

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр  
«Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»  
Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения  
Российской академии наук

На правах рукописи

Сергушкина Марта Игоревна  
ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ И  
ТРОМБОЦИТОВ К ХОЛОДОВОМУ СТРЕССУ В ПРИСУТСТВИИ  
ПОЛИСАХАРИДОВ

1.5.5. – Физиология человека и животных

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель –  
доктор биологических наук, доцент  
Полежаева Татьяна Витальевна

Сыктывкар 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1 ПОЛИСАХАРИДЫ И ИХ РОЛЬ В ПОВЫШЕНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК К ОХЛАЖДЕНИЮ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b> .....	13
1.1 Функциональные и морфологические изменения в клетках, вызванные воздействием холодового стресса. Теории и концепции криоповреждений клеток .....	13
1.2 Физиологическая активность полисахаридов .....	22
1.3 Практическое использование углеводов в качестве компонентов криозащитных сред для повышения физиологической устойчивости клеток.....	33
<b>ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	42
2.1 Материалы исследования .....	42
2.2 Характеристика объекта исследования .....	43
2.3 Криоскопический метод .....	44
2.4 Методы оценки структурно-функционального состояния лейкоцитов .....	45
2.5 Методы оценки структурно-функционального состояния тромбоцитов .....	47
2.6 Методы статистического анализа .....	49
<b>ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	50
3.1 Оценка изменения температуры замерзания воды в растворах криопротекторов и биологической жидкости в присутствии полисахаридов .....	50

3.2 Оценка параметров сохранности структурно-функционального состояния лейкоцитов крови, перенесших воздействие отрицательных температур $-20^{\circ}\text{C}$ и $-80^{\circ}\text{C}$ в присутствии полисахаридов .....	59
3.3 Оценка параметров сохранности структурно-функционального состояния тромбоцитов, перенесших воздействие отрицательной температуры $-80^{\circ}\text{C}$ в присутствии полисахаридов .....	68
<b>ГЛАВА 4 ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИСАХАРИДОВ (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ) .....</b>	<b>71</b>
4.1 Роль полисахаридов в процессах кристаллизации воды .....	72
4.2 Структурно-функциональная сохранность лейкоцитов и тромбоцитов при действии отрицательных температур в присутствии полисахаридов .....	76
4.3 Совместное криозащитное действие протектора и полисахарида .....	85
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>90</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>91</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>92</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>93</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Выраженный интерес к проблеме сохранения биологических объектов вне организма человека и животных в последние годы проявляют исследователи разного профиля. Эффективным способом считается введение клеток в состояние обратимого холодового анабиоза (Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Svedentsov et al., 2008; Степанова, 2010; McCullough et al., 2010; Полежаева, 2013; Büyükleblebici et al., 2014; Fry et al. 2015; Красильникова, 2018; Hawkins et al., 2018; Mitrus et al., 2018; Akiyama et al., 2019; Streczynski et al., 2019; Jahan et al., 2020; Al-Mutary, 2021). Однако при охлаждении биологических объектов клетки подвергаются воздействию различных повреждающих факторов: образованию кристаллов льда (экзо- и эндоцеллюлярного происхождения), избыточной дегидратации, гиперконцентрации солей, изменению pH среды и электрофизических характеристик мембран (Wolfe and Bryant, 2001; Wolfe et al., 2002; Mazur et al., 2004; Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Svedentsov et al., 2008; Лаптев, 2010; Степанова, 2010; He, 2011; Svedentsov et al., 2012; Полежаева, 2013; Balcerzak et al., 2014; Streczynski et al., 2019). Механизмами, ограничивающими степень повреждения биообъектов при холодном стрессе, являются: температурозависимые структурные переходы межфазно модифицированной воды, регулирующей стабильность и подвижность компонентов мембран; фазовые переходы аннулярных липидов в микродоменах систем, обогащенных холестерином и другими липофильными спиртами и основной массы липидного слоя в системах с низким уровнем холестерина (Белоус и Грищенко, 1994; Худяков, 2010; Wang et al., 2021).

При охлаждении ведущая роль в повреждении клеточных структур принадлежит функциональным изменениям цитоплазматических мембран и мембран органелл. Эти нарушения обусловлены фазовыми превращениями белков и липидов, что приводит к угнетению барьерных свойств мембраны и потерей цитоплазмой ионов и биомолекул (Белоус и Грищенко, 1994;

Варнавский, 2013). Результатом формирования обширных трансмембранных дефектов является спонтанный лизис клетки. В случае образования крошечных дефектов, сопоставимых по размерам с катионной проницаемостью, клетка способна восстановить свою целостность полностью (Белоус и Грищенко, 1994; Гринштейн и Кост 2001; Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Svedentsov et al., 2008; Худяков, 2010; Степанова, 2010; Lenné et al., 2010; Полежаева, 2013; Kent et al., 2015; Rekha et al., 2021; Студенческая библиотека – онлайн «Studbooks.net», 2013).

В настоящее время определены следующие эффективные приемы для повышения физиологической устойчивости клеток к холодовому стрессу: использование различных скоростей охлаждения и оттаивания биообъектов, что позволяет влиять на характер кристаллизации, размеры и структуру кристаллов льда, добавление в биологические системы криопротекторов, антиоксидантов, мембранопротекторов и других средств, максимально снижающих негативные влияния физико-химических факторов на жизнеспособность клеток.

Используемые в настоящее время криопротекторы представляют собой цитотоксичные при физиологических температурах органические растворители (этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин, диметилсульфоксид), которые необходимо удалять после оттаивания биообъекта. Кроме того, стандартные криопротекторы не способны предотвратить перекристаллизацию льда и развитие окислительного стресса (Fuller et al., 2004; Oldenhof et al., 2013; Sieme et al., 2016; Eliott et al., 2017; Студенческая библиотека – онлайн «Studbooks.net», 2013). Необходимы новые эффективные биосовместимые криопротекторы. Значительное разветвление углеводных цепей и содержание большого количества функциональных -ОН и -COОН групп позволяет предположить наличие криозащитного эффекта у полисахаридов. Данные вещества соответствуют основным требованиям, предъявляемым к криопротекторам: нетоксичны (отмывания от биообъекта после отогрева не требуется), не вызывают разрушения клеточных мембран и

органелл, не имеют неприятного запаха, способны ингибировать эндо- и экзогенные патоксидантные процессы, обладают высокой биосовместимостью (Zaitseva et al., 2020, 2022).

**Степень разработанности темы исследования.** Полисахариды обладают широким спектром физиологического действия, однако в научной литературе информация о криозащитных свойствах полисахаридов весьма ограничена. В рамках всестороннего изучения химического строения и физиологической активности пектиновых веществ растений европейского Севера России (Оводов, 2006; Popov et al., 2005-2007) исследовательской группой под руководством доктора медицинских наук профессора Е.П. Сведенцова (Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН) с 2008 года начаты исследования по изучению криопротекторных свойств полисахаридов. Установлено, что пектиновый полисахарид лемнан из ряски малой *Lemna minor* L., водного растения северных территорий России, а также пектиновый полисахарид комаруман из сабельника болотного *Comarum palustre* L., произрастающего в заболоченных местах европейского Севера России, обладают криозащитным действием, что способствует сохранности мембран лейкоцитов крови человека в условиях температуры переохлаждения  $-10^{\circ}\text{C}$  (Svedentsov et al., 2008) и субумеренно-низкой температуры  $-20^{\circ}\text{C}$  (Svedentsov et al., 2012). Криозащитным действием обладает также пектиновый полисахарид танацетан из пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. Наличие танацетана в замораживаемых до  $-20^{\circ}\text{C}$  клеточных средах (лейкоциты, тромбоциты, дрожжевые клетки) позволяет снизить концентрацию криопротектора глицерина или диметилацетамида в составе комбинированного криоконсерванта без снижения его криозащитного действия (Svedentsov et al., 2012). Перспективным направлением в криоконсервации биологических объектов может быть использование пектинового полисахарида, полученного не только из растительного сырья, но и из каллуса. В частности, пектин раувольфиан из каллуса раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex. Kurz обеспечивает высокую

сохранность ядродержащих клеток крови в широком диапазоне отрицательных температур  $-20^{\circ}\text{C}$ ÷  $-80^{\circ}\text{C}$  (Polezhaeva et al., 2014; Zaitseva et al., 2017, 2018; Khudyakov et al., 2019). Ну J. и соавторы (2009) показали, что полисахарид из *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino защищает сперму хряка от повреждений, вызванных криоконсервацией. Механизм криозащитного действия полисахаридов до настоящего времени не установлен.

**Цель исследования.** Изучить физиологическую устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому стрессу в присутствии полисахаридов.

**Задачи исследования:**

1. Определить влияние полисахаридов на температуру кристаллизации воды в растворах классических криопротекторов, биологической среде и при их смешивании.

2. Оценить параметры структурно-функциональной сохранности мембран лейкоцитов и тромбоцитов, подвергнутых низкотемпературному воздействию ( $-20^{\circ}\text{C}$ ;  $-80^{\circ}\text{C}$ ) под защитой криопротектора и полисахарида, определить его эффективную концентрацию в биологической среде.

3. Выявить возможные сроки нахождения лейкоцитов и тромбоцитов крови человека в состоянии обратимого холодового анабиоза при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  под защитой криопротектора и полисахарида.

4. Предложить научную гипотезу о совместном криозащитном действии криопротектора и полисахарида.

**Научная новизна исследования.** Впервые показано, что полисахариды (0.1 – 1.0%) не оказывают влияния на температуру замерзания дистиллированной воды, но смещают значение данного параметра в область более отрицательных температур в растворе протектора глицерина или в область более положительных температур в клеточной среде с глицерином.

Физиологическая устойчивость клеток (лейкоцитов, тромбоцитов) к факторам холодового ( $-20^{\circ}\text{C}$ ;  $-80^{\circ}\text{C}$ ) стресса повышается при

комбинировании в составе криозащитной среды криопротектора глицерина с полисахаридом.

Впервые показано, что глицерин совместно с пектином танацетаном из пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. или с пектином из алоэ древовидного *Aloe arborescens* Mill., или с яблочным пектином AU-701, или с полисахаридами ксилотрофного базидиального гриба *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. обеспечивают морфофункциональную сохранность мембран лейкоцитов крови человека в условиях температуры ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) в течение 7 суток экспозиции.

Впервые выявлено, что морфофункциональную сохранность мембран лейкоцитов крови человека в течение 21 суток экспозиции в условиях низкой температуры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) обуславливает комбинирование глицерина с яблочным пектином AU-701.

Впервые установлено, что сохранность мембран и функции тромбоцитов крови человека в условиях низкой температуры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) в течение 30 суток экспозиции обеспечивает глицерин совместно с пектином танацетаном или с яблочным пектином AU-701.

Предложена гипотеза о совместном криозащитном действии глицерина и полисахарида. Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодному стрессу может быть обусловлена способностью полисахарида к комплексообразованию с молекулами воды и глицерина, что при охлаждении биологической среды обеспечивает эффективную дегидратацию, упорядоченное кристаллообразование и предупреждает критические изменения в мембранах клеток.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты исследования способствуют формированию холодовых теорий повреждений и защиты клеток, указывая на тот факт, что полисахариды обладают способностью усиливать криозащитное действие глицерина, что позволит уменьшить его концентрацию в биологической среде и исключить из протоколов криоконсервирования процедуру удаления протектора из клеточных

суспензий перед их применением. Полученные данные рекомендуется использовать при разработке новых способов криоконсервирования биологических объектов в условиях электрических морозильников ( $-20^{\circ}\text{C}$ ;  $-80^{\circ}\text{C}$ ) под защитой криозащитных растворов на основе глицерина и полисахарида. Данная технология рекомендуется для учреждений заготовки и длительного хранения биологического материала в качестве альтернативы к хранению объектов при  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**Легитимность исследования.** Настоящее исследование выполнено в лаборатории криофизиологии крови Института физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН в период обучения в аспирантуре (2018-2022 гг.) и является разделом плановой темы НИР «Влияние природных полисахаридов на устойчивость прокариотических и эукариотических клеток к экстремальным воздействиям» (№ ГР 112 011 800 156-1). Концентраты клеток крови доноров-добровольцев, используемые в работе, были предоставлены автору сторонней организацией (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России) в рамках совместного выполнения раздела научного исследования.

**Методология и методы исследования.** Для написания обзора литературы были использованы общенаучные теоретические методы исследования (анализ, синтез, аналогия, формализация, обобщение и др.). Экспериментальная работа проведена при помощи специальных методов оценки жизнеспособности биологических объектов при холодовом стрессе. Статистическая обработка данных осуществлялась при использовании программного пакета «BioStat 2009 Professional 5.8.4».

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Полисахариды (0.1 – 1.0%) не оказывают влияния на температуру замерзания дистиллированной воды, смещают значение данного показателя в растворе глицерина в область более отрицательных температур или в клеточной среде с глицерином в область более положительных температур.

2. Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к факторам холодового ( $-20^{\circ}\text{C}$ ;  $-80^{\circ}\text{C}$ ) стресса повышается при

комбинировании в составе криозащитной среды криопротектора глицерина с полисахаридом.

3. Ингибирование критических изменений в мембранах клеток при действии отрицательных температур обусловлено образованием комплексов глицерин-полисахарид-вода, что обеспечивает упорядоченное кристаллообразование и эффективную дегидратацию клеток.

**Степень достоверности и апробация работы.** Подтверждением является значительный объем обработанного материала с применением адекватных методов статистического анализа данных, публикацией результатов работы в рецензируемых научных изданиях и представлением на конференциях различного уровня: XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2017), XXIII съезде Физиологического общества им И.П. Павлова (Воронеж, 2017), III Всероссийской (XVIII) молодежной научной конференции «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2018), IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальная гликобиология» (Киров, 2018), II Объединенном научном форуме (VI Съезде физиологов СНГ, VI Съезде биохимиков России, IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 2019)).

Апробация диссертационного исследования состоялась 29.03.2023 г. на заседании ученого совета Института физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (протокол № 2).

**Внедрение.** Полученные результаты используются при реализации дисциплин направления подготовки 06.03.01 Биология и 44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки. Биология, химия) в ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет» (акт внедрения от 01.03.2023), а также в научно-исследовательской работе лаборатории клеточных технологий ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России для разработки новых методов криоконсервирования клеточных суспензий,

востребованных в современной трансфузионной медицине (акт внедрения от 17.03.2023 г.).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация представлена: введением, четырьмя главами, выводами, списком использованных источников. Библиографический список включает 309 источников, 256 из них зарубежных. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста и содержит в себе 9 рисунков и 16 таблиц.

**Личное участие автора в получении результатов.** Автор лично выполнял сбор, анализ и обработку полученных данных. Совместно с руководителем работы сформированы выводы и заключение диссертации, подготовлены научные публикации по исследуемой теме, текст диссертации и автореферата.

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 9 в журналах, рецензируемых научными системами Scopus и WOS.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.5. – физиология человека и животных: п.1. «Изучение закономерностей и механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма.», п.3. «Исследование закономерностей функционирования основных систем организма ( .., крови, ...), п.6. «Изучение механизмов функционирования клеток ....».

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору биологических наук, доценту Татьяне Витальевне Полежаевой за помощь при выполнении работы, сотрудникам отдела иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН за предоставленные пектины и консультационную помощь, сотрудникам лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов Федерального аграрного научного центра Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого (г. Киров) за предоставленные полисахаридные фракции ксилотрофных базидиальных грибов и консультационную помощь, сотрудникам лаборатории клеточных

технологий ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России (г. Киров) за предоставленные концентраты клеток крови доноров-добровольцев и сотрудникам лаборатории криофизиологии крови ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН за оказанную помощь при выполнении всех разделов работы.

# ГЛАВА 1 ПОЛИСАХАРИДЫ И ИХ РОЛЬ В ПОВЫШЕНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК К ОХЛАЖДЕНИЮ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Функциональные и морфологические изменения в клетках, вызванные воздействием холодового стресса. Теории и концепции криповреждений клеток

Реакция различных биологических объектов (клеток, тканей, органов, систем органов) на воздействие факторов различной природы (ультразвуковые волны, электромагнитное поле, различные температуры, лазерное излучение и др.) представляет интерес для широкого круга исследователей в особенности для ученых в области физиологии, биологии, медицины, биотехнологии.

Изменение температуры окружающей среды негативно влияет на все типы организмов. Рассматривая воздействие холода на биологические объекты, необходимо отметить, что адаптацию к этому фактору выработали все типы живых организмов (Гулевский и Релина, 2009). Доказано, что после холодового воздействия в клетках любого уровня организации повышается ионная «проницаемость мембран клеток, изменяется топография распределения поверхностных рецепторов, в органоидах угнетаются процессы энергетического обмена» (Utemov et.al., 2011), «снижается активность дыхательной цепи и процессов окислительного фосфолирования митохондрий, ингибируется выработка АТФ» (Wolfe and Bryant, 2001; Wolfe et al., 2002; Mazur et al., 2004; Девятьярова, 2005; Щеглова, 2005; Svedentsov et al., 2008; Лаптев; 2010; Сведенцов, 2010; Степанова, 2010; Худяков, 2010; Зайцева и др., 2011; He, 2011; Utemov et.al., 2011; Полежаева, 2013; Balcerzak et al., 2014; Streczynski et al., 2019; Студенческая библиотека – онлайн «Studbooks.net», 2013)

Для оценки степени повреждения клеток при действии холодового фактора необходимо отметить ряд необычных свойств воды (Eisenberg and Kauzmann, 2004; Сведенцов, 2007; Жмакин, 2008; Сведенцов, 2010; Зайцева и др., 2011; Svedentsov et al., 2012). Вода в клетке находится в нескольких состояниях: свободная, связанная (упорядоченная или биологическая вода), фиксированная (еще ее называют захороненной или внутренней) (Wolfe et al., 2002; Svedentsov et al., 2008; Сведенцов, 2010; Худяков, 2010; Svedentsov et al., 2012; Mori et al., 2012; Полежаева, 2013), «которая удерживается электростатическими водородными связями во внутренних областях биологических молекул (наличие подтверждено в большинстве глобулярных белков)» (Белоус и Грищенко, 1994). Основная часть свободной воды в клетках превращается в лед в температурном диапазоне от  $-6-10^{\circ}\text{C}$  до  $-20-23^{\circ}\text{C}$  (Сведенцов, 2007, Сведенцов, 2010; Худяков, 2010; Полежаева, 2013).

Фракция связанной воды определяет устойчивость структуры и функции транспортных белков и внутриклеточных ферментов, поэтому если связанная вода не кристаллизуется, то в тканях даже при низких температурах продолжается, но очень медленно, внутримолекулярный обмен, который быстро восстанавливается при положительных температурах (Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Сведенцов, 2007, Лаптев; 2010; Сведенцов, 2010; Сведенцов, 2010; Полежаева, 2013; Хименков и Брушков, 2021).

Поведение биологической воды около гидрофобных или гидрофильных участков биологических молекул полностью меняется относительно поведения жидкости в объеме. Изменение свойств воды вблизи биологической поверхности вызвано перегруппировкой водородных связей – упорядочением молекул воды (Жмакин, 2008), существенно снижается движение молекул воды (Russo et al., 2004) и ее диэлектрическая постоянная (Жмакин, 2008), а также происходит существенное возрастание вязкости жидкости.

Биологическая среда характеризуется сложной микроструктурой. Если в среде нет веществ, которые при охлаждении способны стать центрами начала кристаллизации, в переохлажденном растворе инициируется

нуклеация (Гулевский и Релина, 2009). Последняя наблюдается на мембране клетки, на объектах в цитоплазме (Franks, 2003), следовательно, разрушительное воздействие кристаллов льда полностью затрагивает важные объекты клетки (мембрану, органеллы клетки, цитоскелет и др.).

Важнейшим фактором, от которого зависят разнообразные криоповреждения в клетках, является фазовый переход воды в лед (Девертьярова, 2005; Щеглова, 2005; Худяков, 2010; Полежаева, 2013). Структура воды подвержена влиянию растворенных в ней веществ. Вызываемое растворенными веществами «упорядочение» молекул воды водородными связями приводит к уменьшению их подвижности с выделением тепла. В присутствии одно- и двухвалентных ионов, образующих связи с ионами водорода и гидроксила, число молекул воды в льдоподобных кластерах должно уменьшаться, а их подвижность - увеличиваться за счет поглощения тепла из внешней среды. Следует заметить, что растворенные в воде вещества, независимо от того, оказывают они упорядочивающее или хаотропное действие, могут «конкурировать» с кластерами за «молекулы воды в процессе образования кристаллов льда» (Белоус и Грищенко, 1994; Полежаева, 2013). «Формирование кристаллов льда в водном растворе, также, как и в других растворах, является результатом тепловых флуктуаций. При охлаждении жидкости процесс кристаллизации инициируется при наличии в среде зародышей кристаллов» (Белоус и Грищенко, 1994). «Зародыши кристаллов могут возникнуть в результате спонтанной агрегации молекул воды или их агрегации в присутствии различных примесей, например, белков, метаболитов и т.д.» (Белоус и др., 1985; Белоус и Грищенко, 1994; Полежаева, 2013).

Для большинства клеток отрицательные температуры не вредны, но замораживание часто бывает смертельным. Существует ряд различных механизмов, которые могут вызывать повреждения при воздействии отрицательной температуры, в том числе механические из-за кристаллов льда и осмотические повреждения из-за изменений концентрации электролитов

(Худяков, 2010; Студенческая библиотека – онлайн «[Studbooks.net](http://Studbooks.net)», 2013). «В литературе есть некоторые разногласия относительно того, какие механизмы являются наиболее важными, однако вполне вероятно, что механизмы повреждения различны для разных типов клеток и зависят от проницаемости и липидного состава мембран, внутриклеточного состава» (Худяков, 2010; Полежаева, 2013).

Повреждения, вызванные растущими кристаллами льда, являются механическими и несут в себе разрушение структуры самих клеток. Формирование льда в клетках зависит от скорости охлаждения: медленное охлаждение способствует образованию внеклеточного льда, а быстрое обуславливает кристаллообразование и снаружи, и внутри клетки (Сведенцов и Костяев, 1999; Полежаева, 2013). В клетках всех типов наблюдается разрушение плазматической мембраны, элементов цитоскелета и других компонентов клетки (Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Varbee, 2006; Лаптев, 2010; Степанова, 2010; Худяков, 2010; Полежаева, 2013).

Молекулы воды должны точно выстраиваться друг относительно друга, чтобы сформировать кристаллический лед, а включение любых загрязнителей (солей или других растворенных веществ) нарушает структуру льда. Поэтому, когда образуется кристалл льда, он представляет собой чистый водяной лед с низкой концентрацией других молекул (Oughton et al., 2001; Худяков, 2010; Полежаева, 2013). Образование льда вне клеток приводит к замораживанию и концентрации растворенных веществ в незамороженной фракции. Эта фракция будет иметь более высокую концентрацию солей, сахаров, белков и т.д., чем изотонический раствор. Высокие концентрации растворенных веществ могут привести к фазовым изменениям мембран и повреждению клеток (Gao and Critser, 2000; Wolfe and Bryant, 2001; Mazur et al., 2004; Svedentsov et al., 2012; Полежаева, 2013; Elliott et al., 2017; Zhao and Fu, 2017).

Одним из ключевых моментов для выживания клеток является сохранность свойств мембраны. Без избирательной проницаемости содержимое клетки будет потеряно, что приведет к ее гибели. Липиды,

обеспечивающие структурно-функциональную целостность мембраны, претерпевают фазовые изменения. При охлаждении липиды плазматических мембран переходят в гелеобразную форму. Данное явление обуславливает изменение размеров компонентов мембран и возникновение трансмембранных дефектов (между липидами и белками), что, в свою очередь, увеличивает проницаемость мембраны для ионов. Результатом формирования крупных трансмембранных дефектов может быть спонтанный лизис клетки и повреждение органелл (ядра, митохондрий и др.) Если нарушения незначительные, то клетки способны к восстановлению (Белоус и Грищенко, 1994; Гринштейн и Кост, 2001; Щеглова, 2005; Худяков, 2010; Lenné et al., 2010; Полежаева, 2013; Kent et al., 2015; Rekha et al., 2021; Студенческая библиотека – онлайн «Studbooks.net», 2013). Данный переход приводит не только к «протеканию» мембраны, но и к формированию внутримембранной агрегации и потере белков (Bryant and Koster, 2001; Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Полежаева, 2013). Так же при сильном снижении температуры происходит изменение физических свойств массы липидов и, следовательно, нарушается структура и функции всех типов белков мембраны (интегральные, функциональные, транспортные). Липидный состав плазматической мембраны сперматозоидов является основным фактором, который влияет на криотолерантность и холодовую чувствительность сперматозоидов (Красильникова, 2018). Различия в профиле жирных кислот и соотношении омега-3/омега-6 в сперматозоидах разных видов приводят к разным уровням криотолерантности (Esmaeili et al., 2015; Красильникова, 2018). Осмотически активные вещества способствуют повреждению мембран, что приводит к повышению выхода ионов из клеток (Sa- Ardrit et al., 2006, Полежаева, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). Ядродержащие клетки при воздействии отрицательных температур склонны к адгезии, необратимой агрегации, изменению цитоскелета и ультраструктуры цитоплазмы, отслоению содержимого специфических гранул, разрушению их мембраны и последующему лизису (Rogers et al., 2001; Зайцева и др., 2011).

Повреждающее действие отрицательной температуры вызывает дезорганизацию структуры и нарушение функции мембран компонентов клетки. Изменение липидного компонента биомембран способствует ускорению перекисных процессов, теряется холестерин и нарушается работа всех мембран органоидов. Потеря холестерина мембранами митохондрий, приводит к нарушению протонного транспорта, что обуславливает дисфункцию ферментативных систем, участвующих в процессах окислительного фосфолирования и дыхания (Yáñez-Ortiza et al., 2021).

В настоящее время рассматриваются различные теории и концепции криоповреждений клеток.

Механическая концепция. Самое первое упоминание о гипотезе механического повреждения мембран клеток растущими кристаллами льда было в трудах Н.А. Максимова (1913). Далее она изучается и описывается в работах Ю.А.Иткина (1983), Е.А.Гордиенко (1983) и других ученых. Механическая концепция предполагает: плазматические мембраны устойчивы к кристаллам льда, образующимся с низкой скоростью, при их быстром росте происходит разрыв мембран, особенно органелл (Худяков, 2010; Варнавский, 2013; Полежаева, 2013; Diploma – информационный портал для студентов).

Рекристаллизационная концепция. Многие «авторы считают, что причиной повреждения клеточных структур является не первоначальный процесс замерзания, а процесс отогревания биообъекта, при котором наблюдается увеличение кристаллов льда» (Полежаева, 2013). Н.Т. Мeryman (1971) в своих работах описал то, что избежать разрушения клетки крупными кристаллами льда можно повышением скорости отогревания (Варнавский, 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013). «В этом случае структура мембран не успевает разрушиться, что позволяет избежать активной дегидратации клеток и связанных с ней повреждений» (Полежаева, 2013). Данная концепция используется при технологических операциях, сопровождающихся колебаниями температуры хранения биологических объектов в низкотемпературных банках (Белоус и Грищенко, 1994; Худяков,

2010; Варнавский, 2013; Полежаева, 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013).

«Концепция гиперконцентрированного раствора выдвинута J. E. Lovelock (1953)» (Полежаева, 2013). Согласно этой концепции, при образовании кристаллов льда происходит повышение осмотически активных веществ в среде. «Следствием является нарушение водородных, ионных и гидрофобных связей между компонентами мембран (Полежаева, 2013), в результате чего мембраны теряют часть фосфолипидов и холестерин» (Полежаева, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). В мембране образуются крупные дефекты, которые являются начальным этапом разрушения клеток. (Белоус и Грищенко, 1994; Худяков, 2010; Варнавский, 2013).

«P. Mazur (1970) выдвинул и математически смоделировал двухфакторную концепцию криповреждения клеток» (Белоус и Грищенко, 1994; Полежаева, 2013). «Согласно данной концепции гибель клеток является следствием действия «эффекта раствора» и роста внеклеточного льда» (Полежаева, 2013). «Не менее важную роль играет быстрая скорость замораживания биообъекта, в результате чего охлажденные клетки не успевают дегидратировать и повреждаются внутриклеточными кристаллами льда» (Полежаева, 2013; Варнавский, 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013).

