A. The Micronucleus Assay on Cryopreserved Whole Blood. *J Vis Exp*. 2024;204.  
<https://doi.org/10.3791/65855>
  22. Blackwell AD, Garcia AR, Keivanfar RL, Bay S. 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.  
<https://doi.org/10.1002/ajpa.24251>
  23. Давыдкин ИЛ, Федорова ОИ, Захарова НО, Селезнев АВ. Компьютерная морфометрия лимфоцитов периферической крови у больных пневмонией различного возраста. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2010;12(7):1737-41.  
Davydkin IL, Fyodorova OI, Zaharova NO, Seleznyov AV. Computer morphometry of peripheral blood lymphocytes at patients of different age with pneumonia. *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2010;12(7):1737-41 (In Russ.).
  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;1:72-8.  
Kiryanova GYu, Volkova SD, Kasyanov AD, Grishina GV, Golovanova IS, Chechetkin AV. Cryopreservation of erythrocytes at  $-40^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ . *Bulletin of the International Academy of Cold*. 2017;1:72-8 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.21047/1606-4313-2017-16-1-72-78>
  25. Исаева НВ, Минаева НВ, Утемов СВ, Шерстнев ФС, Зорина НА, Змеева ЮС и др. Жизнеспособность ядросодержащих клеток в лейкоконцентрах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(2):46–52.  
Isaeva NV, Minaeva NV, Utemov SV, Sherstnev PhS, Zorina NA, Zmeeva YuS, et al. Viability of mononuclear cells in leukocyte concentrates at the stages of their preparation, freezing, and thawing. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(2):46–52 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>
  26. Ветошкин КА, Утемов СВ, Шерстнев ФС, Князев МГ, Костяев АА. Результаты криоконсервирования донорских тромбоцитных концентратов при низких и ультранизких температурах. *Трансфузиология*. 2015;2(16):22-7.  
Vetoshkin KA, Utemov SV, Sherstnev PhS, Knyazev MG, Kostyaev AA. Results of donors' blood platelets concentrates cryopreservation at low and ultra-low temperatures. *Transfusiology*. 2015;2(16):22-7 (In Russ.).  
EDN: [VVHTIX](#)
  27. Власов АА, Андрусенко СФ, Денисова ЕВ, Эльканова АБ, Каданова АА, Мельченко ЕА и др. Морфофункциональное состояние криоконсервированных форменных элементов крови при умеренно низких температурах. *Вестник РГМУ*. 2024;(5).  
Vlasov AA, Andrusenko SF, Denisova EV, Elkanova AB, Kadanova AA, Melchenko EA, et al. Morphofunctional state of cryopreserved blood cells at moderate low temperature. *Bulletin of RSMU*. 2024;(5) (In Russ.).  
<https://doi.org/10.24075/vrgmu.2024.038>
  28. Широких ИГ, Полежаева ТВ, Широких АА, Худяков АН, Сергушкина МИ, Назарова ЯИ и др. Криозащитные свойства полисахаридсодержащей фракции *Hericium erinaceus* БП 16. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2020;1:5–11.  
Shirokikh IG, Polezhaeva TV, Shirokikh AA, Khudyakov AN, Sergushkina MI, Nazarova JI, et al. Cryoprotective Properties of the Polysaccharide Fraction of the Mushroom *Hericium erinaceus* BP 16. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Biological Series*. 2020;(1):5–11 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.31857/s0002332920010129>
  29. Murray A, Kilbride P, Gibson M. Trehalose in cryopreservation. Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities. *RSC Med. Chem*. 2024;15:2980–95.  
<https://doi.org/10.1039/D4MD00174E>
  30. Андрусенко СФ, Власов АА, Рыбчинская ЭЕ, Сорокина УЕ. Криопротектор для цельной крови. Патент Российской Федерации № 2816446; 2024.  
Andrusenko SF, Vlasov AA, Rybchinskaya EE, Sorokina UE. Cryoprotector for whole blood. Patent of the Russian Federation № 2816446; 2024 (In Russ.).

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.А. Власов — проведение экспериментов, статистический анализ данных, написание текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; С.Ф. Андрусенко — планирование экспериментов, написание текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; О.И. Анфиногенова — анализ и интерпретация данных; А.Б. Эльканова — анализ и интерпретация данных; А.А. Каданова — критический обзор на предмет важного интеллектуального содержания; У.Е. Сорокина — проведение экспериментов; Э.Е. Рыбчинская — проведение экспериментов; Д.А. Доменюк — участие в техническом редактировании рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

## ОБ АВТОРАХ

**Власов Александр Александрович**, канд. мед. наук  
<https://orcid.org/0000-0002-4598-8994>  
[alecs-aspirini@yandex.ru](mailto:alecs-aspirini@yandex.ru)

**Андрусенко Светлана Федоровна**, канд. биол. наук, доцент  
<https://orcid.org/0000-0002-9588-6902>  
[svet1677@yandex.ru](mailto:svet1677@yandex.ru)

**Анфиногенова Оксана Ивановна**, канд. биол. наук, доцент  
<https://orcid.org/0000-0001-6629-5647>  
[zaxana@bk.ru](mailto:zaxana@bk.ru)

**Эльканова Айшат Борисовна**, канд. мед. наук  
<https://orcid.org/0000-0001-8707-515X>  
[aishat.elkanowa@yandex.ru](mailto:aishat.elkanowa@yandex.ru)

**Каданова Анна Анатольевна**  
<https://orcid.org/0000-0003-1517-345X>  
[varmina82@mail.ru](mailto:varmina82@mail.ru)

**Сорокина Ульяна Евгеньевна**  
<https://orcid.org/0009-0000-4336-4021>  
[ulianasorokina100920@gmail.com](mailto:ulianasorokina100920@gmail.com)

**Рыбчинская Эльвира Евгеньевна**  
<https://orcid.org/0009-0000-0865-2554>  
[rybchinskaya\\_elvira@mail.ru](mailto:rybchinskaya_elvira@mail.ru)

**Доменюк Дмитрий Анатольевич**, д-р. мед. наук, профессор  
<https://orcid.org/0000-0003-4022-5020>  
[domenyukda@mail.ru](mailto:domenyukda@mail.ru)