Теория минимального объема клетки. Исследования Н.Т. Meryman (1971) показали, что «дегидратация клеток способствует уменьшению их объема, увеличению осмотичности среды, развитию механического напряжения мембраны, потере барьерных свойств, а затем разрушению клетки» (Полежаева, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia»). «В основе лежит способность плазматической мембраны сжиматься только до определенного уровня, меньше которого она испытывает сопротивление внутриклеточного содержимого» (Полежаева, 2013; Варнавский, 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia»,

2013). Максимальное сжатие мембраны приводит к ее разрыву (Худяков, 2010; Варнавский, 2013; Полежаева, 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013).

«Мембранная концепция описанна в 1994 году в работах А.М. Белоуса и Грищенко» (Полежаева, 2013). Основным механизмом повреждения мембран при охлаждении, замораживании и отогреве являются фазовые переходы липидного и белкового компонентов. Это вызывает «нарушение барьерной функции мембран, утечке из цитоплазмы ионов и биомолекул через трансмембранные дефекты» (Белоус и Грищенко, 1994; Полежаева, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). «Указанные нарушения обусловлены условиями замораживания и структурным состоянием белков цитоскелета» (Белоус и Грищенко, 1994; Худяков, 2010; Варнавский, 2013; Полежаева, 2013; Костяев и др., 2016; Студенческая библиотека – онлайн «Studbooks.net», 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013).

Концепция резонансной гидродинамической волны. Данная концепция В.Ф. Осташко и Ф.И. Осташко (2004) помимо повреждения в клетках, вызванного осмотическими процессами, при воздействии низких отрицательных температур, указывает на удар резонансной гидродинамической волны в качестве причины их гибели (Худяков, 2010; Варнавский, 2013; Полежаева, 2013; Студенческая библиотека – онлайн «Studbooks.net», 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013).

«Большое внимание так же уделяется принципу криообновления - возможности реабилитации и выводу клетки на более высокий уровень» (Варнавский, 2013; Полежаева, 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013).

«Согласно этому принципу огромную важность имеют механизм криообновления за счет цитохрома С» (Полежаева, 2013). Это соединение «включается во внешнюю и внутреннюю митохондриальную мембраны и взаимодействуют с ними» (Грищенко и Белоус, 1994; Алексеевская и

Дроздова, 2005; Варнавский, 2013; Полежаева, 2013; Лань: электронно-библиотечная система, 2013).

Также важное значение имеет отдельный класс функционально сходных белков, экспрессия которых усиливается при различных стрессирующих условиях (в том числе температурного воздействия) (Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Pennell et al., 2005; Srivastava et al., 2005; Полежаева, 2013). Данные белки объединены в отдельную группу - белки теплового шока (Гулевский и Релина, 2003, 2009). Считается, что эти белки действуют как внутриклеточные шапероны в отношении других белков (Полежаева, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). «Белки с молекулярной массой 70 и 90 кДа (БТШ-70 и БТШ-90) относятся к категории самых консервативных белков в клетке. БТШ-70 обладает бактерицидным эффектом» (Слащева и Мурашев, 2010; Полежаева, 2013). Также «БТШ-70 блокирует агрегацию денатурированных молекул белков, связывая их гидрофобные области, которые открываются при денатурации, а также катализируют АТФ-зависимые протеазы для процессов ренатурации белка» (Полежаева, 2013; Карпова, 2015). Шапероны обеспечивают мембранный транспорт в эндоплазматическом ретикулуме и в митохондриях (Полежаева, 2013; Карпова, 2015; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). Они так же препятствуют трансформации РНК (Wouters et al., 2000; Гулевский и Релина, 2009; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013), участвуют в процессах клеточного цикла (рост, холодовая адаптация и др.). В настоящее время известно, «что процессы нуклеации и рекристаллизации контролируются тремя классами белков» (Гулевский и Релина, 2009; Полежаева, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). «Белки-нуклеары, являясь матрицей формирования льда, индуцируют кристаллизацию и препятствуют переохлаждению клетки (обнаружены у прокариот, насекомых, некоторых амфибий и рептилий)» (Полежаева, 2013); «антинуклеирующие белки, напротив, ингибируют формирование кристаллов льда при нуклеации (выявлены у бактерий)» (Полежаева, 2013); «антифризные белки обладают

широким спектром действия: структурируют лед, модифицируют или останавливают рост кристаллов льда» (Полежаева, 2013), «снижают температуру замерзания, ингибируют рекристаллизацию и защищают клеточные мембраны от повреждений» (Полежаева, 2013; Карпова, 2015; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013).

О повреждении клетки свидетельствуют несколько признаков:

– структурные – данные изменения клеток изучаются при помощи гистологических и электронно-микроскопических методов исследования;

– функциональные – к ним относят нарушения, в результате которых происходит прекращение выполнения клеткой основных функций (нарушение сократимости, электрофизиологических процессов, экзо- и эндоцитоза, межклеточных контактов т.д.);

– физико-химические – нарушения со стороны клеточных коллоидов, изменения водно-электролитного обмена (увеличение концентрации в цитоплазме ионов Na и Ca, уменьшение концентрации ионов K, отек органелл и клеток, ацидоз);

– биохимические – все процессы начинают выполняться хаотично (уменьшение концентрации креатинфосфата и АТФ, увеличение продуктов их гидролитического расщепления – креатина, АДФ, увеличение интенсивности процессов дезаминирования и т.д.);

– термодинамические – в данном случае происходят конформационные изменения макромолекул (денатурация), нарушение относительной обособленности внутриклеточных отсеков (декомпартаментализация), распад больших молекул на мелкие.

Таким образом, в основе повреждения клеток под воздействием охлаждения лежит нарушение структуры и функции мембран, приводящее к изменениям внутриклеточного гомеостаза.

## 1.2 Физиологическая активность полисахаридов

Выделение, синтез, структурная модификация полисахаридов и их применение в различных областях, особенно в области биомедицины, в последние годы вызывает повышенный интерес у разных научных направлений.

Полисахариды – это полимерные углеводы, состоящие из повторяющихся мономерных единиц моносахаридов (более чем 10), ковалентно связанных друг с другом посредством гликозидной связи (Liu et al., 2018). Из-за их большого разнообразия по полимолекулярности и структуре с разной функциональностью (Davis and Fairbanks, 2002; Dumitriu, 2004) классификация полисахаридов всегда оставалась большой проблемой для научного сообщества. Общий термин «глюкоза» означает моносахарид, а «гликан» означает полисахарид. В зависимости от типа моносахаридов полисахариды можно разделить на две части: гомополисахариды (гомогликаны) (Ginsberg and Robbins, 1991), которые состоят только из одного вида моносахаридов, таких как целлюлоза или гликоген, и гетерополисахариды (гетерогликаны) (Patnaik et al., 2012), которые могут иметь более двух различных видов моносахаридов, связанных различными гликозидными связями. Наиболее важно то, что в гетерогликанах различные виды моносахаридных единиц расположены не случайным образом, а в виде однородных и определенно повторяющихся структур.

Полисахариды могут существовать в линейной форме с прямой цепью моносахаридов или в разветвленной форме, где от моносахаридной цепи имеются ответвления и повороты, в зависимости от типа присоединенного моносахарида и положения углерода, с которым он связан (Berg et al., 2002). Разветвленных типов существует множество: несколько длинных ветвей, структуры «ветвь на ветвях», сформированные в кластеры, или структуры, похожие на «кусты». В полисахаридной цепи присутствует только один восстанавливающий конец (Maji, 2019).

Линейные полисахариды являются наиболее распространенными в природе и обнаруживаются в основном в высших растениях и морских

водорослях. Однако разветвленные полисахариды также были обнаружены в природе, например, амилопектин (одна из фракций крахмала). Степень полимеризации (количество моносахаридов, связанных в полимерный углевод), молекулярная масса и ее диапазон, могут варьироваться от источника к источнику, так как полисахариды являются полидисперсными (путь биосинтеза полисахаридов не является шаблонным) (Li et al., 2010)

В молекулах полисахаридов к гидроксильным и аминогруппам могут быть присоединены остатки кислот (уксусной, пировиноградной, молочной, фосфорной, серной), либо спиртов (в большинстве случаев метилового). Также эти группы могут быть замещены на  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ .

Царство растений производит в природе множество полисахаридов. Животный мир, водоросли, грибы и бактерии, одноклеточные грибы также одинаково эффективны для производства полисахаридов с различными физико-химическими свойствами (Liu et al., 2015). Растительные источники полисахаридов: пищевые волокна и древесина (целлюлоза, гемицеллюлозы, пектины,  $\beta$ -камеди, инулин, ксилан и др.), травы (пектины, полисахариды женьшеня, астрагала и др.). Полисахариды водорослей и лишайников: сульфатированные полисахариды зеленых, бурых (фукан, галактан) и красных (порфиран) водорослей. Полисахариды бактериального и грибкового происхождения: ксантан, декстран, курдлан, пуллан, геллан, гликан пекарских дрожжей. Полисахариды животного мира – хитин, хитозан, гепарин, гиалуроновая кислота и др.

Полисахариды содержат широкий спектр структурных компонентов, которые находят огромное применение в биомедицине и тканевой инженерии благодаря своей биосовместимости, нетоксичности, легкоусвояемости, биоразлагаемости и некоторым специфическим свойствам, способствующим заживлению ран и доставке лекарств (Luo et al., 2021)

Подобно белкам и полинуклеотидам полисахарид является важным макромолекулярным элементом в жизнедеятельности и играет важную роль в

межклеточной коммуникации, клеточной адгезии и молекулярном распознавании в иммунной системе (Zaitseva et al., 2022).

В частности, доказано, что арабиногалактан, галактоманнан и пектиновые полисахариды, полученные из высших растений,  $\beta$ -глюканы и гликопротеины, полученные из грибов, сульфатированные полисахариды, полученные из морских водорослей, обладают антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью (Petera et al., 2015; Zaitseva et al., 2022; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013).

Недавние исследования показали, что экстракт из грязевой улитки *Bulacta exarata* (Philippi) обладает широким спектром биологических активностей, среди которых особенно отмечают гепатопротекторное, антиоксидантное, противоопухолевое, антигипертоническое и гипохолестеринемическое действие (Zhang et al., 2012; Liu et al., 2013).

На противоопухолевую активность полисахаридов влияет размер молекул, их форма, степень разветвления и растворимость в воде (Shao et al., 2014; Ji et al., 2017; Zhang et al., 2019) Предполагается, что противораковые свойства фукоиданов определяются их химической структурой и, в частности, связаны с их молекулярной массой (Yang et al., 2008; Lu et al., 2018). Кроме того, противораковая активность фукоиданов зависит от комбинации нескольких факторов, таких как количество сульфатных групп, соотношение моносахаридных остатков и типа связывания сахарных остатков (Ermakova et al., 2011; Hsiao et al., 2021). Как правило, чем больше молекулярный вес полисахаридов и чем выше их растворимость в воде, тем более выражено их противоопухолевое действие (Ren et al., 2012).

Полисахариды из ламинарии японской *Laminaria japonica* (Aresch) продемонстрировали значительную противоопухолевую активность в отношении клеток A375 и BGC823 и низкую цитотоксичность для гладкомышечных клеток сосудов (Peng et al., 2012). Пектин зостеран, выделенный из морской травы *Zostera marina* L., оказывал ингибирующее влияние на рост карциномы Эрлиха в лёгких (Лоенко, 1999). Французские

ученые доказали, что противоопухолевая активность зостерана обеспечивается наличием в структуре макромолекулы остатков апиозы. Эти данные свидетельствуют о том, что боковые цепи из остатков D-апиозы в разветвленной области макромолекулы зостерана играют определяющую роль в проявлении им цитотоксической и противоопухолевой активности (Gloaguen et al., 2010).

Некоторые полисахариды могут самостоятельно оказывать химиопротекторный эффект, защищать от прогрессирования рака и метастазирования, вызывать апоптоз в некоторых типах раковых клеток. В подтверждение этому ученые из Ирана провели исследование по влиянию яблочного пектина как потенциального индуктора апоптоза на опухолевые клетки гипофиза крысы GH3/B6 (Attari et al., 2009).

Полисахариды животных и грибов обладают значительным противоопухолевым действием и оказывают его за счет ингибирования роста опухолевых клеток, индукции апоптоза и повышения иммунитета (Zhang et al., 2012; Wu et al., 2017; Pandya et al., 2019; Широких и др., 2020; Barbosa et al., 2020; Xiao et al., 2020). Так, полисахаропептид, полученный из лекарственного гриба *Coriolus versicolor* (L.) Quél., активирует иммунные клетки, увеличивает экспрессию цитокинов и хемокинов (фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкины (IL-1 $\beta$  и IL-6), гистамин, простагландин E), усиливает дендритную и T-клеточную инфильтрацию в опухоли и уменьшает побочные эффекты, связанные с химиотерапией (Chang et al., 2017).

Полисахарид из гриба *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Karst. вызывает торможение роста глиомы (Wang et al., 2018) и активирует клетки макрофагов, усиливая фагоцитоз дозозависимым образом (Zhao et al., 2010; Li et al., 2018; Zeng et al., 2018).

В настоящее время иммуномодулирующая активность полисахаридов является актуальной темой исследований. Основным механизмом, с помощью которого полисахариды защищают клетки, является активация иммунного ответа хозяина (Li et al., 2017). Различные полезные фармакологические

эффекты полисахаридов растений были объяснены их способностью модулировать иммунную функцию макрофагов. Как правило, полисахариды растений могут непосредственно активировать иммунную функцию макрофагов, Т- или В-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров и системы комплемента (Popov et al., 2005; Yu et al., 2013; Yu et al., 2017). С другой стороны, полисахариды могут способствовать выработке цитокинов и, таким образом, обеспечивать многоканальную регуляцию иммунной системы на разных уровнях (Yamada, 2000; Yamada and Kiyohara, 2007; Jin et al., 2008; Sutovska et al., 2009; Gronhaug et al., 2010; Sanogo, 2011; Inngjerding et al., 2013). Известно, что способность пектинов влиять на активность лейкоцитов зависит от степени их этерификации (СЭ). Низкоэтерифицированные (НЭ) цитрусовый и яблочный пектины обладают способностью ингибировать активность лейкоцитов, тогда как высокоэтерифицированные (ВЭ) пектины таким действием не обладают (Попов, 2010; Zaitseva et al., 2020).

Анализ пектиновых полисахаридов, выделенных из растений Европейского Севера России, по влиянию их на клеточный иммунитет показал, что биополимеры, состоящие в основном из остатков галактуроновой кислоты, обладают способностью ингибировать активность лейкоцитов, тогда как наличие боковых углеводных цепей препятствует проявлению такого физиологического эффекта (Popov et al., 2005, Popov et al., 2006, Popov et al., 2007, Markov et al., 2010, Carnachan et al., 2019). Например, для повышения иммуномодулирующей активности высокомолекулярный пектин из *Opilia celtidifolia* (Guill. & Perr.) Endl. ex Walp., имеющий в своем составе арабиногалактан-II, подвергался ферментативному разложению с галактуроназой и частичному удалению арабинозы (Gronhaug et al., 2010). Это подтвердило то, что арабиноза является ингибитором биологического эффекта, как и область галактуронана.

Выявлено, что полисахариды обладают антидиабетической активностью, улучшая метаболизм глюкозы и липидов за счет увеличения секреции инсулина (Cheng et al., 2014; Ma et al., 2015; Tang et al., 2017;

Широких и др., 2020; Zhou et al., 2020). Установлено, что биоактивность пектиновых полисахаридов в отношении сахарного диабета зависит от моносахаридного состава, содержания пептидов, степени этерификации, меж- и внутримолекулярных связей (Chen et al., 2017). Пектин женьшеня обладает выраженной антигипергликемической и антиоксидантной активностью. В ходе исследования авторами выяснено, что пектины женьшеня, богатые доменами HG, RG-II, RG-I и AG, обладают структурно-специфическими механизмами, позволяющими смягчить нарушения в метаболической системе и, следовательно, управлять диабетом (Wang et al., 2003; Wang et al., 2010; Jiao et al., 2014). Y. Liu и соавторы провели исследование антидиабетической активности цитрусового пектина у крыс с СД2 типа. Установлено, что после 4 недель введения цитрусового пектина у животных снизился уровень глюкозы, улучшилась толерантность к глюкозе, содержание гликогена в печени, уровень липидов в крови, снизилась резистентность к инсулину (Liu et al., 2016).

Исследования показали, что полисахариды обладают антиоксидантным и антикоагулянтным действиями (Zaitseva et al., 2020). Антикоагулянтная активность является важной физиологической способностью сульфатированных полисахаридов, они наиболее распространены в морских беспозвоночных и морских водорослях (Groth and Wagenknecht, 2001; Vongchan et al., 2002; Huynh et al., 2011; Raposo et al., 2013; Raposo and Morais, 2015; Tang et al., 2017; Zaitseva et al., 2022). Большинство полисахаридов после сульфатированной модификации проявляют действие, аналогичное гепарину, которое при отсутствии антитромбоцитарной активности позволяет избежать побочных эффектов, вызванных гепарином. Фракции полисахаридов (GSP-1, GSP-2 и GSP-3), полученные из горечавки шероховатой *Gentiana scabra* Bunge, продемонстрировали наивысшую антикоагулянтную активность и, как ожидается, будут применяться в клинических условиях (Cai et al., 2016). Химически сульфатированные полисахариды, такие как манногалактан гриба *Agaricus brasiliensis* Wasser, M. Didukh, Amazonas & Stamets, пектин

цитрусовых и глюкурономаннан, проявляют антикоагулянтную и антитромботическую активность (Vityazev et al., 2010, Yue et al., 2018). При этом необходимо учитывать, что специфическая антикоагулянтная активность сульфатированных пектинов зависит от вида растения, состава моносахаридов пектина и степени сульфатирования.

Полисахариды, обладающие способностью улавливать свободные радикалы, представляют собой в настоящее время многообещающий источник антиоксидантов. В нормальных условиях свободные радикалы регулируют рост клеток, а также подавляют вирусы и бактерии (Chen et al., 2016). Однако чрезмерное количество свободных радикалов, включая супероксид-анион, перекись водорода и NO, вызывает ряд хронических заболеваний человека (рак, атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания и т.д.) и преждевременное старение (Zaitseva et al., 2022). Исследования показали, что некоторые полисахариды могут ингибировать перекисное окисление липидов, повышать способность организма устранять свободные радикалы, замедлять старение, подавлять сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания (Wang et al., 2017). В частности, полисахариды водорослей играют важную роль в качестве свободных радикалов *in vitro* для предотвращения окислительного повреждения живых организмов (Cristina Diaz et al., 2017). Полисахариды растений ингибируют генерацию активных форм кислорода (Xue et al., 2015; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013), увеличивают активность антиоксидантных ферментов (Chen et al., 2014; Qiu et al., 2014; Xie et al., 2016; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). Особой антиоксидантной активностью обладают полисахариды грибов. Так, полисахарид из гриба *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. ингибирует воспаление (Wang et al., 2015). Сильную активность по удалению свободных радикалов проявляют три полисахарида (GLP-H, GLP-V и GLP-F), выделенные из трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Karst. (Fan et al., 2012), а также полисахариды, выделенные из плодовых тел *Morchella sextelata* (Xiong et al., 2020). Внеклеточный полисахарид из гриба *Morchella esculenta* (L.)

Pers.:Fr. может повышать активность глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы в крови, селезенке, печени, сердце и почках мышей, а также снижать содержание малонового диальдегида в этих органах (Meng et al., 2010).

Противовоспалительное действие пектиновых полисахаридов определяется галактуронановой областью и обусловливается снижением адгезии нейтрофилов человека к фибронектину (Popov et al., 2010). Среди пектинов, галактуронановые области которых обладают противовоспалительным свойством, выделяют зостеран, лемнан, комаруман, бергенан и коммерческий цитрусовый пектин, полученный из кожуры лимона. При изучении воспалительных процессов в кишечнике исследователи выяснили, что в зависимости от структуры пектина либо способны защищать систему кишечника от повреждений и ингибировать воспаление, либо обладают противовоспалительным действием за счет того, что боковые углеводные цепи, входящие в разветвленную область макромолекулы пектина, препятствуют взаимодействию галактуронана с нейтрофилами (Markov et al., 2010; Popov et al., 2010). Т.Е. Michaelsen с соавторами (2000) показали, что цитрусовый пектин является сильным активатором системы комплимента (как классического так альтернативного пути активации), вызывая повышения секреции IgG, что можно наблюдать на примере известного ранозаживляющего эффекта листьев подорожника *Plantago major* L. (Michaelsen et al., 2000).

Исследования показали, что многие полисахариды обладают также и противовирусной активностью. В частности, многие сложные структурные сульфатированные полисахариды, выделенные из морских водорослей, ингибируют репликацию вирусов в оболочке, включая представителей семейств флавивирусов, тогавирусов, аренавирусов, рабдовирусов, ортопоксвирусов и герпесвирусов (Witvrouw and DeClercq, 1997; Holdt and Kraan, 2011; Besednova et al., 2018; Oliyaei et al., 2022; Panggabean et al., 2022). Полисахариды, полученные из водорослей *Undaria pinnatifida* (Harv.) Suringar,

*Gigartina atropurpurea* (J.Agardh) и *Plocamium cartilagineum* (Linnaeus) P.S.Dixon, могут обладать сильной вирулицидной активностью против вируса простого герпеса типов 1 и 2 и проявлять активность при очень низких концентрациях, являясь нетоксичными агентами (Harden et al., 2009). Кроме того, несколько типов полисахаридов (таких как каррагинан, альгинат, фукан, ламинарин, ульван, декстрансульфат, гепарин и фукоидан) обладают широким спектром противовирусной активности *in vitro* относительно вируса денге, вируса простого герпеса (ВПГ), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гриппа и SARS-CoV-2, воздействуя на несколько этапов вирусного цикла (Carlucci et al., 2004; Talarico et al., 2005; Hidari et al., 2008; Широких и др., 2020; Besednova et al., 2021; Fröba et al., 2021; Oliyaei et al., 2022; Panggabean et al., 2022; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). Кислый полисахарид, выделенный из *Coccomyxa gloeobotrydiformi*, обладает противовирусной активностью при инфицировании вирусом гриппа А человека *in vitro* (Komatsu et al., 2013). Следовательно, полисахарид, как эффективный противовирусный ингредиент с низкой токсичностью, имеет широкие медицинские перспективы.

В настоящее время препараты на основе полисахаридов широко используются для лечения отравлений тяжелыми металлами и радиоактивными изотопами (Zhao et al., 2008; Khotimchenko et al., 2012), для лечения заболеваний органов пищеварения (в том числе дисбактериозов) и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Полисахариды активизируют моторику и перистальтику кишечника, одновременно замедляя скорость всасывания пищи, обеспечивают химическую и физическую очистку ворсинок тонкой кишки, улучшая усвоение биологически активных веществ (Zaitseva et al., 2020). Кроме того, полисахариды рассматриваются как потенциальные источники для создания нетоксичных, биосовместимых, биodeградируемых гелевых материалов медико-биологического назначения (для тканевой инженерии и регенеративной медицины, препараты для адресной доставки лекарств) (Chen et al., 2015; Noreen et al., 2017; Cheewatanakornkool et al., 2018;

Ullah et al., 2019; Ширшикова, 2020). Обнаружено, что пектиновые гели обладают большим потенциалом для применения в тканевой инженерии костной ткани, поскольку способствуют зарождению минеральной фазы, образуя биомиметики, имитирующие естественную архитектуру кости (Jahromi et al., 2011; Kokkonen et al., 2012; Amirian et al., 2015), в хирургии в качестве барьерного материала для предотвращения послеоперационных спаек (Pristov et al., 2011; Popov et al., 2016, Konovalova et al., 2017, Markov et al., 2017).

Таким образом, полисахариды вызывают повышенный интерес у исследователей благодаря своеобразному строению, уникальным биологическим функциям и широкому спектру физиологической активности: иммуномодулирующей, в том числе, противовоспалительной, снижают уровень холестерина и триглицеридов в сыворотке крови, нормализуют метаболизм глюкозы, связывают и выводят из организма токсины и радионуклиды, регулируют работу и обеспечивают защиту желудочно-кишечного тракта, оказывают антиканцерогенное и антиметастатическое действие. Широкий спектр возможностей применения полисахаридов обусловлен строением их углеводных цепей и физико-химическими свойствами. Несмотря на то, что основные черты их химической структуры выяснены, строение, размеры и характер ветвления боковых цепей, природа концевых моносахаридных остатков не изучены полностью (Алексеева и Дроздова, 2022).

Однако зачастую именно эти элементы играют доминирующую роль в физиологической активности и проявлении физических свойств (Алексеева и Дроздова, 2022). Диапазон использования полисахаридов до конца не освоен, поэтому целесообразно их дальнейшее изучение. Практические исследования, высокая биологическая совместимость и наличие у сложных углеводов разных активных функциональных групп предполагают возможность исследования влияния данных веществ на устойчивость клеток в стрессовых условиях, в частности, при охлаждении. Вероятно, полисахариды будут способствовать

сохранению физиологических функций биологических объектов и в условиях холодового стресса.

### 1.3 Практическое использование углеводов в качестве компонентов криозащитных сред для повышения физиологической устойчивости клеток

Применение отрицательной температуры актуально во всех научных областях: биотехнологии, физиологии, медицине, селекции и др. Возможность сохранения клеток разных организмов с последующим восстановлением функций открывает новые грани как для исследований, так и для лечения. В современном мире криоконсервация затрагивает многие сферы деятельности человека: банки крови для переливания, сохранение стволовых и репродуктивных клеток (Fuller et al., 2004); криоконсервирование и банки хранения семян (Walters and Wheeler, 2004) исчезающих растений (Kaczmarczyk et al., 2013; Streczynski et al., 2019), репродуктивных клеток животных (Ballou, 1992; Eliot et al., 2017).

В настоящее время доступен широкий перечень средств, с помощью которых можно снизить негативное влияние различных физико-химических факторов на функции клеток, в том числе при воздействии отрицательных температур.

В большинстве случаев для достижения сохранности функций и жизнеспособности биологических объектов при воздействии отрицательных температур необходим существенный ингредиент – криопротектор. Криопротекторы делятся на две категории: проникающие (эндоцеллюлярные) и непроникающие (экзоцеллюлярные) (Fuller et al., 2004; Oldenhof et al., 2013; Sieme et al., 2016; Elliott et al., 2017). Проникающие обычно представляют собой небольшие неионогенные молекулы, которые могут легко диффундировать через клеточные мембраны (глицерин, ДМСО, метиловый спирт и др.). Непроникающие криопротекторы включают небольшие молекулы, которые не

могут проникать через мембраны (например, углеводы). При этом криозащитная активность представителей одного класса может существенно отличаться. Разный эффект может быть связан с наличием в химических соединениях определенных функциональных групп.

Двумя наиболее часто используемыми криопротекторами являются ДМСО и глицерин. Однако оба имеют определенные уровни токсичности ( $LD_{50}=3,8$  и  $4,6$  г/кг массы мыши соответственно) и часто требуют тщательного удаления в виде отмывания перед применением (Полежаева, 2013; Shu et al., 2014; Capicciotti et al., 2015; Костяев и др., 2016; Chen et al., 2016). Всего в мире обнаружено свыше 120 веществ, обладающих криопротекторной активностью. Многие другие растворенные вещества, такие как аминокислоты, включая аланин, глицин и пролин, а также углеводы, включая глюкозу, лактозу и рибозу, и амиды, включая ацетамид и формамид (Alvarenga et al., 2005; Athurupana et al., 2015; Arando et al., 2017, Cardoso et al., 2017; Castro et al., 2018; Sui et al., 2019), обладают некоторой криопротекторной активностью, но часто с низкой эффективностью.

Вещества, относящиеся к криопротекторам, могут быть разной химической природы (белки, углеводы, гликолипопротеиды, спирты и т.д.). Однако, согласно данным Шраго М.И. (1981), вещество, имеющее определенные функциональные группы (-ОН, -СООН, -СН<sub>3</sub>, =S=O-СН<sub>3</sub>, -(СН<sub>2</sub>-СН<sub>2</sub>О) -ОН и др.), может обладать криопротекторным действием. Данные группы обладают способностью к образованию связей с молекулами воды, способствуют формированию аморфной, менее травматичной при замораживании, структуры льда. Углеводы, как непроникающие криопротекторы, обычно менее токсичны, чем проникающие криопротекторы в той же концентрации. Они уменьшают количество необходимых проникающих криопротекторов, имитируя снаружи клетки криозащитные эффекты.

Сама природа подсказывает нам, где найти эффективные криопротекторы. Уже более века известно, что углеводы играют важную роль

в развитии стратегий перезимовки у ряда растений. Трегалоза — это углевод, впервые идентифицированный у засухоустойчивых тихоходок, живущих при относительно высоких температурах, но тот же самый углевод был обнаружен во время зимнего закаливания у ряда холодоустойчивых и морозостойких видов насекомых (Crowe et al., 1992; Гулевский и Релина, 2011; Walters et al., 2011; Castro et al., 2018).

Многие зимующие насекомые обладают многокомпонентными криопротекторными системами, включающими в себя глицерин, сорбитол, глюкозу, фруктозу, трегалозу, маннитол (Bowles et al., 2002; Гулевский и Релина, 2011; Walters et al., 2011; Kuiper et al., 2015; Castro et al., 2018). Данные комбинации веществ эффективны и не токсичны, так как снижение высокой концентрации основного компонента криопротектора компенсируется появлением в среде новых безопасных веществ, что, в целом, обеспечивает достижения должного уровня криозащиты (Davidson et al., 2015; Schrader et al., 2016; Castro et al., 2018; Raju et al., 2021).

Углеводы дают интересное представление о механизмах криопротекторной активности. Олигосахариды препятствуют чрезмерному сближению мембран при сильной дегидратации, что задерживает их переход из жидкой фазы в гель. Исследование показало, что дисахариды в два раза эффективнее предотвращают перекристаллизацию льда, чем моносахариды, но при высоких концентрациях дисахариды более токсичны для тестируемых клеточных линий (Chaytor et al., 2011). Известно, что дисахариды добавляются в среду для криоконсервирования, чтобы уменьшить последствия воздействия холодового стресса: предотвращают необратимые изменения в мембранах и стабилизируют мембранные бислои во время состояний охлаждения-замерзания (Aboagla and Terada, 2003; Martin-murphy et al., 2010; Зайцева и др., 2011; Aghdai et al., 2013; Abazari et al., 2015; Arando et al., 2017; Raju et al., 2021).

В настоящее время в литературе описано несколько протоколов криоконсервации биообъектов под защитой углевода(ов) (Полежаева, 2013).

Гепатоциты очень чувствительны к повреждению при замораживании и оттаивании, и их функция часто нарушается или теряется во время криоконсервации (Li, 2007). Несколько механизмов ответственны за повреждение гепатоцитов в процессе замораживания и оттаивания, такие как окислительный стресс, механическое повреждение из-за образования кристаллов льда, осмотическое повреждение и активация каспазы-3 в ходе апоптоза (Zhang et al., 2003). Использование трегалозы способствует защите мембраны гепатоцитов и белка во время процесса криоконсервации (Cardoso et al., 2017). Как и трегалоза, другие углеводы, участвуют в процессе защиты от травм при криоконсервации. Однако высокая концентрация углеводов приводит к критическому увеличению осмолярности, которая ведет к разрушительному действию на клетки (нарушение целостности мембран). Например, высокие концентрации трегалозы оказывают отрицательное влияние на подвижность замороженных–размороженных сперматозоидов хряков, целостность мембран и каптацию (Bucak et al., 2007; Hu et al., 2009).

Трегалоза и сахароза были исследованы как криопротекторы для трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Добавление сахаров к растворам, содержащим ДМСО, приводит к изменению структуры льда (Bailey et al., 2015). Дополнение ДМСО трегалозой улучшило восстановление после оттаивания предшественников мегакариоцитов, колониеобразующая единица и клеток, иницирующих длительную культуру, результаты подтверждены в независимом исследовании (Sasnoor et al., 2003). Эти результаты были расширены другими учеными, которые показали, что добавление трегалозы, пентакрахмала или сахарозы также позволяет снизить концентрацию ДМСО с 5% до 2.5% (Rodrigues et al., 2008; Hayakawa et al., 2010; Motta et al., 2014; Raju et al., 2021).

Сперматозоиды млекопитающих чувствительны к ПОЛ, которое разрушает структуру липидного матрикса мембраны сперматозоидов из-за атак АФК, образующихся при восстановлении кислорода в период криоконсервации. В результате окислительного стресса происходит выработка

цитотоксических альдегидов, повреждение липидного матрикса и потеря целостности мембраны, снижение подвижности, потеря фертильности и повреждение ДНК сперматозоидов (Baumber et al., 2000; Cassani et al., 2005). Для снижения данных физиологических нарушений к сперме перед воздействием холода добавляют сахара. Введенные в раствор сахара могут способствовать обезвоживанию клеток перед замораживанием, где ди- и трисахариды могут оказывать большее влияние, чем моносахариды, увеличивая осмотическую дегидратацию (Борончук и Балан, 2003).

Aghdai и соавт. (2013) показали благоприятные данные относительно использования фруктозы в среде криоконсервации для гепатоцитов крыс. Причина, по мнению авторов, заключается в том, что фруктоза может защищать клетки от апоптоза за счет образования никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) для восстановления уровня глутатиона. Это уменьшает выработку активных форм кислорода, что отражается на жизнеспособности клеток (Aghdai et al., 2013).

Рафиноза играет криопротекторную роль, вызывая клеточную осмотическую дегидратацию при криоконсервации, взаимодействуя с мембранными липидами и белками и снижая риск образования внутриклеточных кристаллов льда (Agca et al., 2002).

Углеводы (глюкозу, сахарозу, галактозу, рафинозу мальтозу и их различные комбинации) часто вводят в состав криоконсервантов для низкотемпературного хранения лейкоцитов (Полежаева, 2013; Caricciotti et al., 2015; Castro et al., 2018). Они участвуют в регуляции метаболических и осмотических процессов в лейкоцитах, благодаря чему возможна эффективная репарация нарушенных структур этих клеток во время процедур замораживания и отогрева (Полежаева, 2013).

Таким образом, криозащитные свойства углеводов в отношении различных типов клеток хорошо задокументированы (Agca et al., 2002; Busak and Tekin, 2007). Эффект рафинозы, связанный с окислительным стрессом, рассматривался как косвенный эффект передачи сигналов сахаром и запуска

выработки специфических поглотителей АФК (Van den Ende et al., 2009). Сообщается также, что рафиноза используется в большинстве процедур для блокирования степени образования внеклеточного льда (Agca et al., 2002). Дисахариды обеспечивают превосходную защиту подвижности, целостности плазматической мембраны и способности к оплодотворению после оттаивания сперматозоидов от криповреждений у различных видов (Kasimanicham et al., 2007; Garde et al., 2008; Tuncer et al., 2010, Arando et al., 2017). Отметим, что исследования в области криоконсервирования спермы среди видов лососевых рыб подтвердили высокий уровень качества сохранности спермы после замораживания с использованием сахаросодержащих добавок. Глюкоза и сахароза обеспечили самый высокий процент подвижности сперматозоидов после оттаивания у лосося, а трегалоза и сахароза - у сига (Ciereszko et al., 2014; Nynca et al., 2016; Красильникова, 2018).

В настоящее время большое внимание уделяется такому классу углеводов, как полисахариды. Значительное разветвление углеводных цепей и содержание большого количества активных гидроксильных (-ОН) и карбоксильных (-СООН) групп позволяет предположить наличие криозащитного эффекта у полисахаридов. Они способны связывать большое количество молекул воды, что способствует стабилизации процессов кристаллизации и снижает риск повреждения клеток при замораживании. Кроме того, соответствуют основным качествам, предъявляемым к криопротекторам: нетоксичны, участвуют в стабилизации молекул воды, не вызывают разрушений мембран клетки и органелл, не имеют неприятного запаха (Сведенцов, 2010). Однако сведения о включении полисахаридов в протоколы криоконсервации биообъектов немногочисленны.

«Гидроксиэтилкрахмал (гидроксиэтилированный крахмал, ГЭК) – соединение, получаемое в результате оксиэтилирования водорастворимой фракции крахмала. ГЭК представляет собой полидисперсную систему, включающую широкий диапазон фракций с молекулярной массой 250 – 500 кД.» (Сведенцов, 2010; Svedentsov et al., 2012; Полежаева, 2013). «Молекулы

ГЭК могут формировать водородные связи с молекулами воды и стабилизировать ее кристаллическую решетку. При этом структура воды изменяется и повышается способность ее молекул формировать аморфные кристаллы льда в процессе замораживания» (Svedentsov et al., 2012; Полежаева, 2013). «Растворы ГЭК оказывают стабилизирующий эффект на плазматическую мембрану клеток, однако механизм данного эффекта остается не полностью изученным. В Российской Федерации (РФ) ГЭК используется в качестве трансфузионной среды (6% и 10% растворы с ММ 200000). В качестве криопротектора ГЭК применяется в концентрации 6% совместно с ДМСО (5%) при криоконсервировании эритроцитов и ядерных клеток крови в условиях жидкого азота (-196°C)» (Сведенцов, 2010; Svedentsov et al., 2012; Полежаева, 2013). «ГЭК не требует отмывания после отогрева. Однако вопрос о криопротекторных свойствах ГЭК является дискуссионным, так как результаты криоконсервирования других типов клеток в его присутствии противоречивы и требуют дальнейшего изучения» (Сведенцов, 2010; Svedentsov et al., 2012; Полежаева, 2013).

Глицерил глюкозид (органическое соединение, молекула которого состоит из двух частей: углеводного и не углеводного фрагмента), который является природным производным глицерина, содержащимся в алкогольных напитках, считается лучшим альтернативным криопротектором, поскольку это соединение обладает меньшей генотоксичностью, чем глицерин, и меньшей цитотоксичностью, чем ДМСО (Su et al., 2016; Raju et al., 2019).

Hu и соавторы (2009) показали, что полисахарид из вьющегося кустарника рода *Gynostemma* семейства тыквенных защищает сперму хряка от повреждений, вызванных криоконсервацией. Важно отметить, что растительные полисахариды обладают сильной антиоксидантной активностью и могут быть новыми компонентами криозащитных сред (Hu et al., 2006; Hu et al., 2009).

В рамках всестороннего изучения химического строения и физиологической активности пектиновых веществ растений европейского

Севера России была разработана оптимальная схема их выделения из растительного сырья, определено строение, изучена иммунологическая активность (Оводов, 2006; Попов, 2010). Показано, что пектиновые вещества относятся к обширной группе гликаногалактуронанов. Они включают пектиновые полисахариды (гомогалактуронан, ксилогалактуронан и апиогалактуронан, рамногалактуронаны I и II (RG-I и RG-II)), протопектин, и сопутствующие галактаны, арабиногалактаны и арабинаны, которые «входят в состав клеточных стенок большинства высших растений (как наземных, так и водных), и выполняют важные функции: обеспечивают ионный транспорт и поддержание водного режима, влияют на засухоустойчивость растений и их морозостойкость, выполняют защитную роль при взаимодействии растений с фитопатогенами» (Попов и Оводов, 2013; Гюнтер, 2012).

Исследовательской группой под руководством доктора медицинских наук профессора Е.П. Сведенцова (Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН) в 2008 году начаты исследования по изучению криопротекторных свойств полисахаридов в отношении лейкоцитов и тромбоцитов крови человека.

Установлено, что пектиновый полисахарид лемнан ряски малой *Lemna minor* L., обитающей в воде на северных территориях России, а также пектиновый полисахарид комаруман сабельника болотного *Comarum palustre* L, произрастающего в заболоченных местах европейского Севера России, способны снижать температуру замерзания основного криофилика глицерина, оказывать экзоцеллюлярное криозащитное действие, что способствует сохранности мембран ядродержащих клеток крови при действии холода ( $-10^{\circ}\text{C}$  ÷  $-20^{\circ}\text{C}$ ) (Svedentsov et al., 2008; Svedentsov et al., 2012).

Также показано, что криозащитным действием обладает танацетан, выделенный из пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. На различных биологических объектах (лейкоциты и тромбоциты крови человека, клетки дрожжей) показано, что присутствие танацетана в замораживаемой клеточной смеси позволяет уменьшить концентрацию криопротектора глицерола или диметилацетамида (ДМАЦ) и сохранить при этом криозащитный эффект

раствора при охлаждении объекта по линейным или экспоненциальным программам до  $-20^{\circ}\text{C}$  (Svedentsov et al., 2012).

Криоконсервирование биологических объектов в условиях электрического холодильника с использованием пектинового полисахарида, полученного не только из растительного сырья, но и из каллуса, является перспективным направлением в практической медицине и может стать альтернативой традиционному способу замораживания с использованием жидкого азота. В частности, пектин раувольфиана из каллуса раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* (Benth) обеспечивает высокую сохранность ядросодержащих клеток крови в широком диапазоне  $-20^{\circ}\text{C}$ – $-80^{\circ}\text{C}$  (Polezhaeva et al., 2014; Zaitseva et al., 2017, 2018; Khudyakov et al., 2019).

Таким образом, полисахариды обладают высоким потенциалом для использования их в качестве компонентов криозащитных сред для сохранения биологических объектов при воздействии отрицательных температур.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы исследования

В работе использованы:

– пектиновые полисахариды: зостеран из зостеры морской *Zostera marina* L. (Зостерин-Ультра 30%, ООО «Аквामीр», г. Санкт-Петербург), яблочный пектин «AU-701» (Herbstreith&FoxKG, Германия) (Таблица 1);

– полисахариды, выделенные и охарактеризованные в отделе иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН: танацетан из пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., пектин из алоэ древовидного *Aloe arborescens* Mill. (Таблица 1);

Таблица 1 - Общая химическая характеристика полисахаридов растений, использованных в работе

Полисахарид, Mw kDa	GalA, %	СМ, %	Нейтральные моносахариды, %							
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Api	Man	Fuc
AU-701, 80	91.0	38-40	2.4	0.3	1.4	2.9	1.6	0.3	-	-
Зостеран, 70-80	60.0	5.0	5.8	3.4	9.4	17.4	7.2	21.0	1.0	4.6
Пектин Алоэ, 150	90.2	14.8	1.1	0.5	1.2	0.7	2.2	-	0.7	0.3
Танацетан, 635	64.0	<20	8.5	8.4	5.5	0.9	1.2	-	0.5	-

Примечания: СМ – степень метилэтерифицирования карбоксильных групп, (GalA) – галактуроновая кислота, (Gal) – галактоза, (Ara) – арабиноза, (Rha) – рамноза, (Xyl) – ксилоза, (Glc) – глюкоза, (Api) – апиоза, (Man) – манноза, (Fuc) – фукоза.

– полисахариды ксилотрофного базидиального гриба *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers., выделенные и охарактеризованные в лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов ФАНЦ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого. Фракция была получена из сухих плодовых тел искусственно культивированного гриба ВР 16 экстракцией горячей водой (70°C) с последующим осаждением 96% этиловым спиртом. В составе углеводных цепей идентифицированы остатки рамнозы (2.35%), фукозы (2.68%), ксилозы (0.3%), арабинозы (6.79%), маннозы (5.01%), глюкозы (9.14 %) и галактозы (9.62%) (Полежаева и др., 2017);

– классические криопротекторы проникающего действия: глицерин (Sigma - Aldrich, США), диметилсульфоксид (ДМСО; Sigma - Aldrich, США), ДМАЦ (PanReac AppliChem, Испания), 1.2-пропандиол (1.2-ПД, Ланкастер, Англия).

## 2.2 Характеристика объекта исследования

В качестве биологических объектов для замораживания использовали концентраты клеток донорской крови, предоставленные ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в рамках совместного выполнения раздела научного исследования. Получение материала выполнено в соответствии с принципами, установленными Хельсинкской декларацией (Хельсинки, 1964 г.), всеми последующими поправками, а также «Законом Российской Федерации о донорстве крови и ее компонентов» (1993 г.).

В работе использовались концентраты лейкоцитные (ЛК), «выделенные из цельной донорской крови (доноры-добровольцы  $36.2 \pm 4.8$  лет) методом цитафереза (центрифуга «Sorvell» (США), 2500 об/мин, 5 мин, в присутствии консерванта цитратфосфатдекстрозы) в отделении гравитационной хирургии ФГБУН Кировского НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России» (Полежаева, 2013). «Объем ЛК в среднем составил  $22.7 \pm 6.1$  мл. В указанной трансфузионной среде с высоким содержанием лейкоцитов (20 000 – 32 000 в

1 мкл) имелась незначительная примесь тромбоцитов, стволовых клеток. Всего в работе было использовано более 100 единиц ЛК» (Полежаева, 2013). «Проведено более 1000 исследований для изучения структурно-функциональных особенностей ядеросодержащих клеток крови до и после замораживания под защитой комбинированных криоконсервантов» (Полежаева, 2013).

«Образцы тромбоцитного концентрата (КТ), были получены методом аппаратного тромбоцитафереза с использованием сепаратора клеток крови «MCS+» (Haemonetics, USA) от доноров-добровольцев в отделении гравитационной хирургии ФГБУН Кировского НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России» (Полежаева, 2013; Ветошкин, 2015). «Проведено более 350 исследований для изучения структурно-функциональных особенностей тромбоцитов до и после замораживания под защитой комбинированных криоконсервантов» (Полежаева, 2013).

### 2.3 Криоскопический метод

Криоскопический метод позволяет определить понижение температуры замерзания (кристаллизации) раствора в сравнении с температурой замерзания чистого растворителя (дистиллированная вода). При помощи осмометра-криоскопа ОСКР-1 (НПП «Буревестник», С. Петербург) (Полежаева и др., 2017) проводилось определение осмолярных концентраций (Полежаева и др., 2017) (абсолютная погрешность в диапазоне измерений от 0 до 500 мОсм/л составляла 2) и температур замерзания (абсолютная погрешность в диапазоне от  $-0.930^{\circ}\text{C}$  до  $-3.720^{\circ}\text{C}$  составляла  $\pm 0.010$ ) (Полежаева и др., 2017) водных растворов следующих веществ: полисахаридов в концентрациях 0.1% – 1% вес/объем, глицерина – 3.5%, ДМСО – 10%, ДМАЦ – 10%, 1.2-ПД – 10 %, а также смесей полисахаридов с протекторами или венозной кровью человека.

Выбор концентраций традиционных криопротекторов определялся их практическим применением (Lawson et al., 2011; Elliott et al., 2017).

Концентрация полисахаридов растений была выбрана в соответствии с ранее полученными данными о пектиновых полисахаридах как компонентах криопротекторных сред (Svedentsov et al., 2008; Zaitseva et al., 2018).

Все растворы готовили с использованием дистиллированной воды. Исследуемый раствор объемом 0.3 мл помещали в пластиковую кювету, погружали в нее измерительный элемент и устанавливали в термостатируемую камеру прибора (Полежаева, 2013).

#### 2.4 Методы оценки структурно-функционального состояния лейкоцитов

«Выполнено тестирований всего более 1000 по оценке жизнеспособности ядерных клеток крови до и после воздействия холода ( $-20^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$ ) под защитой комплексных консервантов» (Полежаева, 2013).

Перед замораживанием клетки смешивали (1:1) с криоконсервантом:

1. Контрольная группа: смешивание с классическим криопротектором проникающего действия глицерином (7.0%) с добавлением антикоагулянта трилон Б (1%) (Полежаева, 2013).

2. Экспериментальная группа: смешивание с комбинированным криоконсервантом, содержащим криопротектор глицерин (7.0%) и полисахарид (0.1 – 1.2%).

Заморозку ЛК осуществляли по медленным нелинейным программам с использованием электрических морозильников (Сведенцов, 2007). Экспозиция биообъекта с криоконсервантом проводилась при комнатной температуре в криоэппендорфах (15 мин.), с последующим погружением в спиртовую ванну (96% этиловый спирт), охлажденную до  $-20^{\circ}\text{C}$  в электроморозильнике «Derby» (Дания) на 15 мин (Полежаева и др., 2017; Широких и др., 2020). После этого часть криопробирок переносили для хранения в воздушную среду камеры данного электроморозильника

(Полежаева и др, 2017; Широких и др., 2020), а часть - для дальнейшего замораживания и хранения в воздушную среду камеры электроморозильника на  $-80^{\circ}\text{C}$  «Vestfrost» (Дания). Средняя скорость охлаждения от  $+20^{\circ}\text{C}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$  составила  $2.6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , далее до  $-80^{\circ}\text{C}$  по  $3.5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Через разные сроки хранения образцы отогревали в 20-литровой водяной ванне ( $+38^{\circ}\text{C}$ ) при интенсивном покачивании криопробирки в течение 20 с. (Полежаева и др, 2017).

До охлаждения и после отогрева оценивали параметры ЛК следующими методами (Полежаева и др., 2017):

1. «Подсчет общего количества лейкоцитов проводился с помощью камеры Горяева, методом световой микроскопии (Nikon H550S, Япония) при увеличении объектива  $\times 40$  и окуляра  $\times 10$ » (Горизонтов и др, 1983; Сведенцов и др., 2008; Полежаева, 2013).

2. Отсутствие дефектов в клеточной мембране оценивали с помощью витального красителя эозина (Сведенцов и др., 2008; Polezhaeva et al., 2014, Полежаева, 2013; Зайцева и др., 2014). «Для этого 1% раствор эозина (молекулярный вес 692 г/моль, Н «Лаверна» Россия) смешивали с равной по объему каплей ЛК (Полежаева, 2013). Под увеличением объектива  $\times 40$  и окуляра  $\times 10$  в течение 2-3 мин производили подсчет 100 клеток, оценивая окрашивание цитоплазмы в розовый цвет (признак повреждения клеточной мембраны) (Полежаева, 2013). Лейкоциты с неповрежденной мембраной имели цитоплазму светло-зеленого цвета и оценивались как жизнеспособные (Сведенцов и др., 2008; Полежаева, 2013; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). Определяли степень выживаемости клеток к общему числу обнаруженных клеток.

3. Соотношение разных популяций лейкоцитов в ЛК определяли методом световой микроскопии с использованием иммерсионного масла (увеличение объектива  $\times 100$  и окуляра  $\times 10$ ), считали 100 клеток. «Подсчет всегда ведется по одной и той же схеме: 50 % клеток считают на одном конце предметного стекла, вторые 50% - на противоположном» (Полежаева, 2013).

«Приготовленные препараты окрашивали красителем Май-Грюнвальда (эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду ООО «МиниМед», Россия) в течение 20 с (для образцов перед замораживанием) и 5 с (для отогретых образцов), далее - красителем Романовского (азур-эозин по Романовскому ООО «МиниМед», Россия) – в течение 10 мин» (Полежаева, 2013).

4. Способность нейтрофилов к фагоцитозу определяли по методике С.Г. Потаповой и соавт. (Потапова и др., 1977) в которой в качестве стимулятора использовали инертные частицы латекса с диаметром 0.08 мкм («Sigma-Aldrich», Германия) (Сведенцов и др, 2008; Полежаева, 2013). «Частицы латекса разводили средой Хенкса («Биолот», Россия) в соотношении 1:10. В микроцентрифужных пробирках смешивали разведенный латекс в объеме 0,05 мл и 0.1 мл исследуемого ЛК, затем смесь помещали в термостат («Гном», Россия), нагретый до +37°С на 30 мин, с последующим встряхиванием через каждые 10 мин» (Сведенцов и др., 2008). «Приготовленные для микроскопирования препараты окрашивали красителем Май-Грюнвальда (эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду ООО «МиниМед», Россия)» (Сведенцов и др., 2008) «в течение 20 с (для образцов перед замораживанием) и 5 с (для отогретых образцов), далее - красителем Романовского (азур-эозин по Романовскому ООО «МиниМед», Россия) – в течение 10 мин» (Горизонтов и др, 1983; Сведенцов и др., 2008; Полежаева, 2013). «С помощью светового микроскопа (объектив x100, окуляр x10) подсчитывали 100 нейтрофилов, определяли фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) – процент нейтрофилов с поглощенными частицами латекса» (Сведенцов и др., 2008; Полежаева, 2013) «и фагоцитарный индекс (ФИ) – количество захваченных частиц латекса одной клеткой» (Сведенцов и др., 2008; Полежаева, 2013; Зайцева и др., 2014). Величину параметра до замораживания принимали за 100%.

## 2.5 Методы оценки структурно-функционального состояния тромбоцитов

Выполнено тестирований более 350 по исследованию структурных и функциональных параметров тромбоцитов до и после холодого воздействия при  $-80^{\circ}\text{C}$  под защитой комплексных консервантов.

1. Контрольная группа:

- ДМАЦ (10%);
- Глицерин (7%).

2. Экспериментальная группа:

- ДМАЦ (10%) и пектин AU-701 (0.2%);
- ДМАЦ (10%) и пектин танацетан (0.2%);
- Глицерин (7%) и пектин AU-701 (0.2%);
- Глицерин (7%) и пектин танацетан (0.2%).

Смешивание биообъекта с исследуемыми растворами проводили в соотношении 1:1 (по объему) в течение нескольких минут при постоянном перемешивании. Экспозиция с раствором криоконсерванта составляла 15 мин. Замораживание до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  проводили в криопробирках CryoPure Tube («Sarstedt AG&Co.», Германия) с использованием электрических морозильников Sanyo MDF 792 («SANYO Electric Biomedical Co.», Япония). Температуру образцов оценивали с помощью цифрового термометра «CheckTemp» («Hanna Instruments», США).

Сроки наблюдения составили 30 и 180 дней. «По окончании срока хранения проводили размораживание образцов в водяной ванне ( $+38^{\circ}\text{C}$ ) в течение 20с с постоянным перемешиванием содержимого» (Ветошкин, 2015).

Состояние тромбоцитов до охлаждения и после отогрева оценивали следующими методами:

1. Количество тромбоцитов подсчитывали методом светового микроскопирования с помощью камеры Горяева в двух параллельных пробах

с определением концентрации ( $\times 10^9/\text{л}$ ) и выражали в процентах по отношению к исходному уровню (Перфильева и др, 2003).

2. Агрегационную способность тромбоцитов оценивали непосредственно после их выделения, а также после 15 – мин. экспозиции с исследуемыми растворами перед заморозкой и сразу же после отогрева образцов. Определяли индуцированную АДФ (Biochem, Франция) в концентрации 2.5 мкг/мл и адреналином («Московский эндокринный завод», Россия) 2.5 мкг/мл агрегацию с помощью лазерного агрегометра «Биола» LA-230 (НПФ «Биола», Россия).

Данный прибор использует как стандартный турбидиметрический метод, так и ФСП-метод исследования агрегации тромбоцитов (Ивашкина и соавторы, 2008). Регистрировали максимальную величину светопропускания (показатель степени агрегации) и средний размер агрегатов. Уровень сохранности выражали в процентах по отношению к исходному уровню. Агрегатограммы регистрировались после добавления индукторов агрегации в течение 10 минут. Степень агрегации изучали в пробах при рекомендуемом количестве тромбоцитов 250000 – 350000/мкл.

## 2.6 Методы статистического анализа

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «BioStat 2009 Professional 5.8.4» (AnalystSoft, США), для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Данные представлены в таблицах в виде среднего арифметического значения ( $M$ ) и среднего квадратичного отклонения ( $\delta$ ) (Полежаева, 2013). Значимость различий между данными устанавливали по  $t$ -критерию (при нормальном характере распределения) и критерию Манна–Уитни и Уилкоксона (при ненормальном распределении). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$  (Сведенцов и др., 2008).

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Оценка изменения температуры замерзания воды в растворах криопротекторов и биологических жидкостях в присутствии полисахаридов

Для оценки осмолярности и температуры замерзания был использован осмометр-криоскоп ОСКР-1. Исследованы растворы полисахаридов в диапазоне концентраций от 0.1-1% вес/объем, а также смеси одного из выбранных полисахаридов с традиционными криопротекторами (глицерин, ДМСО, ДМАЦ, 1.2-пропандиол).

Установлено, что осмолярность растворов, используемых в работе полисахаридов в концентрации 1%, имеет значения в диапазоне от 15 до 47 мОсм/л, при этом кристаллизация льда в этих растворах начинается при температурах от -0.028 до -0.078°C, соответственно (таблица 2). Значения осмолярности и температур замерзания растворов криопротекторов были значительно выше (таблица 3).

Таблица 2 - Осмолярность и температура замерзания 1% растворов полисахаридов ( $M \pm \sigma$ ,  $n=20$ )

Полисахарид 1%	Осмолярность, мОсм/л	Температура замерзания, °C
Пектин Алоэ	$23 \pm 0.980$	$-0.042 \pm 0.001$
Танацетан	$30 \pm 1.200$	$-0.057 \pm 0.002$
Зостеран	$40 \pm 1.300$	$-0.073 \pm 0.002$
AU-701	$15 \pm 0.890$	$-0.028 \pm 0.001$
Полисахариды <i>H. erinaceus</i>	$47 \pm 1.100$	$-0.078 \pm 0.001$

Выявлено, что при добавлении указанных полисахаридов в концентрации 0.2%, а для полисахаридов *H. erinaceus* 0.5%, к традиционным криопротекторам (выбраны концентрации, которые используются в практике) в ряде случаев было отмечено изменение показателей их криоосмотических свойств (таблица 3).

Таблица 3 - Влияние полисахаридов на осмолярность и температуру замерзания криопротекторов (n=20, M ± σ)

Раствор	Концентрация (%)	Осмолярность, мОсм/л	Температура замерзания, °С
ДМСО	10.0	1725 ± 230	-3.230 ± 0.02
+ АУ 701	0.2	1722 ± 170	-3.220 ± 0.03
+ Танацетан		1686 ± 210	-3.100 ± 0.01
+ пектин Алоэ		1409 ± 110	-2.630 ± 0.01
+ Зостеран		1750 ± 118	-3.250 ± 0.01
+ полисахариды <i>H. erinaceus</i>	0.5	1680 ± 116	-3.100 ± 0.01
ДМАЦ	10.0	1098 ± 112	-2.050 ± 0.02
+ АУ 701	0.2	1079 ± 90	-2.025 ± 0.03
+ Танацетан		1057 ± 78	-1.975 ± 0.03
+ пектин Алоэ		1026 ± 111	-1.910 ± 0.01
+ Зостеран		1050 ± 98	-1.965 ± 0.02
+ полисахариды <i>H. erinaceus</i>	0.5	1113 ± 205	-2.080 ± 0.01
1.2- пропандиол	10.0	1560 ± 150	-2.915 ± 0.02
+ АУ 701	0.2	1480 ± 162	-2.790 ± 0.03
+ Танацетан		1553 ± 145	-2.900 ± 0.01
+ пектин Алоэ		1450 ± 174	-2.720 ± 0.06
+ Зостеран		1550 ± 113	-2.910 ± 0.01
+ полисахариды <i>H. erinaceus</i>	0.5	1600 ± 132	-3.010 ± 0.05
Глицерин	7.0	808 ± 78	-1.500 ± 0.01
+ АУ 701	0.2	901 ± 35 *	-1.680 ± 0.02 *
+ Танацетан		852 ± 18 *	-1.610 ± 0.01 *
+ пектин Алоэ		882 ± 21 *	-1.555 ± 0.02 *
+ Зостеран		800 ± 33	-1.480 ± 0.01
+ полисахариды <i>H. erinaceus</i>	0.5	998 ± 53 *	-1.860 ± 0.01 *

Примечания: \* - значимо ( $p < 0.05$ ) при добавлении полисахарида к соответствующему протектору.

По полученным данным выявлено, что значимо полисахариды способны изменять температуру кристаллизации воды в опытах только с раствором

глицерина. Установлено, что статистически значимо AU 701 (0.2%), танацетан (0.2%), пектин алоэ (0.2%) и полисахариды гриба *H. erinaceus* (0.5 %) увеличивают осмолярность раствора глицерина (7%), и смещают его температуру замерзания в область более отрицательных значений (таблица 3). Зостеран значимо не изменял осмолярность и температуру замерзания глицерина.

Установлено, что с увеличением концентрации выбранных полисахаридов в среде глицерина (3.5%) (концентрация, которая является конечной после смешивания 1:1 с биологическим объектом) осмолярность раствора повышается, а параметр температуры замерзания водного раствора смещается в область более отрицательных температур.

Например, при добавлении AU-701 данная зависимость имела линейный характер, и максимальное снижение температуры кристаллизации отмечено в опытах с 1.0% раствором полисахарида (рисунок 1).

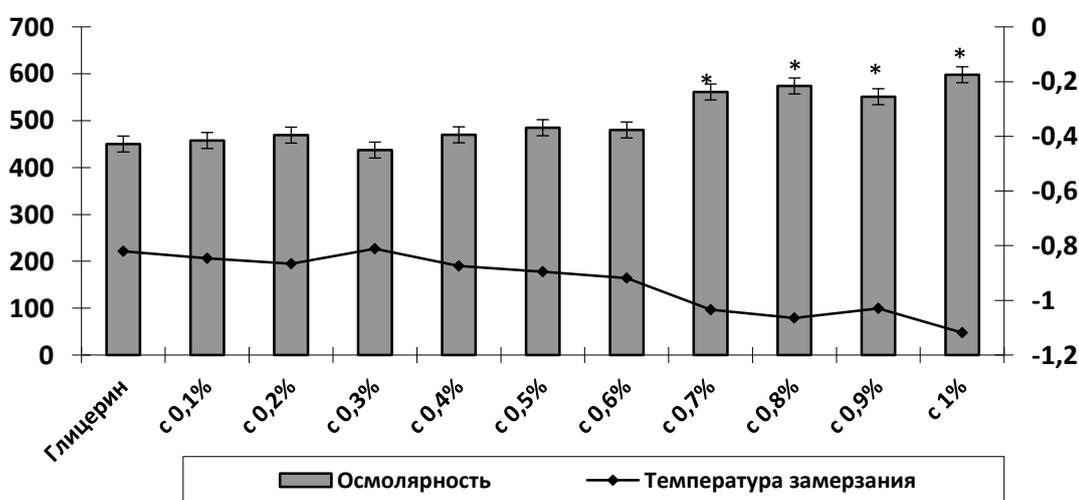


Рисунок 1 - Динамика изменения температуры замерзания и осмолярности криопротекторного раствора (n=10), содержащего глицерин (3.5%) и AU-701 в различных концентрациях (0.1-1.0%).

\* - различие с величиной показателя «Глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

Установлено, что изменения температуры замерзания и осмолярности водного раствора глицерина при добавлении пектина алоэ и танацетана не стабильны (рисунок 2, 3). При смешивании глицерина с пектином алоэ в ряде концентраций отмечено резкое изменение осмолярности раствора и температуры его замерзания, в частности в концентрации 0.4% и 1.0%, но значимо данные параметры изменяются только при 1.0% (рисунок 2).

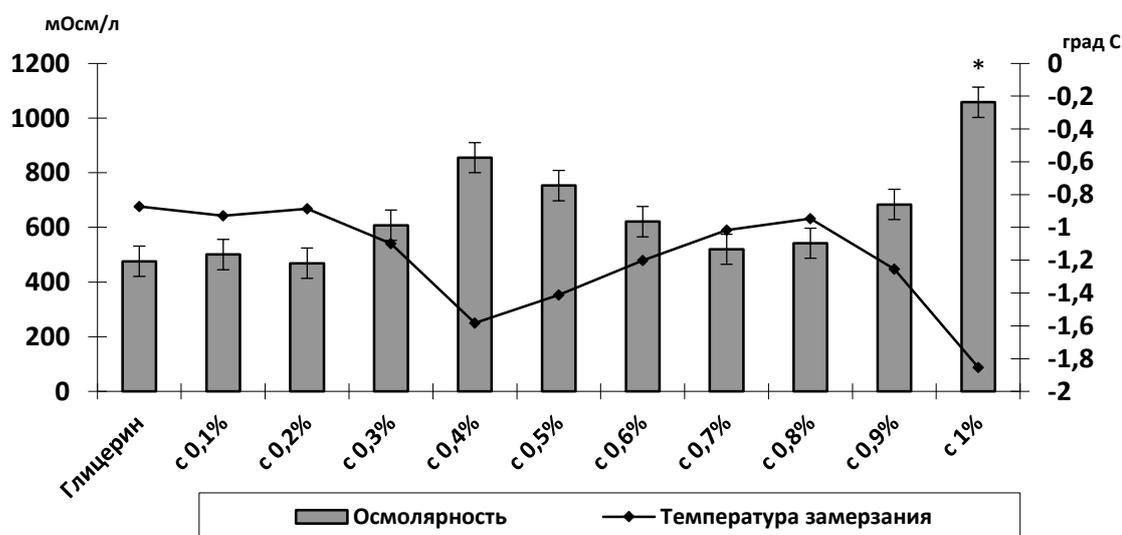


Рисунок 2 - Динамика изменения температуры замерзания и осмолярности криопротекторного раствора (n=10), содержащего глицерин (3.5%) и пектин алоэ в различных концентрациях (0.1-1%).

\* - различие с величиной показателя «Глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

Выявлено, что при добавлении танацетана в концентрации 0.5% осмолярность водного раствора резко увеличивается с тенденцией к дальнейшему увеличению при повышении концентрации (рисунок 3). Однако при использовании 0.8% танацетана показатель температуры замерзания изменяется до  $-1.020^{\circ}\text{C}$ .

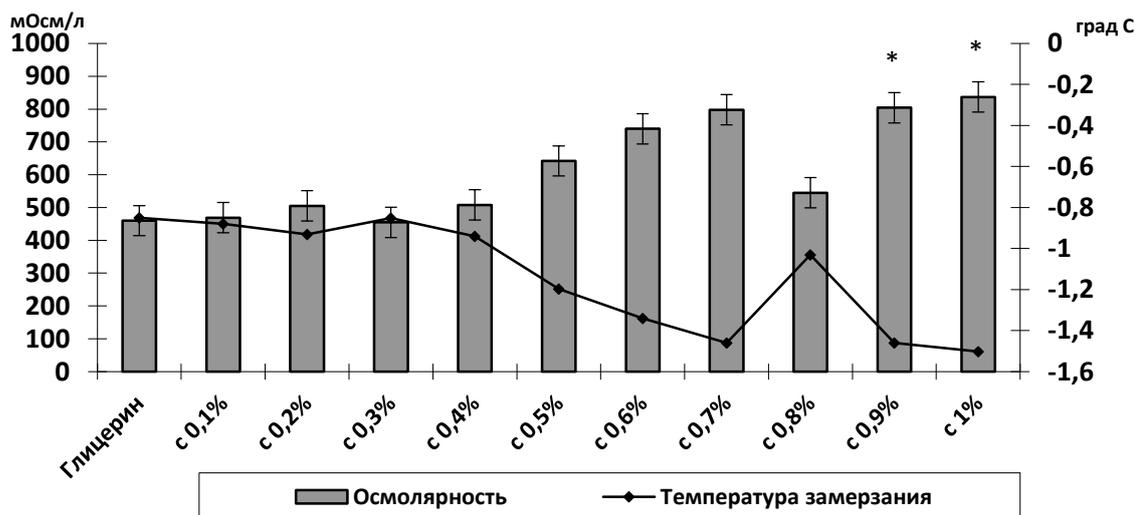


Рисунок 3 – Динамика изменения температуры заморозки и осмолярности криопротекторного раствора (n=10), содержащего глицерин (3.5%) и пектин танацетан в различных концентрациях (0.1-1.0%).

\* - различие с величиной показателя «Глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

Установлено, что при добавлении полисахаридов *H. erinaceus* к глицерину в концентрации 0.7% температура заморозки понижается с - 0.655°C (температура заморозки раствора глицерина) до -0.901°C и продолжала снижаться с увеличением концентрации полисахаридов гриба в среде до 1.0% (рисунок 4).

Выявлено, что при добавлении зостерана в разных концентрациях к глицерину температура заморозки смеси статистически значимо не изменяется (рисунок 5).

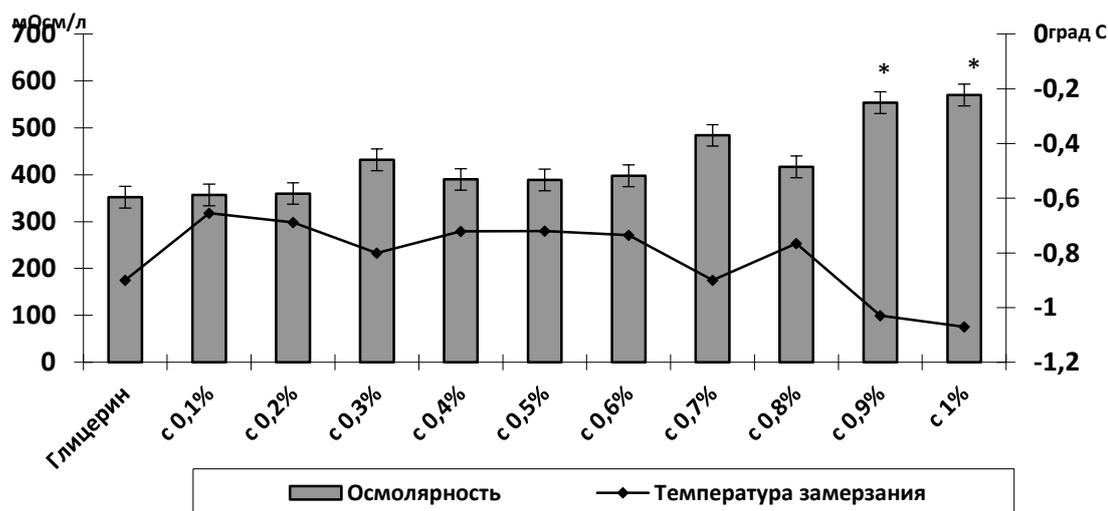


Рисунок 4 – Динамика изменения температуры заморозания и осмолярности криопротекторного раствора (n=10), содержащего глицерин (3.5%) и полисахариды *H. erinaceus* в различных концентрациях (0.1-1.0%).  
\* - различие с величиной показателя «Глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

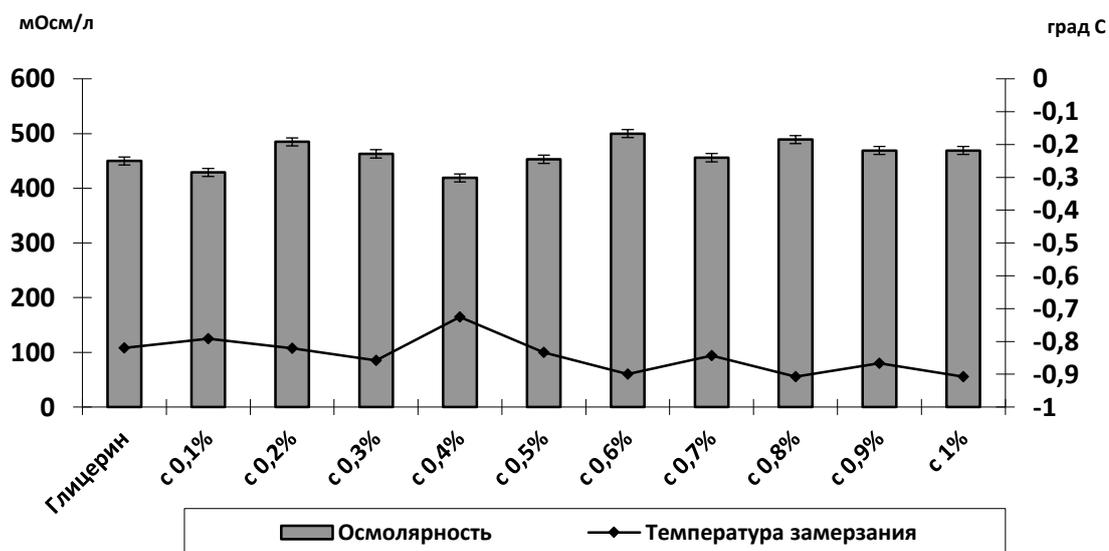


Рисунок 5 - Динамика изменения температуры заморозания и осмолярности криопротекторного раствора (n=10), содержащего глицерин (3.5%) и зостеран в различных концентрациях (0.1-1.0%).

Таким образом, после анализа полученных данных о влиянии полисахаридов на изменения температуры заморозания воды в растворах

традиционных криопротекторов выявлено, что полисахариды способны изменять криоосмотические свойства водного раствора глицерина. Температуру начала кристаллизации водных растворов других криопротекторов полисахариды значимо не изменяют. Выраженный эффект ( $p < 0.05$ ) снижения температуры замерзания раствора глицерина (3.5%) отмечен для следующих концентраций полисахаридов в ряду от 0.1 до 1%: AU-701 – от 0.7% до 1%, танацетана и полисахаридов *H. erinaceus* – 0.9% и 1%, пектина алоэ – 1%. Зостеран в разных концентрациях не изменял ( $p < 0.05$ ) температуру замерзания смеси. Зависимость снижения температуры кристаллизации воды в растворе глицерина при увеличении концентрации полисахаридов в основном имеет линейный характер (AU-701, полисахариды *H. erinaceus*). Однако пектины танацетан и алоэ в некоторых концентрациях проявляли нестабильность.

Определена динамика изменения температуры замерзания и осмолярности венозной крови человека в присутствии глицерина (конечная концентрация 3.5% в биологической среде) и глицерина с полисахаридом в их конечных концентрациях от 0.1 до 0.5%. Установлено, что AU – 701 (таблица 4), пектин алоэ (таблица 5), танацетан (таблица 6), полисахариды *H. erinaceus* (таблица 7) в концентрациях от 0.1% до 0.5% значимо ( $p < 0.05$ ) изменяют криоосмотические свойства раствора глицерина, чем выше концентрация полисахарида в среде, тем ниже осмолярность венозной крови с раствором (глицерин и полисахарид) и выше температура замерзания.

Таблица 4 - Динамика изменения осмолярности и температуры замерзания венозной крови человека в присутствии глицерина и глицерина с АУ-701 в разных концентрациях ( $M \pm \sigma$ ,  $n=10$ )

Вещество, концентрация	Осмолярность, мОсм/л	Температура замерзания, °С
Венозная кровь	$288 \pm 0.23$	$-0.523 \pm 0.23$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)	$707 \pm 29.4$	$-1.314 \pm 0.06$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ АУ-701 (0.1%)	$645 \pm 43.2^*$	$-1.201 \pm 0.08^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) + АУ-701 (0.2%)	$644 \pm 67.8^*$	$-1.201 \pm 0.13^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) + АУ-701 (0.3%)	$599 \pm 64.1^*$	$-1.113 \pm 0.12^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) + АУ-701 (0.4%)	$622 \pm 47.0^*$	$-1.157 \pm 0.09^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) + АУ-701 (0.5%)	$543 \pm 63.5^*$	$-1.01 \pm 0.13^*$

Примечание \* - различие с величиной показателя «венозная кровь + глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

Таблица 5 - Динамика изменения осмолярности и температуры замерзания венозной крови человека в присутствии глицерина и глицерина с пектином алоэ в разных концентрациях ( $M \pm \sigma$ ,  $n=10$ )

Вещество, концентрация	Осмолярность, мОсм/л	Температура замерзания, °С
Венозная кровь	$292 \pm 18.2$	$-0.53 \pm 0.04$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)	$716 \pm 28.7$	$-1.331 \pm 0.05$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ пектин Алоэ (0.1%)	$631 \pm 17.0^*$	$-1.173 \pm 0.08^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ пектин Алоэ (0.2%)	$595 \pm 29.1^*$	$-1.111 \pm 0.05^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ пектин Алоэ (0.3%)	$620 \pm 23.5^*$	$-1.153 \pm 0.05^*$
Венозная кровь+ глицерин (3.5%)+ пектин Алоэ (0.4%)	$643 \pm 29.1^*$	$-1.195 \pm 0.05^*$
Венозная кровь+ глицерин (3.5%)+ пектин Алоэ (0.5%)	$630 \pm 10.1^*$	$-1.165 \pm 0.06^*$

Примечание \* - различие с величиной показателя «венозная кровь + глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

Таблица 6 - Динамика изменения осмолярности и температуры замерзания венозной крови человека в присутствии глицерина и глицерина с танацетаном в разных концентрациях ( $M \pm \sigma$ ,  $n=10$ )

Вещество, концентрация	Осмолярность, мОсм/л	Температура замерзания, °С
Венозная кровь	$288 \pm 0.23$	$-0.523 \pm 0.23$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)	$710 \pm 19.4$	$-1.330 \pm 0.06$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ Танацетан (0.1%)	$670 \pm 25.8^*$	$-1.265 \pm 0.13^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) +Танацетан (0.2%)	$656 \pm 47.0^*$	$-1.215 \pm 0.07^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) + Танацетан (0.3%)	$645 \pm 34.1^*$	$-1.119 \pm 0.12^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) + Танацетан (0.4%)	$645 \pm 55.4^*$	$-1.120 \pm 0.11^*$
Венозная кровь + глицерин (3.5%) + Танацетан (0.5%)	$630 \pm 33.2^*$	$-1.165 \pm 0.07^*$

Примечание \* - различие с величиной показателя «венозная кровь + глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

Таблица 7 - Динамика изменения осмолярности и температуры замерзания венозной крови человека в присутствии глицерина и глицерина с полисахаридами *H. erinaceus* в разных концентрациях ( $M \pm \sigma$ ,  $n=10$ )

Вещество, концентрация	Осмолярность, мОсм/л	Температура замерзания, °С
Венозная кровь	$292 \pm 18.2$	$-0.53 \pm 0.04$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)	$673 \pm 10.7$	$-1.250 \pm 0.05$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ <i>H. erinaceus</i> (0.1%)	$651 \pm 17.0$	$-1.215 \pm 0.05$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ <i>H. erinaceus</i> (0.2%)	$670 \pm 22.1$	$-1.260 \pm 0.05$
Венозная кровь + глицерин (3.5%)+ <i>H. erinaceus</i> (0.3%)	$401 \pm 18.4^*$	$-0.740 \pm 0.08^*$
Венозная кровь+ глицерин (3.5%)+ <i>H. erinaceus</i> (0.4%)	$420 \pm 20.1^*$	$-0.780 \pm 0.05^*$
Венозная кровь+ глицерин (3.5%)+ <i>H. erinaceus</i> (0.5%)	$410 \pm 10.1^*$	$-0.750 \pm 0.05^*$

Примечание \* - различие с величиной показателя «венозная кровь + глицерин» значимо ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, полисахариды (1%) имеют низкую осмолярность и не оказывают значимого влияния на процессы кристаллизации дистиллированной воды. Из всех используемых криопротекторов выбранные полисахариды (исключение пектин зостеран) способны смещать температуру замерзания воды в область более отрицательных температур в опытах с раствором глицерина (7%, 3.5%). При этом зависимость снижения температуры его кристаллизации при увеличении концентрации полисахаридов в основном имеет линейный характер (постепенное увеличение осмолярности общего раствора). Установлено, что в биологической среде (венозная кровь) полисахариды с глицерином сдвигают температуру кристаллизации в область более высоких температур. Увеличение концентрации полисахарида усиливает данный эффект.

### 3.2 Оценка параметров сохранности структурно-функционального состояния лейкоцитов крови, перенесших воздействие отрицательных температур $-20^{\circ}\text{C}$ и $-80^{\circ}\text{C}$ в присутствии полисахаридов

При изучении нарушений функционирования клеток, вызванных охлаждением, особое внимание уделяется изучению биологических мембран (их структурно-функциональных изменений и процессов, протекающих с их участием). При оценке влияния природных полисахаридов на структурно-функциональное состояние лейкоцитов крови до и после низкотемпературного воздействия ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) в течении 1 суток получены следующие результаты (таблица 8, 9):

- по показателю эозинорезистентности установлено, что структура мембран лейкоцитов после воздействия данной отрицательной температуры без использования консервантов и с использованием одного из полисахаридов, разрушается и не восстанавливается после отогрева (таблица 8). При добавлении протектора глицерина к лейкоцитам уменьшается разрушительное

влияние холода на клетки, показатели сохранности мембран лейкоцитов выше 50% от исходного значения;

Таблица 8 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток без криозащитной среды и в среде одного из полисахаридов ( $n=10$ ,  $M\pm\sigma$ )

Серия	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%			
	общее количество лейкоцитов	количество эозинорезистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
без консерванта	$60 \pm 9.6$	$28 \pm 4.8$	$5 \pm 0.2$	Н
+ АИ-701 (0.1%)	$60 \pm 7.3$	$25 \pm 2.8$	$10 \pm 4.2$	Н
+ пектин Алоэ (0.1%)	$58 \pm 5.5$	$24 \pm 2.5$	$8 \pm 7.8$	Н
+ Танацетан (0.1%)	$55 \pm 8.1$	$22 \pm 3.5$	$8 \pm 5.9$	Н
+ Зостеран (0.1%)	$52 \pm 3.4$	$12 \pm 3.5$	Н	Н
+ П. <i>H. erinaceus</i> (0.25%)	$60 \pm 8.8$	$18 \pm 3.4$	$8 \pm 4.3$	Н

Примечания: Н - дифференцировка клеток невозможна в связи с разрушением ядра.

- при добавлении полисахаридов растений (исключение зостеран) и полисахаридов *H. erinaceus* к глицерину статистически значимо повышается устойчивость мембран лейкоцитов к воздействию данной температуры (таблица 9). Это свидетельствует о снижении вероятности образования трансмембранных дефектов в плазматической мембране лейкоцитов в присутствии полисахаридов на этапах охлаждения и отогрева;

- оценку состояния внутриклеточных (цитоплазматических) мембран проводили по показателю сохранности гранулоцитов, как наиболее чувствительных к охлаждению клеток, содержащих ядро и

многокомпонентный гранулярный комплекс. Установлено, что в присутствии полисахаридов количество гранулоцитов после охлаждения значительно выше, чем при использовании одного протектора глицерина (таблица 9);

Таблица 9 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток в среде глицерина и в среде глицерина с полисахаридом ( $n=10$ ,  $M\pm\sigma$ )

Серия	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%			
	общее количество лейкоцитов	количество эозинорезистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
+ глицерин (3.5%)	$72 \pm 9.3$	$67 \pm 2.5$	$63 \pm 10.4$	$58 \pm 3.8$
+ АИ-701 (0.1%)	$89 \pm 9.1^*$	$93 \pm 4.3^*$	$84 \pm 4.4^*$	$89 \pm 4.2^*$
+ пектин Алоэ (0.1%)	$91 \pm 6.4^*$	$87 \pm 2.5^*$	$75 \pm 6.7^*$	$61 \pm 3.5^*$
+ Танацетан (0.1%)	$87 \pm 10.1^*$	$87 \pm 6.5^*$	$60 \pm 5.9^*$	$67 \pm 8.5^*$
+ Зостеран (0.1%)	$61 \pm 2.3^*$	$31 \pm 4.5^*$	Н	Н
+ П. <i>H. erinaceus</i> (0.25%)	$74 \pm 9.8$	$84 \pm 3.4^*$	$85 \pm 8.3^*$	$74 \pm 4.4^*$

Примечания:

Н - дифференцировка клеток невозможна в связи с разрушением ядра;

\* - различие со значением показателя "+ глицерин" статистически значимо при  $p < 0.05$ .

- способность нейтрофилов к образованию фагосом оценивали с использованием инертных частиц латекса. Установлено, что добавление выбранных полисахаридов к глицерину статистически значимо повышает уровень основной функции нейтрофилов по сравнению с показателями лейкоцитов, замороженными только в присутствии глицерина (таблица 9). Отметим, что из всех выбранных нами полисахаридов в составе консерванта,

использованных для защиты мембран лейкоцитов от воздействия холода, не увеличил защитного действия глицерина только пектин зостеран.

При оценке влияния полисахаридов на жизнеспособность лейкоцитов крови до воздействия низкой температуры  $-80^{\circ}\text{C}$ , а также после одних суток экспозиции, получены следующие результаты (таблицы 10,11):

Таблица 10 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток без криозащитной среды и в среде одного из полисахаридов (n=10,  $M \pm \sigma$ )

Серия	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%			
	общее количество лейкоцитов	количество эозинорезистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
без консерванта	$29 \pm 7.1$	Н	Н	Н
+ АУ-701 (0.1%)	$30 \pm 7.3$	$2 \pm 7.8$	Н	Н
+ пектин Алоэ (0.1%)	$28 \pm 5.2$	Н	Н	Н
+ Танацетан (0.1%)	$25 \pm 6.2$	Н	Н	Н
+ Зостеран (0.1%)	$22 \pm 3.4$	Н	Н	Н
+ П. <i>H. erinaceus</i> (0.25%)	$28 \pm 5.12$	Н	Н	Н

Примечания:

Н - дифференцировка клеток невозможна в связи с разрушением ядра.

Таблица 11 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток в среде глицерина и в среде глицерина с полисахаридом ( $n=10$ ,  $M\pm\sigma$ )

Серия	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%			
	общее количество лейкоцитов	количество эозинорезистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
+ глицерин (3.5%)	$84 \pm 12.7$	$73 \pm 7.1$	$68 \pm 9.8$	$45 \pm 4.3$
+ АИ-701 (0.1%)	$78 \pm 17.6$	$80 \pm 5.4^*$	$81 \pm 8.7^*$	$79 \pm 3.4^*$
+ пектин Алоэ (0.1%)	$97 \pm 2.7^*$	$87 \pm 1.6^*$	$89 \pm 5.7^*$	$78 \pm 7.5^*$
+ Танацетан (0.1%)	$84 \pm 12.3$	$83 \pm 3.4^*$	$47 \pm 10.1^*$	$69 \pm 10.6^*$
+ Зостеран (0.1%)	$61 \pm 2.3^*$	$33 \pm 8.4^*$	Н	Н
+ П. <i>H. erinaceus</i> (0.25%)	$82 \pm 10.6$	$87 \pm 3.7^*$	$80 \pm 8.7^*$	$63 \pm 4.4^*$

Примечания:

Н - дифференцировка клеток невозможна в связи с разрушением ядра;

\* - различие со значением показателя "+ глицерин" статистически значимо при  $p < 0.05$ .

- структура мембран лейкоцитов после воздействия отрицательной температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  без использования консервантов и при использовании одного из полисахаридов, так же, как и при использовании более высокой температуры  $-20^{\circ}\text{C}$ , разрушается и не восстанавливается после отогрева (таблица 10). При добавлении протектора глицерина к лейкоцитам уменьшается разрушительное влияние холода на клетки, показатели сохранности мембран лейкоцитов выше 50% от уровня до замораживания;

- применение яблочного пектина, пектина алоэ, танацетана и полисахаридов *H. erinaceus*, но не зостерана, в сравнении с однокомпонентной средой - глицерином, привело к более высоким значениям сохранности

мембранной системы лейкоцитов по всем оцениваемым показателям жизнеспособности клеток (таблица 11). Необходимо отметить, что танацетан в меньшей степени, чем остальные полисахариды, способствует сохранности гранулоцитов.

Таким образом, при воздействии на лейкоциты отрицательных температур  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ , полисахариды (исключение зостеран) способны усиливать криозащитный эффект глицерина в отношении мембран лейкоцитов.

На примере AU-701 оценили, изменяется ли положительный криозащитный эффект, проявляемый полисахаридами при его разной концентрации. Установлено (таблица 12), что AU-701 при концентрации в клеточной среде 0.1% и выше может усиливать криозащитное действие глицерина в отношении мембранных структур лейкоцитов, замороженных и хранившихся при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток.

Таблица 12 - Показатели устойчивости лейкоцитов ( $M \pm \sigma$ ), к воздействию отрицательной температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток в среде глицерина (3.5%) и пектина AU-701 в различных концентрациях

Серия	n	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%		
		количество эозинорезистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
Глицерин	15	$71 \pm 6.7$	$65 \pm 10.3$	$43 \pm 6.9$
+ AU-701 (0.05%)	10	$66 \pm 6.47$	$58 \pm 9.76$	$50 \pm 10.5$
+ AU-701 (0.1%)		$81 \pm 6.93^{* \#}$	$80 \pm 10.53^{* \#}$	$77 \pm 6.20^{* \#}$
+ AU-701 (0.15%)		$78 \pm 4.23^{* \#}$	$73 \pm 7.7^{* \#}$	$76 \pm 4.79^{* \#}$
+ AU-701 (0.3%)		$82 \pm 2.7^{* \#}$	$73 \pm 6.7^{* \#}$	$76 \pm 6.5^{* \#}$
+ AU-701 (0.6%)		$85 \pm 3.2^{* \#}$	$88 \pm 6.1^{* \#}$	$79 \pm 3.7^{* \#}$

Примечания:

\* - различие со значением показателя "Глицерин" статистически значимо при  $p < 0.05$ ;

# - различие со значением показателя "+ AU-701 (0.05%)" статистически значимо при  $p < 0.05$ .

Выявлено, что после отогрева сохранность целостности мембраны (способность не пропускать молекулу эозина), количества гранулоцитов и способности к образованию фагосом у нейтрофилов значимо выше при использовании растворов с AU-701 в концентрациях от 0.1% до 0.6%. Значимых различий в сохранности морфофункциональных показателей лейкоцитов между эффективными концентрациями AU-701 (от 0.1% - 0.6%) в консерванте не наблюдалось.

Установлено, что при добавлении в консервант AU-701 в концентрации 0.05% степень сохранности мембранных структур лейкоцитов остаётся на уровне с показателями сохранности при использовании однокомпонентного раствора - одного глицерина (таблица 12). Следовательно, для снижения повреждений мембран лейкоцитов целесообразно совместно с 3.5% глицерином использовать минимальную концентрацию полисахаридов растений - 0.1%.

Таким образом, по результатам проведенного исследования по заморозке лейкоцитов при отрицательных температурах  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток хранения под защитой консерванта с полисахаридом и глицерином установлено, что все полисахариды, которые изменяли осмолярность раствора водного раствора глицерина (при криосмотический анализе), усиливают криозащитное действие глицерина в отношении мембран лейкоцитов. Вероятно, полисахариды (а именно: AU-701, пектин алоэ, танацетан и полисахариды *H. erinaceus*) образуют дополнительные связи с молекулами глицерина и компонентами мембран клеток, тем самым стабилизируя процессы кристаллизации воды и снижая риск повреждения мембран (Полежаева и др., 2017).

Далее исследование было направлено на установление оптимального срока хранения лейкоцитов в среде криоконсервантов, содержащих один из полисахаридов растений или полисахариды *H. erinaceus* в минимальной концентрации 0.1% и 0.25%, соответственно, и глицерина в концентрации 3.5% при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Выявлено, что при добавлении любого полисахарида к глицерину положительный эффект устойчивости мембран лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-20^{\circ}\text{C}$  наблюдался в течение 5 и 7 суток (таблица 13). Из всех использованных в составе консерванта полисахаридов только полисахариды *H. erinaceus* обеспечили сохранность способности мембран нейтрофилов к образованию фагосом на уровне выше 50% от исходного в течение 5 суток, а других показателей сохранности - 7 суток.

Таблица 13 - Показатели сохранности лейкоцитов ( $n=10$ ,  $M \pm \sigma$ ), подвергнутых воздействию температуры  $-20^{\circ}\text{C}$  разные сроки в среде глицерина (3.5%) и растительного полисахарида (0.1%) или полисахаридов *H. erinaceus* (0.25%)

Серия	Сут.	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%		
		количество эозинорезистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
+ глицерин	5	$41 \pm 5.7$	$10 \pm 6.1$	Н
	7	единичные	Н	Н
+ AU-701	5	$66 \pm 3.29^*$	$51 \pm 5.4^*$	$46 \pm 4.3+$
	7	$62 \pm 3.12+$	$52 \pm 5.3+$	$45 \pm 5.6+$
+ пектин Алоэ	5	$72 \pm 2.4^*$	$68 \pm 4.1^*$	$55 \pm 5.8+$
	7	$68 \pm 3.3+$	$75 \pm 6.1+$	$49 \pm 4.7+$
+Танацетан	5	$62 \pm 2.5^*$	$62 \pm 8.2$	$50 \pm 4.4+$
	7	$60 \pm 5.1+$	$56 \pm 3.5+$	$48 \pm 4.6+$
+ полисахариды <i>H. erinaceus</i>	5	$72 \pm 5.8^*$	$75 \pm 6.4^*$	$64 \pm 5.1+$
	7	$70 \pm 3.9+$	$71 \pm 7.9+$	$53 \pm 4.6+$

Примечания:

Н - дифференцировка клеток невозможна в связи с разрушением ядра;  
 + - сравнение невозможно по причине отсутствия клеток «+ глицерин»;  
 \* - различие со значением показателя "+ глицерин" статистически значимо при  $p < 0.05$  при соответствующем сроке хранения.

Установлено, что максимальный срок сохранности лейкоцитов в условиях низкой температуры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) в среде полисахарида и глицерина, обеспечивается на протяжении трех недель, если глицерин использован совместно с пектином AU-701 (таблица 14).

Таблица 14 - Показатели сохранности лейкоцитов ( $n=10$ ,  $M \pm \sigma$ ), подвергнутых воздействию температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  разные сроки в среде глицерина (3.5%) и растительного полисахарида (0.1%) или полисахаридов *H.erinaceus* (0.25%)

Серия	n	Сут.	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятого за 100%		
			количество эозинорезистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
+ глицерин	20	7	$61 \pm 5.7$	$40 \pm 6.1$	$34 \pm 2.7$
	10	14	$39 \pm 5.5$	$12 \pm 2.1$	Н
	10	21	$9 \pm 2.5$	Н	Н
	10	28	единичные	Н	Н
+AU-701	20	7	$67 \pm 5.5$	$76 \pm 20.8^*$	$73 \pm 4.5^*$
	20	14	$71 \pm 7.3^*$	$76 \pm 16.5^*$	$71 \pm 14.1+$
	20	21	$65 \pm 8.1^*$	$58 \pm 17.4+$	$67 \pm 2.5+$
	20	28	$59 \pm 7.4+$	$26 \pm 10.0+$	$20 \pm 12.2+$
+пектин Алоэ	10	7	$68 \pm 3.0$	$48 \pm 9.5^*$	Н
	10	14	$60 \pm 4.2^*$	$45 \pm 5.0^*$	Н
+Танацетан	10	7	$75 \pm 4.4^*$	$45 \pm 8.1^*$	$59 \pm 7.6^*$
	10	14	$60 \pm 7.2^*$	$45 \pm 4.5^*$	$43 \pm 6.2+$
+ П. <i>H.erinaceus</i>	15	7	$83 \pm 3.9^*$	$80 \pm 3.6^*$	$45 \pm 5.9+$
	10	14	$81 \pm 3.3^*$	$68 \pm 11.5^*$	$37 \pm 2.9+$

Примечания:

Н - дифференцировка клеток невозможна в связи с разрушением ядра;

+ - сравнение невозможно по причине отсутствия клеток «+ глицерин»;

\* - различие со значением показателя "+ глицерин" статистически значимо при  $p < 0.05$  при соответствующем сроке хранения.

Таким образом, комбинирование криопротектора глицерина с полисахаридом при замораживании лейкоцитов до  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  является эффективным. С увеличением срока хранения лейкоцитов при отрицательных температурах ( $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ ) способность полисахаридов усиливать криозащитное действие глицерина в отношении мембранных структур лейкоцитов постепенно ингибируется. По результатам проведенного исследования выявлено, что для длительного хранения лейкоцитов целесообразно использовать низкие температуры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) и AU-701 в качестве добавки к основному криопротектору глицерину.

### 3.3 Оценка параметров сохранности структурно-функционального состояния тромбоцитов, перенесших воздействие отрицательной температуры $-80^{\circ}\text{C}$ в присутствии полисахаридов

Оценка степени повреждения мембран тромбоцитов при криоконсервировании является важным критерием определения уровня эффективности использованных в составе криоконсерванта веществ.

Установлено, что при  $-80^{\circ}\text{C}$  показатели сохранности тромбоцитов в течение 30 суток были значимо выше при добавлении к криопротектору глицерину танацетана или яблочного пектина AU-701 (таблица 15).

При использовании криопротектора ДМАЦ установлено, что количество тромбоцитов статистически значимо уменьшается при добавлении к нему танацетана как через 30 суток хранения, так и через 180 суток. При этом увеличивается степень агрегации тромбоцитов, но снижается размер образующихся агрегатов (таблица 16). В отношении яблочного пектина AU-701 показано, что наличие его в среде тромбоцитов статистически значимо повышает степень агрегации и практически не влияет на размер образующихся агрегатов.

Таблица 15 - Показатели сохранности тромбоцитов (n=10,  $M \pm \sigma$ ), подвергшихся воздействию температуры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) в течение 30 суток под защитой глицерина (3.5%) или глицерина с полисахаридом (0.1%)

Серия	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%				
	Количество	Степень агрегации, %		Размер агрегатов, %	
		АДФ	Адреналин	АДФ	Адреналин
+ глицерин	$79 \pm 10.8$	$44 \pm 4.7$	$44 \pm 5.9$	$49 \pm 4.2$	$49 \pm 3.0$
+ глицерин + АУ-701	$81 \pm 5.6$	$50 \pm 3.3^*$	$53 \pm 6.3^*$	$53 \pm 4.6^*$	$54 \pm 6.1^*$
+ глицерин + танацетан	$79 \pm 2.8$	$51 \pm 4.3^*$	$51 \pm 4.7^*$	$54 \pm 6.2^*$	$55 \pm 4.2^*$

Примечание \* - различие с индексом значений «+ глицерин» статистически значимо при  $p < 0.05$ .

Таблица 16 - Показатели сохранности тромбоцитов (n=10,  $M \pm \sigma$ ), подвергшихся воздействию температуры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) в течение 30 и 180 суток под защитой ДМАЦ (5%) или ДМАЦ с полисахаридом (0.1%)

Серия	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%				
	Количество	Степень агрегации, %		Размер агрегатов, %	
		АДФ	Адреналин	АДФ	Адреналин
30 суток					
+ ДМАЦ	$91 \pm 4.4$	$70 \pm 5.2$	$77 \pm 11.2$	$72 \pm 9.6$	$72 \pm 0.9$
+ ДМАЦ + АУ-701	$94 \pm 8.3^{\gamma}$	$99 \pm 0.5^{*,\gamma}$	$89 \pm 8.4^*$	$78 \pm 14.1$	$83 \pm 7.4^{*,\gamma}$
+ ДМАЦ + танацетан	$79 \pm 7.4^*$	$83 \pm 10.4^*$	$86 \pm 10.6^*$	$63 \pm 10.0^*$	$46 \pm 9.9^*$
180 суток					
+ ДМАЦ	$95 \pm 4.5$	$72 \pm 8.9$	$78 \pm 12.6$	$64 \pm 10.9$	$73 \pm 10.1$
+ ДМАЦ + АУ-701	$89 \pm 11.1^{\gamma}$	$99 \pm 2.1^{*,\gamma}$	$86 \pm 9.9$	$75 \pm 13.3$	$74 \pm 10.2^{\gamma}$
+ ДМАЦ + танацетан	$76 \pm 8.5^*$	$86 \pm 9.8^*$	$81 \pm 11.4$	$69 \pm 11.3$	$45 \pm 11.6^*$

Примечания:

\* - различие с индексом значений «+ ДМАЦ» статистически значимо при  $p < 0.05$ .

$\gamma$  - различие с индексом значений «+ ДМАЦ + танацетан» статистически значимо при  $p < 0.05$ .

Следовательно, комбинирование криопротектора глицерина с полисахаридом в среде тромбоцитов при их замораживании до  $-80^{\circ}\text{C}$  обеспечивает сохранность рецепторного аппарата мембран пластинок и восстановление их способности к агрегации после отогрева.

Таким образом, если сравнить криозащитный эффект глицерина (3.5%) и ДМАЦ (5%) в отношении параметров сохранения тромбоцитов при низких температурах в течение 30 суток (таблица 15, 16), то можно отметить, что наилучший эффект выявлен у протектора ДМАЦ. Однако данный эффект не меняется при дополнительном введении в состав криоконсерванта полисахарида. Выявлено, что полисахариды (яблочный пектин и танацетан) при добавлении к глицерину увеличивают способность глицерина обеспечивать стабилизацию параметров тромбоцитов при исследуемой температуре до 30 суток.

## **ГЛАВА 4 ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИСАХАРИДОВ (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ)**

Несмотря на большое количество веществ, повышающих устойчивость биологических объектов к охлаждению, в практике используют ограниченный круг криопротекторов из-за их токсичности (Полежаева, 2013). Широкое применение получил эндоцеллюлярный криопротектор глицерин, но данное вещество характеризуется определенной токсичностью (Полежаева и др., 2017; Elliott et al., 2017). В связи с этим в составе сред для сохранения клеток глицерин целесообразно комбинировать с другими экзоцеллюлярными криопротекторами, например, олигосахарами, которые не имеют токсичности, повышают вязкость среды и являются энергетическим субстратом. В последние годы большое внимание уделяется полисахаридам, т.к. они обладают разнообразным физиологическим действием. Значительное разветвление углеводных цепей и содержание функциональных -ОН и -СООН групп позволяет предположить наличие криозащитного эффекта у полисахаридов (Zaitseva et al., 2020, 2022). Перспективным направлением в криоконсервации биологических объектов может быть использование полисахаридов, полученных не только из растительного сырья, но и из каллуса, а также из мицелия и плодовых тел базидиальных грибов (Kawahara et al., 2016). Данное исследование направлено на изучение физиологической устойчивости лейкоцитов и тромбоцитов крови человека, подвергнутых холодному стрессу в присутствии полисахаридов. На предварительном этапе исследования важным явилось определение роли полисахаридов в процессах кристаллизации воды.

#### 4.1 Роль полисахаридов в процессах кристаллизации воды

Криоскопическим методом установлено, что водные растворы полисахаридов (0.1 – 1.0 %) имеют низкую осмолярность и, как следствие, не влияют на температуру кристаллизации воды. Однако в растворе глицерина, но не в ДМСО, ДМАЦ, 1.2-ПД, полисахариды повышают осмолярность среды и снижают температуру замерзания.

Молекула глицерина богата гидроксильными группами (Elliott et al., 2017). Полисахариды имеют много гидроксильных и карбоксильных групп, что, согласно данным литературы, обеспечивает их высокую биологическую активность (Schepetkin and Quinn, 2006; Ermakova et al., 2011, Shao et al., 2014; Petera et al., 2015; Di et al., 2017; Ji et al., 2017; Широких и др., 2020; Besednova et al., 2021; Fröba et al., 2021; Oliyaei et al., 2022; Panggabean et al., 2022; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). Мы полагаем, что молекулы полисахаридов благодаря своим функциональным группам (гидроксильным, карбоксильным), способны образовывать многочисленные химические связи с гидроксильными группами глицерина. Такое взаимодействие между функциональными группами глицерина и пектина продемонстрировано на примере разработок съедобных пленок для упаковки пищевых продуктов (Da Silva et al., 2018). У других криопротекторов гидроксильные группы в строении молекулы либо отсутствуют, либо их недостаточно для проявления подобного эффекта (1.2-ПД).

Растворимость полисахаридов зависит от полимеризации их молекулы и увеличивается при повышении степени этерификации, а также от типа растворителя (Донченко и др., 2019). «При контакте водорастворимых полисахаридов с растворителем молекулы воды первоначально проникают в наименее организованные участки цепей макромолекулы. Данная первичная гидратация ослабляет связи в оставшихся звеньях и способствует проникновению воды и дальнейшей гидратации наиболее организованных участков цепи. Отметим, что этот процесс происходит через переходную

стадию преобразования, когда частицы набухают и увеличиваются в объеме. Дополнительной особенностью растворения является легкое разрушение межмолекулярных связей при помощи механического воздействия или нагревания. Если межмолекулярные связи между определенными сегментами достаточно прочны, то полисахарид остается в набухом состоянии» (Патова и др., 2014). Глицерин, подобно воде, имеет в своем составе много гидроксильных групп и способен растворять соли, щелочи, мочевины, сахарозу и др. Поэтому полисахарид в растворе глицерина также набухает за счет взаимодействия функциональных групп глицерина и пектина (Masuelli, 2011). Вероятно, комплекс полисахарид – глицерин образует сеть для захвата большего количества молекул воды, что способствует увеличению осмолярности конечного раствора и снижает температуру его кристаллизации (рисунок 6).

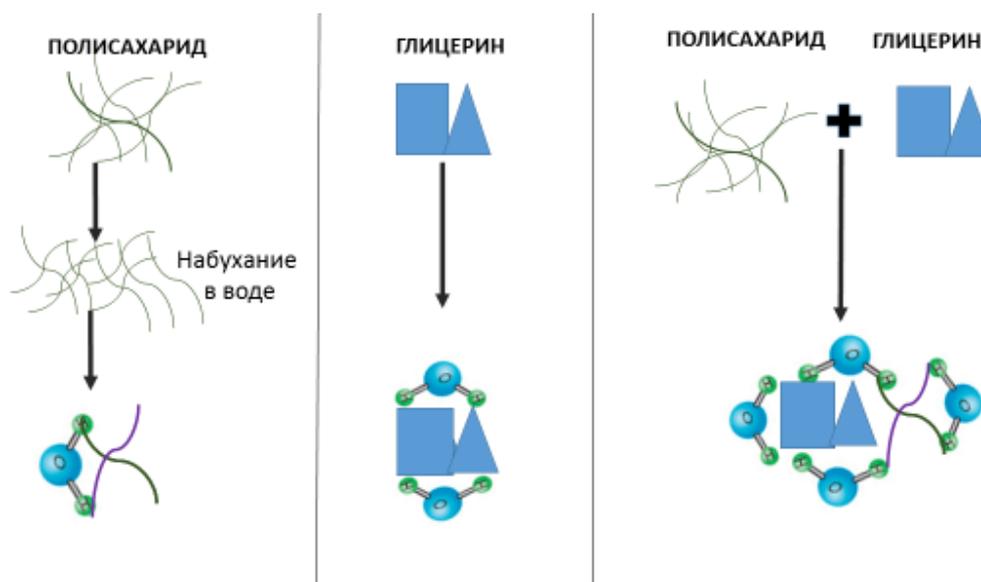


Рисунок 6 – Возможное взаимодействие полисахарида и глицерина в присутствии воды.

Следует отметить, что полисахариды в разных концентрациях влияют на осмолярность и «температуру кристаллизации водного раствора глицерина, при этом отличий между полисахаридами растений и грибов не выявлено»

(Белоус и Грищенко, 1994). Мы считаем, «что это зависит от тонкого молекулярного строения самих полисахаридов (количества свободных карбоксильных групп, плотности заряда молекулы полисахарида, молекулярной массы и др.)» (Белоус и Грищенко, 1994). Полисахариды многообразны, у них нет постоянной структуры, она меняется в зависимости от особенностей собранного материала, от способа получения полисахарида и др. (Донченко и др., 2019; Овчарова и Бочкарева, 2019, Zaitseva et al., 2022).

Влияние полисахаридов на изменения температуры замерзания водного раствора глицерина имеет линейный характер.

Эффект снижения температуры кристаллизации водного раствора глицерина (3.5%) выявлен для следующих полисахаридов: AU-701 – от 0.7% до 1%, танацетан и полисахариды гриба *H. erinaceus* – 0.9% и 1%, пектин алоэ – 1%. Исключением стал зостеран.

Используемые в работе полисахариды являются низкоэтерифицированными, т.е. имеют в своем составе много свободных карбоксильных групп, которые потенциально могут взаимодействовать с функциональными группами других веществ, свободными ионами и др. (Донченко и др., 2019; Овчарова и Бочкарева, 2019). Из исследуемых нами полисахаридов у пектина зостерана самая низкая степень этерификации (5%), 60% галактуроновой кислоты и достаточное количество разнообразных нейтральных моносахаров, что свидетельствует о его высокой комплексообразующей активности. Крайне низкая степень этерификации зостерана обеспечивает большое количество близко расположенных в молекуле карбоксильных групп, способных блокировать друг друга. Линейная основа пектина прерывается 1,2-связями с  $\alpha$ -L-рамнозой. Включение единиц рамнозы обеспечивает изгибания в формально прямолинейной цепи пектина. В свою очередь, эти части рамнозы несут в себе боковые цепи, состоящие из сахаров ксилозы, арабинозы, галактозы. Данные разветвления не регулярны и накапливаются в «пушистых областях» (Донченко и др., 2019; Овчарова и Бочкарева, 2019), что обуславливает повороты в строении молекулы. Еще

одной особенностью в строении молекулы зостерана является наличие апигалактуронана, который обуславливает его высокую степень полимеризации (Люенко, 1999; Калистратова и др., 2016). Перечисленные выше особенности строения сложной молекулы пектина зостерана лишили его способности к взаимодействию с молекулами глицерина.

Известно, что смещение температуры кристаллизации воды в клетках в диапазон более низких температур на начальных этапах охлаждения способствует постепенному “вымораживанию” воды с образованием мелкочаеистой и менее травматичной структуры льда (Полежаева и др., 2017). Поэтому следующим этапом работы стало определение влияния полисахаридов на характер кристаллизации воды в клеточных суспензиях. Нами были выбраны полисахариды, которые значимо влияли на осмолярность и температуру замерзания водного раствора глицерина: AU-701, пектин алоэ, танацетан и полисахариды гриба *H. erinaceus*.

Установлено, что танацетан, AU-701, пектин алоэ, полисахариды *H. erinaceus* в концентрации 0.1 – 0.5 % повышают температуру кристаллизации венозной крови в присутствии глицерина (3.5%). Известно, что пектины, в зависимости от среды, в которой они растворены, изменяют вязкость раствора и также влияют на молекулу воды. Вероятно, поэтому комплекс глицерин-полисахарид в условиях биологической среды способствует зародышеобразованию, т.е. действует как катализатор кристаллизации воды. В частности, было показано (Krog et al., 1979; Young and Van Orden Robe, 1986), что полисахарид из вязкого секрета *Lobelia telekii* Scwheinf. проявляет высокую удельную активность в иницировании кристаллизации воды. Данная особенность позволяет предположить, что в условиях биологической среды полисахарид будет матрицей для льда с образованием менее травматичной аморфной структуры кристаллов. Последние не будут при замораживании затрагивать важные объекты клетки (мембрану, органеллы, цитоскелет и др.) (рисунок 7). Согласно данным литературы, способность

полисахаридов быть матрицей для образования кристаллов льда практически не исследована (Gulevsky and Relina, 2011).

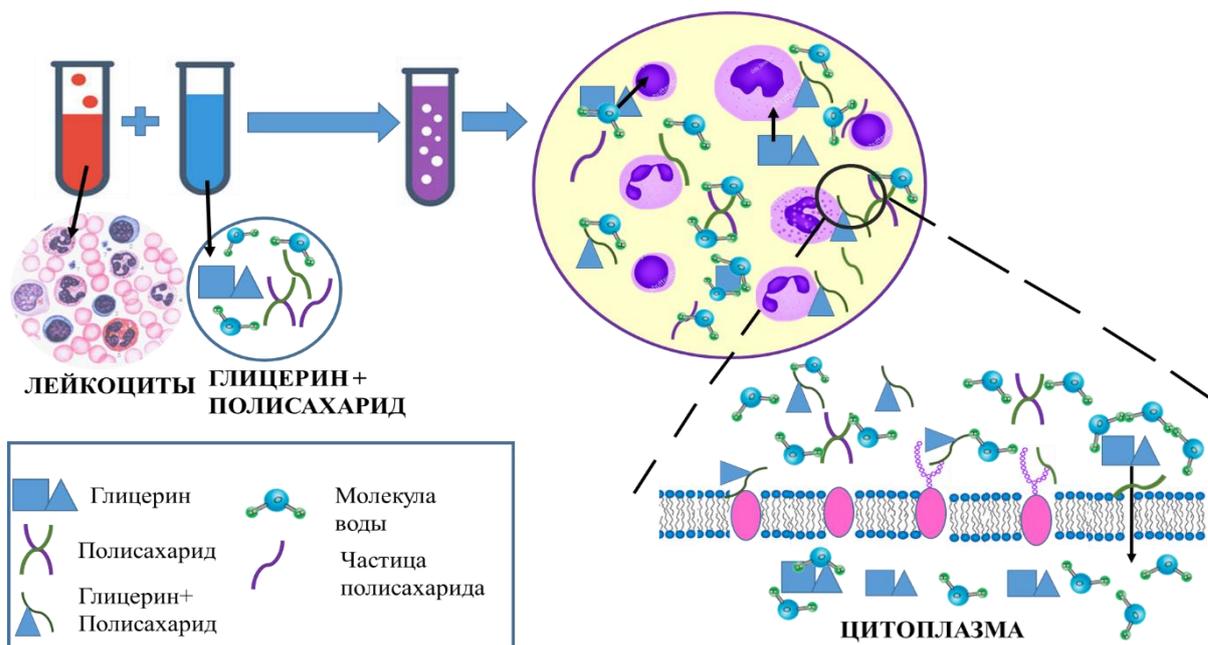


Рисунок – 7. Совместное влияние глицерина и полисахарида на клетки до воздействия отрицательной температуры.

Таким образом, полисахариды (0.1 – 1.0 %) не оказывают влияния на температуру замерзания дистиллированной воды, но смещают значение данного параметра в сторону более низких температур в растворе протектора глицерина. Выявленная нами особенность комплекса полисахарид -глицерин проявлять свойства нуклеатора льда в биологической среде, вероятно, может способствовать формированию безопасной морфологической структуры льда во время фазового перехода «вода-лед» в условиях действия холода. Следовательно, разрушительное действие кристаллов льда будет меньше затрагивать важные объекты клеток (мембраны, органеллы клеток и др.).

#### 4.2 Структурно-функциональная сохранность лейкоцитов и тромбоцитов при действии отрицательных температур в присутствии полисахаридов

Степень повреждения клеток при воздействии холода зависит от особенностей перехода воды из жидкой фазы в лед. Данный переход различных фракций воды в твердое состояние происходит в широком температурном диапазоне (от начальной температуры кристаллизации до окончательного отвердевания биообъекта). Вымораживание воды обуславливает комплексное воздействие повреждающих факторов на клетку (Сведенцов, 1999; Russo et al., 2004; Полежаева, 2013; Красильникова, 2018; Хименков и Брушков, 2021; Интернет издание – онлайн «Pandia», 2013). При изучении нарушений функционирования клеток, вызванных охлаждением, важным является подробное изучение структурно-функциональных изменений мембран и различных метаболических процессов, протекающих при их участии.

Согласно полученным показателям сохранности лейкоцитов при воздействии температур  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  полисахариды (исключение зостеран) способны усиливать защитный эффект глицерина в отношении мембран клеток. Полученные данные подтверждают предположение о том, что если полисахариды на этапе криосмотического анализа влияли на температуру замерзания основного криопротектора глицерина, то совместное сочетание данных компонентов в криоконсерванте будет способствовать защите мембран клеток во время воздействия отрицательных температур. Возможным механизмом криозащитного действия полисахаридов является их способность к образованию комплексов с глицерином, что обеспечивает эффективную дегидратацию клеток перед охлаждением.

При использовании в качестве эндоцеллюлярного криопротектора одного из полисахаридов установлено, что структура мембран лейкоцитов разрушается после отогрева. Следовательно, использование полисахаридов в качестве однокомпонентного криопротектора не эффективно. Возможно,

полисахарид существенно ускоряет скорость замораживания, что вызывает быстрое образование льда во внеклеточном пространстве, повышение внутриклеточной концентрации осмотически активных веществ и необратимое изменение структуры мембраны (разрушаются макромолекулы и надмолекулярные комплексы) и, следовательно, функции клетки (рисунок 8).

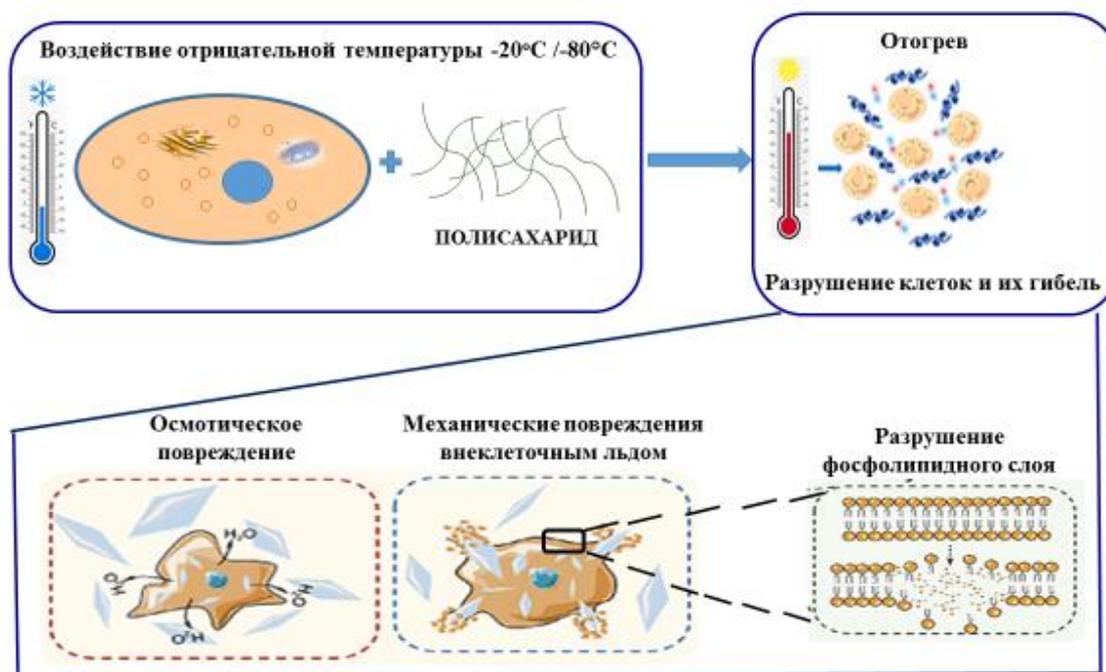


Рисунок – 8. Влияние полисахарида на сохранность клеток при воздействии отрицательной температуры.

Несмотря на то, что глицерин легко проникает в клетки и стабилизирует молекулы воды, его концентрации 3.5% не достаточно для сохранения клеточных мембран лейкоцитов на высоком уровне после отогрева (рисунок 9). «Состояние мембраны играет определяющую роль в сохранении и обеспечении таких физиологических процессов, как динамика метаболизма, цитокинез, реализация генетической программы развития и роста, пространственное расположение молекулярных и субклеточных компонентов клетки, и пр.» (Белоус и Грищенко, 1994; Полежаева, 2013) Данные процессы могут быть частично или полностью нарушены холодовым воздействием. Добавление к глицерину полисахарида позволяет повысить устойчивость лейкоцитов к воздействию холода и обеспечить сохранность физиологических

функций клеток. Вероятно, данный эффект обеспечивается образованием комплексов глицерин-полисахарид, которые на начальных этапах охлаждения способствуют формированию более мелкой структуры льда, тем самым предупреждая критические изменения в мембране клеток.

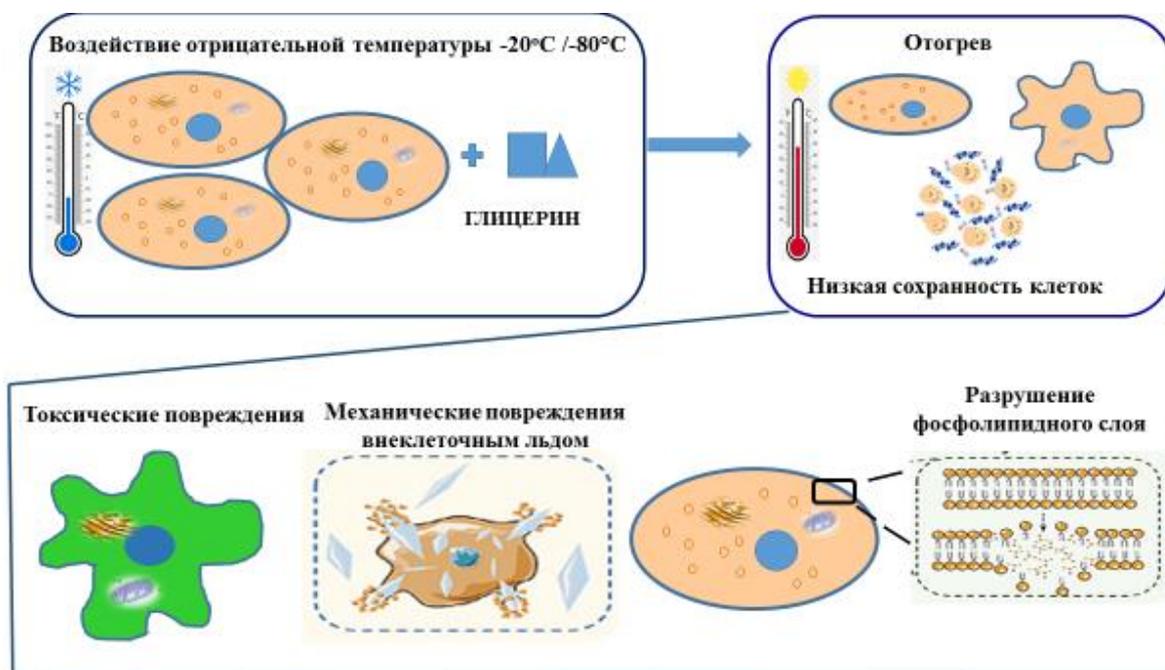


Рисунок – 9. Влияние глицерина на сохранность клеток при воздействии отрицательной температуры.

Мы предполагаем, что функциональные группы (гидроксильные, карбоксильные) полисахарида способны к образовыванию связей - OH группами глицерина. Вероятно, это обусловлено особым уникальным молекулярным строением каждого полисахарида. Яблочный пектин AU-701 и пектин алоэ в составе молекулы имеют большое содержание галактуроновой кислоты (91% и 90.2%, соответственно), функциональных групп и линейное строение молекулы (разветвлений почти нет, преимущественное содержание «гладкой области» в молекуле). Танацетан и зостеран имеют меньшее процентное содержание галактуроновой кислоты в составе (64% и 60% соответственно), но остальная часть молекулы состоит из нейтральных моносахаров, которые также, как и галактуроновая кислота, имеют OH-, COOH- группы. У полисахарида гриба *H. erinaceus* в составе углеводной цепи

идентифицированы нейтральные моносахара, которые по данным литературы обладают определенной криопротекторной активностью (Alvarenga et al., 2005; Athurupana et al., 2015; Arando et al., 2017, Cardoso et al., 2017; Castro et al., 2018; Sui et al., 2019). Следовательно, все выбранные нами полисахариды по структуре и составу молекулы обладают значительным количеством функциональных групп, способных взаимодействовать с молекулой глицерина. Мы предполагаем, что образованная в результате этого взаимодействия сеть может притягивать молекулу воды и обеспечивать более эффективную дегидратацию клеток перед охлаждением. Криогенные изменения клеточных и других биологических структур обусловлены фазовыми переходами белков и липидов, которые находятся в прямой зависимости от степени гидратации мембран (Gao and Critser, 2000; Wolfe and Bryant, 2001; Mazur et al., 2004; Elliott et al., 2017; Zhao and Fu, 2017). Вода – это стабилизатор мембранных структур. Образующиеся комплексы полисахарид-глицерин связывают дополнительное количество молекул свободной воды и упорядочивают кристаллообразование, тем самым снижая механические и осмотические повреждения, возникающие в результате роста льда (Полежаева, 2013).

Однако стоит отметить, что зостеран не усиливал эффект глицерина в отношении сохранности мембран лейкоцитов после воздействия отрицательных температур ( $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ ) и не влиял на его криоосмотические свойства. Следовательно, это подтверждает наше предположение о том, что если полисахариды на этапе криоосмотического анализа влияли на температуру замерзания основного криопротектора, то совместное сочетание данных компонентов в криоконсерванте будет способствовать защите мембран клеток во время воздействия отрицательных температур.

Таким образом, установлено, что все полисахариды, которые изменяли осмолярность водного раствора глицерина, усиливают его криозащитное действие в отношении мембран лейкоцитов, перенесших замораживание и

хранение в течение 1 суток при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ . При этом AU-701, пектин алоэ, танацетан и полисахариды *H. erinaceus*, вероятно, образуют дополнительные связи с молекулами глицерина и компонентами мембран клеток, тем самым стабилизируя процессы кристаллизации воды и снижая риск повреждения мембран (Полежаева и др., 2017).

На примере AU-701 в разной концентрации проведена оценка степени его криозащитного эффекта. Показано, что уменьшение концентрации AU-701 до 0.1% в замораживаемой клеточной среде не снижает криозащитного эффекта смеси. Известно, что при увеличении концентрации пектина в растворе первоначально наблюдается снижение комплексообразующей способности, что может быть связано со взаимной блокировкой карбоксильных групп (Донченко и др., 2019; Овчарова и Бочкарева, 2019). Вероятно, такое количество молекул AU-701 (в частности, свободных активных групп -ОН и -СООН) достаточно для взаимодействия со свободными функциональными группами глицерина и компонентами мембраны. В результате 0.1% концентрация пектина является приемлемой для обеспечения высокой сохранности лейкоцитов во время замораживания, и увеличение концентрации пектина не целесообразно. Более того, добавление AU-701 в криораствор увеличивает активность основного криопротектора (глицерина) и при его низких концентрациях. Это позволяет уменьшить концентрацию традиционных криопротекторов с сохранением их эффективности и, таким образом, снизить их токсическое действие.

Известно, что при субумеренно-низких температурах ( $-15^{\circ}\text{C} \div -20^{\circ}\text{C}$ ) внеклеточная и свободная внутриклеточная вода замерзают, а связанная и фиксированная вода в клетках находятся в жидком состоянии, что способствует поддержанию структуры и функции клеточных белков (Сведенийов, 2010; Полежаева, 2013; Алексеева и Дроздова, 2022), внутриклеточный обмен при этом замедляется (Щеглова, 2005; Зайцева и др., 2011; Полежаева, 2013). При субумеренно-низкой температуре метаболические процессы в клетках продолжают, запас органических веществ истощается

быстро, клетки начинают погибать из-за нехватки элементов для жизнедеятельности. Поэтому ядродержащие клетки крови человека при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  могут сохранять свои функции всего несколько суток.

При температурах диапазона  $-70^{\circ}\text{C}$  ÷  $-80^{\circ}\text{C}$  фракции воды: внеклеточная, свободная и связанная внутриклеточная замерзают с устойчивой кристаллизацией (Полежаева, 2013). При этом не замерзает фиксированная вода, и метаболизм в клетках значительно замедлен, происходит почти полное прекращение всех биохимических процессов, и клетка в состоянии «сна» может находиться некоторое время без вреда для своей структуры. Следовательно, хранение при такой температуре может продолжаться несколько недель.

Дальнейшие исследования были направлены на установление оптимального срока хранения лейкоцитов при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  в среде криоконсервантов, содержащих один из полисахаридов растений или полисахариды *H. erinaceus* в минимальной концентрации 0.1% и 0.25%, соответственно, и глицерина в концентрации 3.5%. Показано, что с увеличением срока хранения лейкоцитов при отрицательных температурах  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  способность полисахаридов усиливать криозащитное действие глицерина в отношении мембранных структур лейкоцитов постепенно ингибируется.

По результатам исследования выявлено, что все использованные полисахариды усиливают защитное действие глицерина в отношении мембран лейкоцитов после воздействия субумеренно-низкой температуры в течении 5 суток, а полисахариды гриба *H. erinaceus* пролонгируют защитный эффект до 7 суток. Вероятно, данный положительный эффект полисахаридов связан с их высокой антиоксидантной активностью (Meng et al., 2010; Fan et al., 2012; Xiong et al., 2020). Это свойство является особенно важным при замедленном, но продолжающемся метаболизме при  $-20^{\circ}\text{C}$ , чтобы нейтрализовать окислительное действие свободных радикалов и других реактивных веществ.

По результатам проведенного исследования выявлено, что для длительного хранения лейкоцитов (21 сутки) целесообразно использовать низкие температуры ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) и пектин AU-701 в качестве добавки к основному протектору глицерину. Вероятно, полисахарид AU-701 обладает определенными структурными особенностями, которые в температурном диапазоне от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  обуславливают выраженный криозащитный эффект, снижая вероятность образования трансмембранных дефектов у ядерных клеток крови и сохраняя способность мембран к образованию фагосом.

Интенсивность и агрессивность современных протоколов химиотерапии, широкое внедрение технологий трансплантации гемопоэтических стволовых клеток делают донорские КТ самым востребованным компонентом крови (Карпова и др., 2015). Тромбоциты самые мелкие безъядерные форменные элементы крови, они имеют сложную структуру поверхности мембраны. Плазматическая мембрана тромбоцитов двухслойная, она внедряется внутрь пластинки с образованием многочисленных переплетенных канальцев, связанных с внеклеточным пространством (открытая канальцевая (микротубулярная) система). Структурно-функциональные изменения, которые возникают в мембране тромбоцитов после охлаждения, являются важными критериями при оценке влияния веществ на устойчивость кровяных пластинок к охлаждению. Известно, что современные способы хранения КТ при комнатной температуре  $20 \div 24^{\circ}\text{C}$  или охлаждении до  $2 \div 6^{\circ}\text{C}$  имеют ряд ограничений, которые связаны с сохранностью функций тромбоцитов. Такие КТ могут быть применены в ограниченное время и их эффективность не всегда стабильна (Valeri et al., 2002; Высочин и др., 2014). Доступность и безопасность КТ ограничивается развитием повреждений накопления тромбоцитов (PSL) и риском бактериального заражения. PSL возникают из-за метаболизма тромбоцитов в условиях подготовки и хранения *in vitro*. Эти изменения в конечном итоге приводят к нарушениям активации, агрегации, коагуляции и иммунных

функций тромбоцитов. Снижение температуры хранения может продлить срок годности КТ за счет снижения уровней PSL, связанных с метаболизмом и бактериальным загрязнением.

Полученные нами данные о сохранности КТ при низких температурах ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) с использованием ДМАЦ подтверждают (Ветошкин, 2015), что снижение температуры может продлить срок функциональной полноценности КТ до 6 месяцев. Этот эффект обеспечивается за счет снижения метаболизма в тромбоцитах (Ng et al., 2018). При добавлении танацетана или AU-701 к протектору ДМАЦ повышения его криозащитного эффекта не наблюдалось.

Известно, что для сохранения тромбоцитов при отрицательных температурах используют не только ДМАЦ, но и другие протекторы (Ветошкин, 2015). При использовании глицерина проявляется токсический эффект: возникает спонтанная необратимая агрегация тромбоцитов, нарушается ультраструктура мембраны и энергетический метаболизм, и при повышении концентрации глицерина тромбоциты гибнут от осмотического стресса (Костяев, 2016). Однако при дополнительном введении танацетана или AU-701 к глицерину нами показано, что способность тромбоцитов после воздействия температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 30 суток к восстановлению функциональной активности была выше, чем при использовании одного глицерина. Мы полагаем, что комплекс глицерин-полисахарид взаимодействует с поверхностными белками мембраны (Ng et al., 2018), что предотвращает их разрушение. Кроме этого, полисахариды растений обладают мощным антиоксидантным действием (Jin et al., 2015; Xue et al., 2016; Cristina Diaz et al., 2017; Xiong et al., 2020; Zaitseva et al., 2020), что также повышает устойчивость тромбоцитов к охлаждению.

Таким образом, комбинирование криопротектора глицерина с полисахаридом в среде лейкоцитов или тромбоцитов повышает физиологическую устойчивость клеток к факторам холодового стресса и обеспечивает восстановление их функциональной активности после отогрева.

#### 4.3 Совместное криозащитное действие протектора и полисахарида

«Ведущая роль в повреждении биобъектов при низкотемпературной консервации принадлежит структурно-функциональным нарушениям цитоплазматической мембраны и мембран органелл» (Сведенцов и др., 2008). Развитие температурного шока контролируется следующими механизмами: температурозависимые структурные переходы межфазно модифицированной воды, регулирующей стабильность и подвижность компонентов мембран; фазовые переходы аннулярных липидов в микродоменах систем, обогащенных холестерином и другими липофильными спиртами и основной массы липидного слоя в системах с низким уровнем холестерина. Результатом формирования обширных трансмембранных дефектов является спонтанный лизис клетки. В случае образования незначительных дефектов, соизмеримых с катионной проницаемостью, клетка способна к восстановлению структуры (Белоус и Грищенко, 1994; Гринштейн и Кост 2001; Деветьярова, 2005; Щеглова, 2005; Svedentsov et al., 2008; Худяков, 2010; Степанова, 2010; Lenné et al., 2010; Полежаева, 2013; Kent et al., 2015; Широких и др., 2020; Rekha et al., 2021; Студенческая библиотека – онлайн «Studbooks.net», 2013). Известно, что углеводы предотвращают необратимые изменения в мембранах и стабилизируют мембранные бислои во время охлаждения-замораживания (Aboagla and Terada, 2003; Arando et al., 2017), вызывают клеточную осмотическую дегидратацию во время криоконсервации, взаимодействуя с мембранными липидами и белками, и снижают риск образования внутриклеточных кристаллов льда (Agca et al., 2002; Bucak and Tekin, 2007).

Действие криопротекторов состоит в снижении количества свободной воды, повышении вязкости раствора. «Характерным свойством криопротекторов является наличие в их структуре различных полярных молекул, которые способны взаимодействовать с молекулами воды, ионами металлов и солями, а также с биополимерами и компонентами мембран» (Синёва и др., 2019; Синёва, 2020). «Способность криопротекторов влиять на

характер кристаллизации воды с формированием мелкокристаллического льда, который обладает сильными полями напряжения, учитывается при подборе криозащитной среды» (Синёва и др., 2019; Синёва, 2020). «Изменение структуры льда в присутствии криопротекторов позволит снизить степень механического воздействия на мембранные и цитоплазматические структуры клеток» (Синёва и др., 2019; Синёва, 2020). Важно, чтобы криопротектор присутствовал как внутри, так и снаружи клетки. Глицерин обладает низкой молекулярной массой, благодаря чему легко проникает сквозь плазматическую мембрану, связывает воду, замещает часть внутриклеточной воды, изменяет кристаллообразование (лед становится меньшего размера), стабилизирует концентрационный градиент, связывается со структурными элементами мембраны и уменьшает их повреждения. Полисахариды имеют высокую молекулярную массу и не способны проходить через мембрану клетки, действие их проявляется во внеклеточной среде, так же, как и у непроникающих криопротекторов, которые, образуя прочные связи с внеклеточной фракцией воды, замедляют скорость льдообразования и изменяют структуру льда.

Нами было установлено, что полисахариды совместно с глицерином проявляют нуклеирующее действие в биологической среде при ее охлаждении. Вероятно, присутствие полисахарида способствует формированию более безопасной структуры льда во время фазового перехода «вода-лед» менее травматичной для мембран. Тот факт, что применение полисахарида в качестве добавки к основному криопротектору способствует повышению сохранности клеток во время действия отрицательных температур (Utemov et. al., 2011), подтверждает высказанное предположение.

Все известные в настоящее время физиологические эффекты полисахаридов обусловлены структурными особенностями их молекул, степенью разветвления и растворимостью в воде (Shao et al., 2014; Ji et al., 2017; Zaitseva et.al., 2020). Способность полисахарида быть веществом, которое повышает устойчивость клеток к охлаждению, вероятно, также

зависит от выше указанных особенностей. Анализ структурных характеристик (таблица 1) используемых в работе полисахаридов указывает на то, что криозащитным эффектом могут обладать разные полисахариды, но с большим содержанием функциональных карбоксильных и гидроксильных групп. За счет этих групп происходит взаимодействие полисахарида с молекулами воды, глицерина (но не ДМСО, ДМАЦ, 1.2-ПД) и, возможно, мембранными компонентами клеток, что способствует стабилизации фракции свободной внеклеточной воды, формированию упорядоченной структуры льда и сохранности клеток в криоанабиозе. Известно, что трегалоза образует водородную связь с фосфолипидами мембраны и замещает молекулы воды, обеспечивая стабилизацию клеточной мембраны при криоконсервировании клеток (Ma et al., 2021). Глицерин и ДМСО также взаимодействуют с полярными группами фосфолипидов в липидном бислое, чтобы обеспечить стабильность мембраны при криоконсервировании (Eliott et. al, 2017). В целом, исследователи давно определили гидрофобные взаимодействия между сахарами, аминокислотами, протекторами и билипидным слоем мембраны, как важный фактор криопротекции (Eliott et. al, 2017; Ma et al., 2021).

Моносахаридный состав полисахаридов различен как по разнообразию, так и по процентному содержанию сахаров в молекуле. В криоконсерванты принято добавлять глюкозу, сахарозу, галактозу, рафинозу, мальтозу или их комбинации с целью регуляции метаболических и осмотических процессов в клетках (Полежаева, 2013) при охлаждении и репарации поврежденных структур клеток после отогрева (Полежаева, 2013; Caricciotti et al., 2015; Castro et al., 2018). Анализ состава моносахаров используемых нами полисахаридов (см. главу 2.1) указывает на преобладание в составе яблочного пектина галактозы (2.4%) и ксилозы (2.9%), пектина алоэ – глюкозы (2.2%), танацетана – галактозы (8.5%), арабинозы (8.4%) и рамнозы (5.5%). В составе углеводных цепей полисахаридов *H. erinaceus* идентифицированы остатки рамнозы (2.35%), фукозы (2.68%), ксилозы (0.3%), арабинозы (6.79%), маннозы (5.01%), глюкозы (9.14 %) и галактозы (9.62%). Моносахара, вероятно, кроме

участия в процессах образования льда, могут выступать в роли регуляторов осмотических и репаративных процессов, способствовать сохранности клеток при замораживании.

Существует мнение о том, что особенностью непроникающих криопротекторов является то, что они способны увеличивать проницаемость мембраны для проникающих протекторов (Белоус и Грищенко, 1994). Следовательно, добавление полисахаридов в криоконсервирующий раствор будет способствовать более быстрому проникновению глицерина внутрь клетки. Так как глицерин является отличным растворителем, то при попадании внутрь клеток он способствует связыванию и замещению воды в важных белковых структурах, стабилизирует гидратную оболочку белков, препятствуя их денатурации в процессе замораживания. Отметим, что такое замещение воды предотвращает критическое обезвоживание (быструю потерю воды) клеток, которое может вызвать непроникающий протектор полисахарид. Полисахарид и сформированные им комплексы глицерин-полисахарид вне клетки стягивают на себя воду, при этом изменяется структура воды, и повышается вероятность формирования аморфных мелких кристаллов льда в процессе замораживания. Глицерин тормозит функциональную активность клеток, что приводит к снижению их метаболической активности. В то время как полисахарид снижает токсическое действие глицерина.

После проведенного исследования можно сделать вывод, что комбинирование глицерина и полисахарида в криоконсерванте обеспечивает обоюдное усиление свойств каждого компонента. Данные протекторы работают сообща и положительно влияют друг на друга, поддерживая и стабилизируя структурно-функциональные параметры биообъектов (лейкоцитов и тромбоцитов) и, тем самым, обеспечивая их физиологическую устойчивость к холодовому стрессу.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что возможным механизмом криозащитного действия полисахаридов является образование

комплексов с глицерином. Это обеспечивает эффективную дегидратацию клеток перед охлаждением и способствуют формированию более мелкой «безопасной» структуры льда, тем самым предупреждая критические изменения в мембране клеток. Однако необходимо отметить, что механизмы действия криозащитных веществ на клетки до настоящего времени не установлены и требуют дальнейшего изучения.

## ВЫВОДЫ

1. Полисахариды: *Hericium erinaceus* (0.5%), танацетан (0.2%), яблочный пектин AU-701 (0.2%), пектин алоэ (0.2%) понижают температуру кристаллизации водного раствора глицерина (7.0%), но не диметилсульфоксида (10%), диметилацетамида (10%), 1,2-пропандиола (10%).

2. Танацетан, яблочный пектин AU-701, пектин алоэ, полисахариды *Hericium erinaceus* в концентрации 0.1 - 0.5% повышают температуру кристаллизации венозной крови в присутствии глицерина (3.5%).

3. Морфофункциональную сохранность мембран лейкоцитов при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 7 суток обеспечивает комбинирование глицерина (3.5%) с танацетаном (0.1%) / пектином из алоэ (0.1%) / яблочным пектином AU-701 (0.1%) / полисахаридами *Hericium erinaceus* (0.25%), а при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 21 суток – глицерина (3.5%) с яблочным пектином AU-701 (0.1%).

4. Сохранность мембран и функции тромбоцитов при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 30 суток обеспечивает комбинирование глицерина (3.5%) с танацетаном (0.1%) или с яблочным пектином AU-701 (0.1%).

5. Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому стрессу может быть обусловлена способностью полисахаридов к комплексообразованию с молекулами воды и глицерина, что при охлаждении биологической среды обеспечивает эффективную дегидратацию, упорядоченное кристаллообразование и предупреждает критические изменения в мембранах клеток.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Полученные данные рекомендуется использовать при разработке новых способов длительного хранения различных биологических объектов в состоянии холодого анабиоза с использованием электрических морозильников ( $-20^{\circ}\text{C}$ ;  $-80^{\circ}\text{C}$ ), а также новых комбинированных, низкотоксичных консервантов на основе глицерина и полисахарида. Данная технология может быть рекомендована в качестве альтернативного способа хранения биообъектов при температурах жидкого азота.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭ – высокоэтерифицированные

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМАЦ – диметилацетамид

КТ – концентрат тромбоцитов

ЛК – концентрат лейкоцитов

НЭ – низкоэтерифицированные

ПД – 1.2-пропандиол

СЭ – степень этерификации

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеева, Д.Б. Методические аспекты микробной обсемененности эякулята / Д.Б. Алексеева, Е.А. Дроздова // Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры. Сборник материалов Всероссийской научно-методической конференции. – Оренбург: «Оренбургский государственный университет». – 2022. – С. 4137-4139.
2. Белоус, А. М. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Л. А. Бабийчук // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 25-32.
3. Белоус, А. М. Криобиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко. – Киев: Наукова Думка, 1994. – 430 с.
4. Белоус, А. М. Проблемы криобиохимии мембранных структур / А. М. Белоус // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 1-2. – С. 19-23.
5. Бильданова, Л. Л. Основные свойства и особенности эволюции антифризных белков / Л. Л. Бильданова, Е. А. Салина, В. К. Шумный // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16. – № 1. – С. 250-270.
6. Борончук, Г. В. Криомембранология / Г. В. Борончук, И. В. Балан. – Кишинев: Stiinta, 2003. – 336 с.
7. Варнавский, С.Н. Токсикологическая оценка и эффективность применения седимина-Fe<sup>+</sup> и седимина-Se<sup>+</sup> : диссертация ... канд. ветер. наук: 06.02.03 / Варнавский Сергей Николаевич. – Москва, 2013. – 142 с.
8. Варнавский, С. Н. Токсикологическая оценка и эффективность применения седимина-Fe<sup>+</sup> и седимина-Se<sup>+</sup> [Электронный ресурс] // Лань: электронно-библиотечная система. 2013. URL: <https://e.lanbook.com/book/49960> (дата обращения: 15.02.2022)
9. Ветошкин, К.А. Разработка комбинированного криоконсерванта для замораживания и хранения тромбоцитов при низких и ультранизких температурах (лабораторно-экспериментальное исследование):

диссертация...канд.мед.наук: 14.01.21 / Ветошкин Константин Александрович. – Санкт-Петербург, 2015. – 86 с.

10. Высеканцев, И. П. Влияние колебаний температуры хранения на жизнеспособность консервированных клеток про- и эукариот / И. П. Высеканцев, О. В. Кудокоцева, Т. Ф. Петренко, Т. М. Гурина, М. И. Грошева, В. Ф. Марценюк, С. В. Кощий // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15. – № 1. – С. 33-41.

11. Высочин, И. В. Заготовка и клиническое применение криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов / И. В. Высочин, Е. Н. Кобзева, М. С. Макаров, А. С. Глухов, И. А. Тюрин, А. Е. Ключев, В. Б. Хватов // Альманах клинической медицины. – 2014. – № 30. – С. 70-76.

12. Горизонтов, П. Д. Стресс и система крови / П. Д. Горизонтов, О. И. Белоусова, М. И. Федотова. – М.: Медицина, 1983. – 239 с.

13. Гринштейн, С. В. Структурно-функциональные особенности мембранных белков / С. В. Гринштейн, О. А. Кост // Успехи биол. химии. – 2001. – Т. 41. – С. 77–104.

14. Грищенко, В. И. Возможные механизмы мембранного транспорта белков: перенос цитохрома С через митохондриальные мембраны и его роль в механизме криообновления / В. И. Грищенко, Э. И. Алексеевская // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15. – № 1. – С. 42-49.

15. Гулевский, А. К. Антифризные белки. Сообщение I. Классификация и механизм действия / А. К. Гулевский, Л. И. Релина // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19. – № 1. – С. 18-24.

16. Гулевский, А. К. Молекулярные шапероны и холодовая адаптация организмов / А. К. Гулевский, Л. И. Релина // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 26-37.

17. Гюнтер, Е. А. Пектиновые вещества клеточных культур растений: диссертация ... докт. биол. наук : 03.01.04 / Гюнтер Елена Александровна. – Сыктывкар, 2012. - 283 с.

18. Деветьярова, О.Н. Функциональная активность лейкоцитов, перенесших криоанабиоз при  $-20^{\circ}\text{C}$  : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.13, 14.00.29 / Деветьярова Ольга Нурзадиновна. – Киров, 2005. – 122 с.
19. Донченко, Л. В. Пищевая химия. Гидроколлоиды: учеб. пособие для вузов / Л. В. Донченко, Н. В. Сокол, Е. А. Красноселова; отв. ред. Л. В. Донченко. – 2-е изд. испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 180 с.
20. Жмакин, А. И. Физические основы криобиологии / А. И. Жмакин // Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178. – № 3. – С. 243-261.
21. Зайцева, О.О. Эффективность применения оригинальных криофилактиков для сохранности лейкоцитов при  $-40^{\circ}\text{C}$  / О.О. Зайцева, Т.В. Полежаева, Е.П. Сведенцев, О.Н. Соломина, С.В. Утемов // Журнал стресс – физиология и биохимия. – 2011. – Т. 7. - №.4. – С. 197-206.
22. Зайцева, О.О. Криозащитные свойства полисахаридов / О. О. Зайцева, Т.В. Полежаева, Е.А. Гюнтер, А.Н. Худяков, О.Н. Соломина, А.А. Костяев, С.В. Утемов // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии МАТЕРИАЛЫ Международной заочной научно-практической конференции. – Сыктывкар. - 2014. – С. 165-168.
23. Ивашкина, Е. П. Уровень иммуноглобулина G и функциональная активность тромбоцитов у больных гемофилией А / Е. П. Ивашкина, Е. Л. Назарова, Т. Г. Градобоева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 9. – С. 78.
24. Интернет издание – онлайн «Pandia» [Электронный ресурс] // Комбинированные консерванты в сохранении функций лейкоцитов. Автореферат. 2013. URL: <https://pandia.ru/text/79/292/8557-2.php> (дата обращения 17.03.2022)
25. Калистратова, В.С. Радиобиология инкорпорированных радионуклидов / В.С. Калистратова, И.К. Беляев, Е.С. Жорова, И.М. Парфенова Г.С. Тищенко; под ред. В.С. Калистратовой. - 2-е, изд.

Переработанное. – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2016. – 556 с.

26. Карпова, О.В. Сравнительная оценка методов заготовки, обработки и клинического применения концентратов тромбоцитов : диссертация ... кандидата мед. наук :14.01.21/ Карпова Оксана Викторовна. – Москва, 2015. – 127 с.

27. Красильникова, А. А. Криоконсервирования сперматозоидов осетровых рыб при различных скоростях замораживания / А.А. Красильникова // Состояние и пути развития аквакультуры в российской федерации в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны Материалы III национальной научно-практической конференции. Под редакцией А.А. Васильева. – Саратов: «Амирит». – 2018. – С. 179-183.

28. Лаптев, Д.С. Консервирование лейкоцитов в условиях околонулевых температур : экспериментальное исследование : диссертация ... кандидата биологических наук : 14.01.21 / Лаптев Денис Сергеевич. – Санкт-Петербург, 2010. – 99 с.

29. Лоенко, Ю. Н. Биологическая активность и механизм действия биополимеров из морских организмов: автореф. дис. ...докт. биол. наук : 03.00.04 / Лоенко Юрий Николаевич. – Владивосток, 1999. – 62 с.

30. Оводов, Ю. С. Биологически активные пектиновые полисахариды растений Республики Коми / Ю. С. Оводов // Север: наука и перспективы инновационного развития: научное издание. – 2006. – С. 236-255.

31. Овчарова, Ю.А. Химия углеводов: учебное пособие / Ю.А. Овчарова, И.И. Бочкарева. – Майкоп.: Изд-во «ИП Кучеренко В.О.», 2019. – 125 с.

32. Осташко, В. Ф. Температурный шок клеток как гидравлический удар в резонансной системе / В. Ф. Осташко, Ф. И Осташко // Цитология. – 2004. – Т. 46. – № 9. – С. 831–832.

33. Патова, О. А. Пектиновые полисахариды: структура и свойства / О.А. Патова, В.В. Головченко, Ю.С. Оводов // Известия академии наук. Серия химическая. – 2014. - №9. – С.1901.
34. Перфильева, Е. А. Совершенствование подсчета клеток в компонентах крови / Е. А. Перфильева, Л. Г. Плеская, Н. Н. Калинин // Гематология и трансфузиология. – 2003. – Т. 48. – № 2. – С. 44-46.
35. Полежаева, Т. В. Комбинированные криоконсерванты в сохранении функций лейкоцитов: диссертация ... докт. биол. наук : 14.01.21 / Полежаева Татьяна Витальевна. – Санкт-Петербург, 2013. –200 с.
36. Полежаева, Т. В. Комбинированные криоконсерванты в сохранении функций лейкоцитов : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 14.01.21 / Полежаева Татьяна Витальевна. – Санкт-Петербург, 2013. – 38 с.
37. Полежаева, Т.В. Траметоидные трутовики русской равнины как источник полисахаридов с криопротекторными свойствами / Т.В. Полежаева, А.Н. худяков, М.И. Сергушкина, И.Г. Широких, А.А. Широких, О.М. Безмельцева, О.Н. Соломина, О.О. Зайцева // Теоретическая и прикладная экология. – 2017. - №3. – С. 103-109.
38. Попов, С.В. Иммуномодулирующее действие пектиновых полисахаридов : диссертация ...докт. биол. наук : 03.01.04 / Попов Сергей Владимирович. – Сыктывкар, 2010. – 247 с.
39. Попов, С.В. Полипотентность иммуномодулирующего действия пектинов / С.В. Попов, Ю.С. Оводов // Биохимия. – 2013. - Т.78. - №7. – С. 1053-1067.
40. Потапова, С. Г. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса / С. Г. Потапова, В. С. Хрустикова, Н. В. Демидова, Г. И. Козинец // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1977. – № 9. – С. 58-59.
41. Сведенцов, Е. П. Консервирование компонентов крови при отрицательных температурах: глава в кн.: Руководство по трансфузионной медицине / Е. П. Сведенцов, А. Н. Костяев. – Киров, 1999. – С. 263-297.

42. Сведенцов, Е. П. Криоконсерванты для живых клеток / Е. П. Сведенцов. – Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН, 2010. – 80 с.
43. Сведенцов, Е. П. Функциональное состояние лейкоцитов после выхода из крианабиоза: монография / Е. П. Сведенцов, Т. В. Туманова. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 81 с.
44. Сведенцов, Е.П. Сохранение биологических мембран ядерных клеток крови при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  / С.В. Сведенцов, Т.В. Туманова, А.Н. Худяков, О.О. Зайцева, О.Н. Соломина, С.В. Утемов, Ф.С. Шерстнев // Биологические мембраны. – 2008. – Т.25. - №.1. – С. 18-24.
45. Синёва, О.Н. Низкотемпературное хранение актиномицетов - представителей рода *streptomycetes* / О.Н. Синёва, Т.Д. Иванкова, Л.П. Терехова // Антибиотики и химиотерапия. – 2019. – Т.64.- № 3-4. – С. 3-9.
46. Синёва, О. Н. Почвенные актиномицеты редких родов: выделение, антибиотические свойства и низкотемпературное хранение : диссертация ... кандидата биологических наук : 14.03.07 / Синёва Ольга Николаевна. – Москва, 2020. - 157 с.
47. Слащева, Г. А. Стресс-белки как защитное средство от эндотоксинов / Г. А. Слащева, А. Н. Мурашев // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. – 2010. – Т. 4. – С. 162-169.
48. Степанова, Е.С. Влияние переохлаждения на функциональную активность лейкоцитов : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.03.01 / Степанова Евгения Сергеевна. – Сыктывкар, 2010. - 125 с.
49. Студенческая библиотека – онлайн «[Studbooks.net](https://studbooks.net)» [Электронный ресурс] // Медицина: Понятие криоцервации и витрификации. Криопротекторы. Перспективы применения метода витрификации в медицине. 2013.- URL: <https://studbooks.net/2399633/meditsina/krioprotektory> (дата обращения: 17.03.22)

50. Хименков, А. Н. Введение в структурную криологию : учебник для вузов / А. Н. Хименков, А. В. Брушков. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 303 с.
51. Худяков, А.Н. Функциональное состояние лейкоцитов, перенесших холодовой анабиоз при  $-80^{\circ}\text{C}$  под защитой комбинированного криоконсерванта : диссертация. ... канд. биол. наук : 14.01.21 / Худяков Андрей Николаевич. – Санкт-Петербург, 2010. – 99 с.
52. Широких, И.Г. Криозащитные свойства полисахарид содержащей фракции *Hericium erinaceus* БП 16 / И.Г. Широких, Т.В. Полежаева, А.А. Широких, А.Н. Худяков, М.И. Сергушкина, Я.И. Назарова, И.Г. Патурова // известия российской академии наук. Серия биологическая. – 2020. - №1. – С. 5-11.
53. Щеглова, О.О. Функциональное состояние лейкоцитов после выхода из холодового анабиоза при умеренно-низкой температуре: диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.13, 14.00.29 / Щеглова Оксана Олеговна. – Киров, 2005. - 116 с.
54. Abazari, A. Engineered trehalose permeable to mammalian cells / A. Abazari, A. L. G. Meimetis, G. Budin, S. S. Bale, R. Weissleder, M. Toner // PLoS One. – 2015. – V. 10. – P. e0130323.
55. Aboagla, E. M. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing / E. M. Aboagla, T. Terada // Biol Reprod. – 2003. – V. 69. – P. 1245–1250.
56. Adam, M. K. Carbohydrate-based surfactants as photo controllable inhibitors of ice recrystallization / M. K. Adam, J. S. Poisson, Y. Hu, G. Prasannakumar, M. J. Pottage, R. N. Ben, B. L. Wilkinson // RSC Adv. – 2016. – V. 6 – № 45. – P. 39240–39244.
57. Adam, M. K. Photoswitchable carbohydrate-based fluorosurfactants as tuneable ice recrystallization inhibitors / M. K. Adam, Y. Hu, J. S. Poisson, M. J. Pottage, R. N. Ben, B. L. Wilkinson // Carbohydr. Res. – 2017. – V. 439. – P. 1–8.

58. Agca, Y. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extender and sugars / Y. Agca, J. Gilmore, M. Byers, E. J. Woods, J. Liu, J. K. Critser // *Biol Reprod.* – 2002. – V. 67. – P. 1493–1501.
59. Aghdai, M. H. Evaluating the effects of dithiothreitol and fructose on cell viability and function of cryopreserved primary rat hepatocytes and HepG2 cell line / M. H. Aghdai, A. Jamshidzadeh, M. Nematizadeh, M. Behzadiannia, H. Niknahad, Z. Amirghofran, E. Esfandiari, N. Azarpira // *Hepat. Mon.* – 2013. – V. 13. – P. e7824.
60. Akiyama, Y. Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by super flash freezing / Y. Akiyama, M. Shinose, H. Watanabe, S. Yamada, Y. Kanda // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2019. – V. 116. – P. 7738–7743.
61. Al-Mutary, M. G. Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: a review / M. G. Al-Mutary // *J. King Saud. Univ.* – 2021. – V. 33. – P. 101226.
62. Alvarenga, M. A. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review / M. A. Alvarenga, F. O. Papa, F. C. Landim-Alvarenga, A. S. L. Medeiros // *Anim. Reprod. Sci.* – 2005. – V. 89. – P. 105–113.
63. Amirian, J. Bone formation of a porous gelatin-pectin-biphasic calcium phosphate composite in presence of BMP-2 and VEGF / J. Amirian, N. Linh, Y. K. Min, B. T. Lee // *Int J Biol Macromol.* – 2015. – V. 76. – P. 10–24.
64. Arando, A. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification / A. Arando, A. Gonzalez, J. V. Delgado, F. A. Arrebola, C. C. Perez-Marín // *Anim. Reprod. Sci.* – 2017. – V. 181. – P. 175–185.
65. Athurupana, R. Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa / R. Athurupana, D. Takahashi, S. Ioki, H. Funahashi // *J. Reprod. Dev.* – 2005. – V. 61. – P. 205–210.
66. Attari, F. Apoptotic and necrotic effects of pectic acid on rat pituitary GH3/B6 tumor cells / F. Attari, H. Sepehri, L. Delphi, B. Goliaei // *Iran Biomed J.* – 2009. – V. 13. – P. 229-236.

67. Bailey, T. L. Protective effects of osmolytes in cryopreserving adherent neuroblastoma (Neuro-2a) cells / T. L. Bailey, M. J. Wang Solocinski, B. P Nathan, N. Chakraborty, M. A. Menze // *Cryobiology*. – 2015. – V. 71. – P. 472–480.
68. Balcerzak, A. K. Designing ice recrystallization inhibitors: from antifreeze (glyco)proteins to small molecules / A. K. Balcerzak, C. J. Capicciotti, J. G. Briard, R. N. Ben // *RSC Adv*. – 2014. – V. 4. – № 80. – P. 42682–42696.
69. Ballou, J. D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity / J. D Ballou // *Cryobiology*. –1992. – V. 29. – № 1. – P. 19–25.
70. Barbee, K. A. Mechanical Cell Injury / K. A. Barbee // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – V. 1066. – № 1. – P. 67–84.
71. Barbosa, J. R. Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies / J. R. Barbosa, M. M. D. S. Freitas, L. H. da Silva Martins, R. N. de Carvalho Junior // *Carbohydr Polym*. – 2020. – V. 229. – P. 115550.
72. Barthelemy, C. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation / C. Barthelemy, D. Royere, S. Hammah, C. Lebos, M. - J. Tharanne, J. Lansac // *Syst. Biol. Reprod. Med*. – 1990. – V. 25. – P. 29–40.
73. Baumber, J. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial potential and membrane lipid peroxidation / J. Baumber, B. A. Ball, C. G. Gravance, V. Medina, M. C. G. Davies-More // *J Androl*. – 2000. – V. 21. – P. 895-902.
74. Berg, J. M. *Biochemistry*. 5th ed. / J.M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. – New York: W.H. Freeman, 2002 – 200 p.
75. Besednova, N. N. Antiviral effects and pathogenetic targets of sulfated algae polysaccharides during influenza infection / N. N. Besednova, S. P. Kryzhanovsky, T. A. Kuznetsova, T. P. Smolina, I. D. Makarenkova, O. S. Malyarenko, S. P. Ermakova, T. S. Zaporozhets // *Health. Medical ecology. Science*. – 2018. – V. 3. – P. 5–19.

76. Besednova, N. N. Seaweed-Derived Sulfated Polysaccharides as Potential Agents for Prevention and Treatment of Influenza and COVID-19 / N. N. Besednova, T. N. Zvyagintseva, B. G. Andriukov, T. S. Zaporozhets, T. A. Kuznetsova, S. P. Kryzhanovsky, L. G. Guseva, M. Yu. Shchelkanov // *Antibiotics and Chemotherapy*. – 2021. – V. 66. – P. 50–66.
77. Bowles, D. J. Structure and function of antifreeze proteins / D. J. Bowles, P. J. Lillford, D. A. Rees, I. A. Shanks, P. L. Davies, J. Baardsnes, M. J. Kuiper, V. K. Walker // *Ser. B Biol. Sci.* – 2002. – V. 357. – № 1423. – P. 927–935.
78. Bryant, G. DSC measurement of cell suspensions during successive freezing runs: implications for the mechanisms of intracellular ice formation / G. Bryant // *Cryobiology*. – 2005. – V. 32. – № 2. – P. 114–128.
79. Bryant, G. Membrane behavior in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes / G. Bryant, K. L. Koster, J. Wolfe // *Seed Sci. Res.* – 2001. – V. 11. – № 1. – P. 17–25.
80. Bucak, M. N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen / M. N. Bucak, N. Tekin // *Small Rumin Res.* 2007. – V. 73. – P. 103–108.
81. Bucak, M. N. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process / M. N. Bucak, A. Atessahin, O. Vansh, A. Yuce, N. Tekin, A. Akaay // *Theriogenology*. – 2007. – V. 67. – P. 1060–1067.
82. Büyükleblebici, S. Cryopreservation of bull sperm: effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results / S. Büyükleblebici, P. B. Tuncer, M. N. Bucak, A. Eken, A. S. Sariözkan, U. Tasdemir, B. Ü. Endirlik // *Anim. Reprod. Sci.* – 2014. – V. 150. – P. 77–83.
83. Cai, W. Purification: Characterization and in vitro anticoagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots / W. Cai, H. Xu, L. Xie, J. Sun, T. Sun, X. Wu, Q. Fu // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V. 140. – P. 308–313.

84. Capicciotti, C. J. Small molecule ice recrystallization inhibitors enable freezing of human red blood cells with reduced glycerol concentrations / C. J. Capicciotti, J. D. R. Kurach, T. R. Turner, R. S. Mancini, J. P. Acker, R. N. Ben // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – № 1. – P. 9692.
85. Cardoso, L. M. F. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy / L. M. F. Cardoso, M. A. Pinto, P. A. Henriques, L. A. Alves // *Cryobiology.* – 2017. – V. 78. – P. 15–21.
86. Carlucci, M. J. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice / M. J. Carlucci, L. A. Scolaro, M. D. Nosedá, A. S. Cerezo, E. B. Damonte // *Antiviral Research.* – 2004. – V. 64. – № 2. – P. 137–141.
87. Carnachan, S. M. Polysaccharides from New Zealand Native Plants: A Review of Their Structure, Properties, and Potential Applications / S. M. Carnachan, T. J. Bell, S. F. R. Hinkley, I. M. Sims // *Plants.* – 2019. – V. 8. – № 6. – P.163.
88. Cassani, P. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen / P. Cassani, M. T. Beconi, C. O’Flaherty // *Anim Reprod Sci.* –2005. – V. 86. – P.163–173.
89. Castro, V. I. B. Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents / V. I. B. Castro, R. Craveiro, J. M. Silva, R. L. Reis, A. Paiva, A. R. C. Duarte // *Cryobiology.* – 2018. – V. 83. – P. 15–26.
90. Chang, Y. Preclinical and clinical studies of *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China / Y. Chang, M. Zhang, Y. Jiang, Y. Liu, H. Luo, C. Hao, P. Zeng, L. Zhang // *Discov Med.* – 2017. – V. 23. – № 127. – P. 207-219.
91. Chaytor, J. M. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation / J. L. Chaytor, J. M. Tokarew, L. K. Wu, M. Leclère, R. Y. Tam, C. J. Capicciotti, L. Guolla, E. V. Moos, C. S. Findlay, D. S. Allan, R. N. Ben // *Glycobiology.* – 2011. – V. 22. – № 1. – P. 123–133.

92. Cheewatanakornkool, K. Redox-responsive microbeads containing thiolated pectin-doxorubicin conjugate inhibit tumor growth and metastasis: An *in vitro* and *in vivo* study / K. Cheewatanakornkool, S. Niratisai, C. R. Dass, P. Sriamornsak // *Int. J. Pharm.* – 2018. – V. 545. – P. 1-9.
93. Chen, G. Comparison of the effects Of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood / G. Chen, A. Yue, Z. Ruan, Y. Yin, R. Wang, Y. Ren, L. Zhu // *Stem CellsInt.* – 2016. – V. 1396783. – P. 1–7.
94. Chen, M. Biocompatible anionic polyelectrolyte for improved liposome based gene transfection / M. Chen, X. Qu, Z. Zeng, Y. Tang // *Int. J. Pharm.* – 2015. – V. 490. – P. 173–179.
95. Chen, Q. Preparation-related structural diversity and medical potential in the treatment of diabetes mellitus with ginseng pectins / Q. Chen, L. Zhu, Y. Tang, Z. Zhao, T. Yi, H. Chen // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2017. – V. 1401. – P. 75–89.
96. Chen, Y. Bush Sophora Root polysaccharide and its sulfate can scavenge free radicals resulted from duck virus hepatitis / Y. Chen, W. Xiong, L. Zeng, Y. Wang, S. Zhang, M. Xu, M. Song, Y. Wang, H. Du, J. Liu, D. Wang, Y. Wu, Y. Hu // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2014. – V. 66. – P. 186–193.
97. Chen, Y. Polysaccharides from traditional Chinese medicines: Extraction, purification, modification, and biological activity / Y. Chen, F. K. Yao, K. Ming, D. Y. Wang, Y. L. Hu, J. G. Liu // *Molecules.* – 2016. – V. 21. – № 12. – P. 1705.
98. Cheng, B. H. Structural characterization and immunomodulatory effect of a polysaccharide HCP-2 from *Houttuynia cordata* / B. H. Cheng, J. Y. W. Chan, B.C. L. Chan, H. Q. Lin, X. Q. Han, X. L. Zhou, D. Wan, Y. – F. Wang, P. Leung, K. Fung, C. Lau // *Carbohydrate Polymers.* – 2014. – V. 103. – P. 244–249.
99. Cierieszko, A. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender / A. Cierieszko, G. J. Dietrich, J. Nynca, S. Dobosz, T. Zalewski // *Aquaculture.* – 2014. – V. 420–421. – P. 275–281.

100. Crowe, J. H. Anhydrobiosis / J. H. Crowe, A. F. A. Hoekstra, L. M. Crowe // *Annu. Rev. Physiol.* – 1992. – V. 54. – № 1. – P. 579–599.
101. Crowe, J. H. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules / J. H. Crowe, J. F. Carpenter, L. M. Crowe, T. J. Anchordoguy // *Cryobiology.* – 1990. – V. 27. – № 3. – P. 219–231.
102. Da Silva, I. S.V. Polymeric blends of hydrocolloid from chia seeds/apple pectin with potential antioxidant for food packaging applications / I. S. V. da Silva, R. M. F. de Sousa, A. de Oliveira, W. J. de Oliveira, L. A. C. Motta, D. Pasquini, H. Otaguro // *Carbohydrate Polymers.* – 2018. – V. 15. – P. 203-210.
103. Davidson, A. F. Toxicity minimized cryoprotectant addition and removal procedures for adherent endothelial cells / A. F. Davidson, C. Glasscock, D. R. McClanahan, J. D. Benson, A. Z. Higgins // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – № 11. – P. e0142828.
104. Davis, B. G. Carbohydrate chemistry / B. G. Davis, A. J. Fairbanks. – Oxford: Oxford University Press, 2002 – 99 p.
105. Di Santo, M. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for art / M. Di Santo, N. Tarozzi, M. Nadaliniw, A. Borini // *Adv Urol.* – 2012. – P. 1–12.
106. Di, T. Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra* / T. Di, G. Chen, Y. Sun, S. Ou, X. X. Zeng, H. Ye // *Journal of Functional Foods.* – 2017. – V. 28. – P. 64–75.
107. Diaz, C. A. Free radical scavenging activity of extracts from seaweeds *Macrocystis pyrifera* and *Undaria pinnatifida*: Applications as functional food in the diet of prawn *Artemesia longinaris* / Diaz, C. A., M. L. Espino, N. S Arzoz, M. S. Velurtas, A. N. Ponce, C. A. Stortz, J. L. Fenucci // *Latin American Journal of Aquatic Research.* – 2017. – V. 45. – № 1. – P. 104–112.
108. Djerassi, I. A method for preservation of viable platelets: combined effects of sugars and dimethylsulfoxide / I. Djerassi, A. Roy // *Blood.* – 1963. – V. 22. – № 6. – P. 703–717.

109. Dumitriu, S. Polysaccharides structural diversity and functional versatility / S. Dumitriu (Ed.). – Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1998. –1176 p.
110. Dwek, R. A. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars / R. A. Dwek // Chemical. Reviews. – 1996. –V. 96. – № 2. – P. 683–720.
111. Eisenberg, D. The structure and Properties of Water / D. Eisenberg, W. Kauzmann. – Oxford: Clarendon Press, 2005. – 235 p.
112. Elliott, G. D. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures / G.D. Elliott, S. Wang, B. J. Fuller // Cryobiology. – 2017. – V. 76. – P. 74–91.
113. Ermakova, S. Fucoidans from brown seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: Structural characteristics and anticancer activity / S. Ermakova, R. Sokolova, S. - M. Kim, B. - H. Um, V. Isakov, T. Zvyagintseva // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2011. – V. 164. – № 6. – P. 841–850.
114. Esmaeili, V. Dietary fatty acids affect semen quality: A review / V. Esmaeili, A. H. Shahverdi, M. H Moghadasian, A. R. Alizadeh // Andrology. – 2015. – V. 3. – № 3. – P. 450–461.
115. Fan, L. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* / L. Fan, J. Li, K. Deng, L. Ai // Carbohydrate Polymers. – 2012. – V. 87. – № 2. – P. 1849–1854.
116. Franks, F. Nucleation of ice and its management in ecosystems / F. Franks // Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. – 2003. – V. 361. – № 1804. – P. 557–574.
117. Fröba, M. Iota-carrageenan inhibits replication of SARS-COV-2 and the respective variants of concern alpha, beta, gamma and delta / M. Fröba, M. Große, C. Setz, P. Rauch, J. Auth, L. Spanaus, J. Münch, N. Ruetalo, M. Schindler, M. Morokutti-Kurz, P. Graf, E. Prieschl-Grassauer, A. Grassauer, U. Schubert // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V.22. – P. 13202.
118. Fry, L. J. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation

/ L. J. Fry, L. S. Quero, S. G. Gomez, S. McArdle, R. Rees, J. A. Madrigal // VoxSang. – 2015. – V. 109. – P. 181–190.

119. Fuller, B. Cryopreservation of Human Gametes and Embryos / B. Fuller, S. Paynter, P. Watson // Life in the Frozen State, CRC Press, Boca Raton. – 2004. – P. 505–539.

120. Gao, D. Mechanisms of cryoinjury in living cells / D. Gao, J. K. Critser // ILAR J. – 2000. – V. 41. – № 4. – P. 187–196.

121. Garde, J. J. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered *Cuvier's gazelle* (*Gazella cuvieri*) / J. J. Garde, A. del Olmo, A. J. Soler, G. Espeso, M. Gomendio, E. R. Roldan // Anim Reprod Sci. – 2008. – V. 108. – P.384 – 401.

122. Gloaguen, V. Structural characterization and cytotoxic properties of an apiose-rich pectic polysaccharide obtained from the cell wall of the marine phanerogam *Zostera marina* / V. Gloaguen, V. Brudieux, B. Closs, A. Barbat, P. Krausz, O. Sainte-Catherine, M. Kraemer, E. Maes, Y. Guerardel // J. Nat. Prod. – 2010. – V. 73. – P. 1087–1092.

123. Gronhaug, T. E. Bioactive arabinogalactans from the leaves of *Opilia celtidifolia* Endl. Ex Walp. (Opiliaceae) / T. E. Gronhaug, P. Ghildyal, H. Barsett, T. E. Michaelsen, G. Morris, D. Diallo // Glycobiology. – 2010. – V. 20. – P. 1654–1664.

124. Gross, D. C. Development, distribution and characteristics of intrinsic, nonbacterial ice nuclei in *Prunus* wood / D. C. Gross, E. L. Proebsting, H. Maccrindle-Zimmerman // Plant Physiol. – 1988. – V. 88. – № 3. – P. 915–922.

125. Groth, T. Anticoagulant potential of regioselective derivatized cellulose / T. Groth, W. Wagenknecht // Biomaterials. – 2001. – V. 22. – P. 2719-2729.

126. Gulevsky, A. K, Relina L. I. Nucleating agents of fungus plants / A. K. Gulevsky, L. I. Relina // Problems of cryobiology. – 2011. – V. 21. – № 1. – P. 3-9.

127. Harden, E. A. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus / E. A. Harden, R. Falshaw, S. M.

Carnachan, E. R. Kern, M. N. Prichard // Antiviral Research. – 2009. – V. 83. – № 3. – P. 282–289.

128. Hawkins, B. J. The effect of Cryo media selection and transient warming events on post-cryopreservation Human MSC function / B. J. Hawkins, A. Abazari, L. Lock, T. Ahsan, J. A. Rowley. J. Fink et al. // Cytotherapy. – 2018. – V. 20. – P. S40.

129. Hayakawa, J. 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and pentastarchimproves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO / J. Hayakawa, E. G. Joyal, J. F. Gildner, K. N. Washington, O. A. Phang, N. Uchida, M. M. Hsieh, J. F. Tisdale // Transfusion. – 2010. – V. 50. – P. 2158–2166.

130. He, X. Thermostability of biological systems: fundamentals, challenges, and quantification / X. He // Open Biomed. Eng. J. – 2011. – V.5. – P. 47-53.

131. Hezavehei, M. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches / M. Hezavehei, M. Sharafi, H. M. Kouchesfahani, R. Henkel, A. Agarwal, V. Esmaeili, A. Shahverdi // Reproductive BioMedicine Online. – 2018. – V. 37. – № 3. – P. 327–339.

132. Hidari, K. I. P. J. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga / K. I. P. J. Hidari, N. Takahashi, M. Arihara, M. Nagaoka, K. Morita, T. Suzuki // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2008. – V. 376. – № 1. – P. 91–95.

133. Holdt, S. L. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation / S. L. Holdt, S. Kraan // Journal of Applied Phycology. – 2011. – V. 23. – № 3. – P. 543–597.

134. Hosoya, M. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins / M. Hosoya, J. Balzarini, S. Shigeta, E. Declercq // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1991. – V. 35. – № 12. – P. 2515–2520.

135. Hsiao, H. - H. Effect of oversulfation on the composition, structure, and *in vitro* anti-lung cancer activity of fucoidans extracted from *Sargassum aquifolium*

/ H. - H. Hsiao, T. - C. Wu, Y. - H. Tsai, C. - H. Kuo, R. - H. Huang, Y. - H. Hong, C. - Y. Huang // *Mar Drugs*. – 2021. – V. 19. – P. 215.

136. Hu, J. - H. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality / J. - H. Hu, Q. - W. Li, G. Li, Z. - L. Jiang, S. - H. Bu, H. Yang, H. Yang, L. - Q. Wang // *Anim. Reprod. Sci.* – 2009. – V. 112. – P. 107–118.

137. Hu, J. - H. The cryoprotective effect on frozen–thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins / J. H. Hu, Q. W. Li, G. Li, L. Q. Wang, Z. L. Jiang // *Asian–Aust J. Anim. Sci.* – 2006. – V. 19. – P. 486–490.

138. Huang, L. Optimal length of time of cryopreserved umbilical cord blood infusion after thawing / L. Huang, G. Q. Song, Y. Wu, J. Wang, Z. M. Sun // *Hematology*. – 2014. – V. 19. – P. 73–79.

139. Huang, R. Influence of functional groups on the *in vitro* anticoagulant activity of chitosan sulfate / R. Huang, Y. Du, J. Yang, L. Fan // *Carbohydr. Res.* – 2003. – V. 338. – P. 483–489.

140. Hunt, C. J. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review / C. J. Hunt // *Transfus Med Hemother.* – 2011. – V. 38. – P. 107–123.

141. Huynh, R. Anticoagulant properties of dextranmethyl carboxylate benzylamide sulfate (DMCBSu) : a new generation of bioactive functionalized dextran / R. Huynh, F. Chaubet, J. Jozefonvicz // *Carbohydr. Res.* – 2011. – V. 332. – P. 75–83.

142. Imamura, K. Characteristics of sugar surfactants in stabilizing proteins during freeze–thawing and freeze–drying / K. Imamura, K. Murai, T. Korehisa, N. Shimizu, R. Yamahira, T. Matsuura, H. Tada, H. Imanaka, N. Ishida, K. Nakanishi // *J. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 103. – № 6. – P. 1628–1637.

143. Inngjerdingen, K. T. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by aqueous extracts and pectic polysaccharides from the roots of *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. and *Vernonia kotschyana* Sch Bip. ex Walp / K. T. Inngjerdingen, C. Thole, D. Diallo, B. S. Paulsen, A. Hensel // *Fitoterapia*. – 2014. – V. 95. – P. 127–132.

144. Jahan, S. Inhibition of ice recrystallization during cryopreservation of cord blood grafts improves platelet engraftment / S. Jahan, M. K. Adam, J. K. Manesia, E. Doxtator, R. N. Ben, N. Pineault // *Transfusion*. – 2020. – V. 60. – P. 769–778.
145. Jahromi, S. H. Degradation of polysaccharide hydrogels seeded with bone marrow stromal cells / S. H. Jahromi, L. M. Grover, J. Z. Paxton, A. M. Smith // *J Mech Behav Biomed Mater*. – 2011. – V. 4. – №. 7. – P. 1157–1166.
146. Ji, X. L. Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from jujube fruit (*Ziziphus jujube* Mill.): A review / X. L. Ji, Q. Peng, Q., Y. P. Yuan, J. Shen, X. Y. Xie, M. Wang // *Food Chemistry*. – 2017. – V. 227. – P. 349–357.
147. Jiao, L. Chemical and antihyperglycemic activity changes of ginseng pectin induced by heat processing / L. Jiao, X. Zhang, M. Wang, B. Li, Z. Liu, S. Liu // *Carbohydr. Polym*. – 2014. – V. 19. – P. 567–573.
148. Jin, L. Q. Effect of derivatives of *Achyranthes bidentate* polysaccharides on lymphocyte proliferation and induction of IL-2 and TNF- $\alpha$  / L. Q. Jin, S. X. Xue, J. X. Lu, D. M. Jia // *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*. – 2008. – V. 29. – № 5. – P. 312–314.
149. Jin, Y. Rhizoma Dioscoreae Nipponicae polysaccharides protect HUVECs from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury by regulating PPAR- $\gamma$ -factor and the NADPH oxidase/ROS-NF- $\kappa$ B signal pathway / Y. Jin, K. X. Liu, J. Y. Peng, C. Y. Wang, L., Kang, N. Chang, H. Sun // *Toxicology Letters*. – 2015. – V. 232. – № 1. – P. 149–158.
150. Kaczmarczyk, A. Development of cryopreservation for *Loxocarya cinerea* - an endemic Australian plant species important for post-mining restoration / A. Kaczmarczyk, B. Funnekotter, S. R. Turner, E. Bunn, G. Bryant, T. E. Hunt, R. L. Mancera // *Cryoletters*. – 2013. – V. 34. – № 5. – P. 508–519.
151. Karlsson, J. O. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues / Karlsson J. O., Toner M. // *Biomaterials*. – 1996. – V. 17. – P. 243–256.
152. Kasimanicham, R. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy

bulls / R. Kasimanicham, V. Kasimanicham, C. D. Thatcher, R. L. Nebel, B. G. Cassell // *Theriogenology*. – 2007. – V. 67. – P. 1004–1012.

153. Kawahara, H. Antifreeze Activity of Xylomannan from the Mycelium and Fruit Body of *Flammulina velutipes* / H. Kawahara, Y. Matsuda, T. Sakaguchi, N. Arai, Y. Koide // *Biocontrol science*. – 2016. – V. 21. – № 3. – P. 153–159.

154. Kent, B. Direct comparison of disaccharide interaction with lipid membranes at reduced hydrations / B. Kent, T. Hauß, B. Demé, V. Cristiglio, T. Darwish, T. Hunt, G. Bryant, C. J. Garvey // *Langmuir*. – 2015. – V.31. – № 33. – P. 9134–9141.

155. Khotimchenko, Y. Cerium binding activity of pectins isolated from the seagrasses *Zostera marina* and *Phyllospadix iwatensis* / Y. Khotimchenko, E. Khozhaenko, V. Kovalev, M. Khotimchenko // *Mar. Drugs*. – 2012. – V.10 – P. 834–848.

156. Khudyakov, A. N. The Effect of Pectins on Water Crystallization Pattern and Integrity of Cells During Freezing / A. N. Khudyakov, L. G. Kuleshova, O. O. Zaitseva, M. I. Sergushkina, K. A. Vetoshkin, T. V. Polezhaeva // *Biopreserv. Biobanking*. – 2019. – V. 17. – P.52-57.

157. Kokkonen, H. Affecting osteoblastic responses with in vivo engineered potato pectin fragment / H. Kokkonen, R. Verhoef, K. Kauppinen, V. Muhonen, B. Jørgensen, I. Damager, H. A. Schols, M. Morra, P. Ulvskov, J. Tuukkanen // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2012. – V. 100. – P. 111–119.

158. Komatsu, T. Antiviral activity of acidic polysaccharides from *Coccomyxa gloeobotrydiformis*, a green alga, against an *in vitro* human influenza A virus infection / T. Komatsu, N. Kido, T. Sugiyama, T. Yokochi // *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. – 2013. – V. 35. – № 1. – P. 1–7.

159. Konovalova, M. V. Prevention of postoperative adhesions by biodegradable cryogels from pectin and chitosan polysaccharides / M. V. Konovalova, P. A. Markov, G. Yu. Popova, I. R. Nikitina, K. V. Shumikhin, D. V. Kurek, V. P. Varlamov, S. V. Popov // *J Bioact Compat Polym*. – 2017. – V. 32. – P. 487–502.

160. Krog, J. O. Thermal buffering in Afro-alpine plants due to nucleating agent-induced water freezing / J. O. Krog, K. E. Zachariassen, B. Larsen, O. Smidsrød // *Nature*. – 1979. – V. 282. – № 5736. – P. 300–301.
161. Kuiper, M. J. The biological function of an insect antifreeze protein simulated by molecular dynamics / M. J. Kuiper, C. J. Morton, S. E. Abraham, A. Gray-Weale // *eLife*. – 2015. – V. 4. – P. e05142.
162. Lawson, A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions / A. Lawson, H. Ahmad, A. Sambanis // *Cryobiology*. – 2011. – V. 62. – № 2. – P. 115–122.
163. Lee, C. L. The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor* / C. L. Lee, X. T. Yang, J. M. F. Wan // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – V. 38. – № 1–2. – P. 14–21.
164. Lee, J. - B. Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay / J. - B. Lee, K. Hayashi, M. Hirata, E. Kuroda, E. Suzuki, Y. Kubo, T. Hayashi // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. – 2006. – V. 29. – № 10. – P. 2135–2139.
165. Lenné, T. Kinetics of the lamellar gel-fluid transition in phosphatidylcholine membranes in the presence of sugars / T. Lenné, C. J. Garvey, K. L. Koster, G. Bryant // *Chem. Phys. Lipids*. – 2010. – V. 163. – № 2. – P. 236–242.
166. Li, A. P. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development / A. P. Li // *Chem. Biol. Interact.* – 2007. – V. 168. – № 1. – P. 16 – 29.
167. Li, L. - F. Comprehensive comparison of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *G. sinense*: chemical, antitumor, immunomodulating and gut-microbiota modulatory properties / L. - F. Li, H. - B. Liu, Q. - W. Zhang, Z. - P. Li, T. - L. Wong, H. - Y. Fung, J. - X. Zhang, S. - P. Bai, A. - P. Lu, Q. - B. Han // *Sci Rep*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 6172.

168. Li, L. Production of natural polysaccharides and their analogues via biopathway engineering / L. Li, W. Yi, W. Chen, R. Woodward, X. Liu, P. G. Wang // In: ACS symposium series. Washington, DC: American Chemical Society; [chapter 20]. –2010. – P. 281–297.

169. Li, Q. M. Structural characterization and immunomodulatory activity of a new polysaccharide from jellyfish / Q. M. Li, J. F. Wang, X. Q. Zha, L. H. Pan, H. L. Zhang, J. P. Luo // Carbohydrate Polymers. – 2017. – V. 159. – P. 188–194.

170. Li, S. H. Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with *Morchella esculenta* / S. H. Li, A. Gao, S. Dong, Y. Chen, S. Sun, Z. F. Lei, Z. Zhang // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 96. – P. 26–34.

171. Liu, D. Isolation and structural characterization of a novel antioxidant mannoglucan from a marine bubble snail, *Bullacta exarata* (Philippi) / D. Liu, N. Liao, X. Ye, Y. Hu, D. Wu, X. Guo, J. Zhong, J. Wu, S. Chen // Marine Drugs. – 2013. – V. 11. – № 11. – P. 4464–4477.

172. Liu, J. A review of bioactive plant-polysaccharides: biological activities, functionalization and biomedical explanation / J. Liu, S. Willfor, C. Xu // Bioact Carbohydr Dietary Fibre. – 2015. – V. 5. – P. 31–61.

173. Liu, Y. Anti-Diabetic Effect of Citrus Pectin in Diabetic Rats and Potential Mechanism via PI3K/Akt Signaling Pathway / Y. Liu, M. Dong, Z. Yang, S. Pan // Int. J. Biol. Macromol. – 2016. – V. 89. – P. 484–488.

174. Liu, Y. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides / Y. Liu, Y. Sun, G. Huang // Int J Biol Macromol. – 2018. – V. 111. – P. 780–786.

175. Lovelock, J. E. (B) Het mechanism of the protective action of glycerol against hemolysis by freezing and thawing / J. E. Lovelock // Biochim. Biophys. Acta – 1953. – V.11. – P. 28–36.

176. Lovelock, J. E. (A) The hemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing / J. E. Lovelock // Biochim. Biophys. Acta. – 1953. – V. 10. – P. 414–426.

177. Lu, J. Fucoïdan extracted from the New Zealand *Undaria pinnatifida* – physicochemical comparison against five other fucoïdians: unique low molecular weight fraction bioactivity in breast cancer cell lines / J. Lu, K. Shi, S. Chen, J. Wang, A. Hassouna, L. White, F. Merien, M. Xie, Q. Kong, J. Li, T. Ying, W. White, S. Nie // *Mar. Drugs*. – 2018. – V. 16. – P. 461.
178. Luo, M. Modifications of polysaccharide-based biomaterials under structure-property relationship for biomedical applications / M. Luo, X. Zhang, J. Wu, J. Zhao // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 266. – P. 118097.
179. Ma, H. T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum* / H. T. Ma, J. F. Hsieh, S. T. Chen // *Phytochemistry*. – 2010. – V. 114. – P. 109–113.
180. Ma, Y. Advanced biomaterials in cell preservation: Hypothermic preservation and cryopreservation / Y. Ma, L. Gao, Y. Tian, P. Chen, J. Yang, L. Zhang // *Acta Biomaterialia*. – 2021. – V. 131. – P. 97-116.
181. Maiti, S. Polysaccharide Carriers for Drug Delivery / S. Maiti, S. Jana. – Woodhead Publishing Series in Biomaterials. – United Kingdom: Elsevier, 2019. – 780 p.
182. Maji, B. Introduction to natural polysaccharides / B. Maji // *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications*. – 2019. – P. 1–31.
183. Markov, P. A. Mechanical properties, structure, bioadhesion, and biocompatibility of pectin hydrogels / P. A. Markov, N. S. Krachkovsky, E. A. Durnev, E. A. Martinson, S. G. Litvinets, S. V. Popov // *J Biomed Mater Res. A*. – 2017. – V. 105. – P. 2572–2581.
184. Martin-murphy, B. V. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice / B. V. Martin-murphy, M. P. Holt, C. Ju // *Toxicol. Lett*. – 2010. – V. 192. – P. 387–394.
185. Masuelli, M. A. Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties / M. A. Masuelli // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2011. – V. 48. – № 2. – P. 286-291.
186. Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems / P. Mazur // *Science*. – 1970. – V. 168. – № 3934. – P. 939–949.

187. Mazur, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing / P. Mazur // *J. Gen. Physiol.* – 1963. – V. 47. – № 2. – P. 347–369.

188. Mazur, P. Principles of Cryobiology, in: B. J. Fuller, N. Lane, E. E. Benson (Eds.) / P. Mazur / *Life in the Frozen State*, CRC Press, Boca Raton, 2004. – P. 3–65.

189. McCarthy, D. Biochemical studies on the defects induced in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during attempted cryopreservation / D. McCarthy, J. M. Goldman, T. J. Peters // *Cryobiology.* – 1980. – V. 17. – № 6. – P. 595.

190. McCullough, J. Long-term storage of peripheral blood stem cells frozen and stored with a conventional liquid nitrogen technique compared with cells frozen and stored in a mechanical freezer / J. McCullough, R. Haley, M. Clay, A. Hubel, B. Lindgren, G. Moroff // *Transfusion.* – 2010. – V. 50. – P. 808–819.

191. Meng, F. Y. Extraction optimization and *in vivo* antioxidant activities of exopolysaccharide by *Morchella esculenta* SO-01 / F. Y. Meng, B. Zhou, R. S. Lin, L. Jia, X. N. Liu, P. Deng, K. Fan, G. Wang, L. Wang, J. Zhang // *Biore source Technology.* – 2010. – V. 101. – № 12. – P. 4564–4569.

192. Michaelsen, T. E. Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L. / T. E. Michaelsen, A. Gilije, A. B. Samuelsen, K. Hogasen, B. S. Paulsen // *Scand. J. Immunol.* – 2000. – V. 52. – P. 483–489.

193. Mitrus, I. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% And 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem Cell transplantation: results of a prospective, randomized study / I. Mitrus, A. Smagur, W. Fidyk, M. Czech, M. Prokop, A. Chwieduk, M. Glowala-Kosinska, T. Czerw, M. Sobczyk-Kruszelnicka, W. Mendrek, K. Michalak, M. Sados-Wojciechowska, J. Najda, J. Holowiecki, S. Giebel // *Bone Marrow Transplant.* – 2018. – V. 53. – P. 274–280.

194. Mori, S. Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions / S. Mori, J. Choi, R. V. Devireddy, J. C. Bischof // *Cryobiology*. – 2012. – V. 65. – № 3. – P. 242–255.
195. Morris, G. J. Controlled ice nucleation in cryopreservation – a review / G. J. Morris, E. Acton // *Cryobiology*. – 2013. – V. 66. – P. 85–92.
196. Motta, J. P. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood / J. P. Motta, F. H. Paraguassu-Braga, L. F. Bouzas, L. C. Porto // *Cryobiology*. – 2014. – V. 68. – P. 343–348.
197. Ng, M. S.Y. Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? / M. S. Y. Ng, J. - P. Tung, J. F. Fraser // *Transfusion Medicine Reviews*. – 2018. – V. 32. – № 3. – P. 144–154.
198. Noreen, A. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review / A. Noreen, Z. H. Nazli, J. Akram, I. Rasul, A. Mansha, N. Yaqoob, R. Iqbal, S. Tabasum, M. Zuber, K. M. Zia // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2017. – V. 101. – P. 254–272.
199. Nynca, J. Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from *Salmonidae species* / J. Nynca, S. Judycka, E. Liszewska, S. Dobosz, J. Grudniewska, K. Arai, A. Ciereszko // *Aquaculture*. – 2016. – V. 464. – P. 340–348.
200. Oldenhof, H. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents / H. Oldenhof, M. Gojowsky, S. Wang, S. Henke, C. Yu, K. Rohn, W. F. Wolkers, H. Sieme // *Biol. Reprod.* – 2013. – V. 88. – № 3. – P. 68.
201. Oliyaei, N. Therapeutic activity of fucoidan and carrageenan as marine algal polysaccharides against viruses / N. Oliyaei, M. Moosavi-Nasab, S. M. Mazloomi // *3Biotech*. – 2022. – V. 12. – P.154.
202. Oughton, J. The purification of water by freeze-thaw or zone melting / J. Oughton, S. Xu, R. Battino // *J. Chem. Educ.* – 2001. – V. 78. – № 10. – P. 1373.

203. Ozkavukcu, S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa / S. Ozkavukcu, E. Erdemli, A. Isik, D. Oztuna, S. Karahuseyinoglu // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2008. – V. 25. – P. 403–411.
204. Pahlavani, M. A. Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats / M. A. Pahlavani, M. D. Harris // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1998. – V. 25. – № 8. – P. 903–913.
205. Panggabean, J. A. Antiviral Activities of Algal-Based Sulfated Polysaccharides / J. A. Panggabean, S. P. Adiguna, S. I. Rahmawati, P. Ahmadi, E. N. Zainuddin, A. Bayu, M. Y. Putra // *Molecules.* – 2022. – V. 27. – P. 1178.
206. Peng, Z. F. Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*) / Z. F. Peng, M. Liu, Z. X. Fang, J. L. Wu, Q. Q. Zhang // *Carbohydrate Polymers.* – 2012. – V. 89. – № 4. – P. 1022–1026.
207. Pennell, C. A. Heat shock proteins in immune response in the Fall of 2004 / C. A. Pennell // *Immunology.* – 2005. – V. 114. – № 3. – P. 297–300.
208. Petera, B. Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from *Cereus triangularis* cladodes / B. Petera, C. Delattre, G. Pierre, A. Wadouachi, R. Elboutachfaiti, E. Engel, L. Poughon, P. Michaud, T. A. Fenoradosoa // *Carbohydrate Polymers.* – 2015. – V. 127. – P. 372–380.
209. Polezhaeva, T. V. Use of pectin polysaccharides for cryopreservation of biological objects / T. V. Polezhaeva, O. O. Zaitseva, A. N. Khudyakov, D. S. Laptev, V. V. Golovchenko, E. A. Gordiyenko, L. G. Kuleshova // *Arch Bio Sci.* – 2014. – V. 66. – № 3. – P. 1025–1033.
210. Popov, S. V. Adjuvant effect of lemnan, pectic polysaccharide of callus culture of *Lemna minor* L. at oral administration / S. V. Popov, E. A. Gunter, P. A. Markov // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* – 2006. – V. 28. – P. 141–152.
211. Popov, S. V. Anti-inflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre* L. / S. V. Popov, G. Yu. Popova, R. G. Ovodova, Yu. S. Ovodov // *Fitoterapia.* – 2005. – V. 76. – P. 281–287.

212. Popov, S. V. Immunostimulating activity of pectic polysaccharide from *Bergenia classifolia* (L.) Fritsch / S. V. Popov, G. Yu. Popova, S. Yu. Nikolaeva // *Phytotherapy Res.* – 2005. – V. 19. – P. 1052–1056.
213. Popov, S. V. Inhibition of neutrophil adhesion by pectic galacturonans / S. V. Popov, R. G. Ovodova, G. Yu. Popova, I. R. Nikitina, Yu. S. Ovodov // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2007. – V. 33. – P. 175–180.
214. Popov, S. V. Injectable hydrogel from plum pectin as a barrier for prevention of postoperative adhesion / S. V. Popov, G. Yu. Popova, I. R. Nikitina P. A. Markov, D. S. Latkin, V. Golovchenko, O. Patova, N. S. Krachkovsky, V. Smirnov, E. Istomina, K. Shumikhin, A. A. Burkov, E. A. Martinson, S. G. Litvinets // *J Bioact Compat Polym.* – 2016. – V. 1. – P. 1–17.
215. Popov, S. V. Preventive anti-inflammatory effect of potamogetonan, pectin of common pondweed *Potamogeton natans* L. / S. V. Popov, G. Yu. Popova, O. A. Koval, N. M. Paderin, R. G. Ovodova, Yu. S. Ovodov // *Phytotherapy Res.* – 2007. – V. 21. – P. 609–614.
216. Pristov, J. B. A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides / J. B. Pristov, A. Mitrović, I. Spasojević // *Carbohydr. Res.* – 2011. – V. 346. – P. 2255–2259.
217. Qiu, S. L. Optimization of selenylation conditions for *Lycium barbarum* polysaccharide based on antioxidant activity / S. L. Qiu, J. Chen, X. Chen, Q. Fan, C. S. Zhang, D. Y. Wang, X. Li, X. Chen, X. Chen, C. Liu, Z. Gao, H. Li, Y. Hu // *Carbohydrate Polymers.* – 2014. – V. 103. – № 1. – P. 148–153.
218. Queiroz, K. C. S. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae / K. C. S. Queiroz, V. P. Medeiros, L. S. Queiroz, L. R. D. Abreu, H. A. O. Rocha, C. V. Ferreira, M. B. Jucá, H. Aoyama, E. L. Leite // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2008. – V. 62. – № 5. – P. 303–307.
219. Raju, R. NOctyl (Thio) glycosides as potential cryoprotectants: glass transition behaviour, membrane permeability, and ice recrystallization inhibition studies / R. Raju, T. Merl, M.K. Adam, E. Staykov, R.N. Ben, G. Bryant, B. L. Wilkinson // *Aust. J. Chem.* – 2019. – V. 72. – № 8. – P. 637–643.

220. Raposo, M. F. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae / M. F. D. Raposo, R. de Moraes, A. de Moraes // *Marine Drugs*. – 2013. – V. 11. – № 1. – P. 233–252.

221. Raposo, M. F. D. Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke / M. F. D. Raposo, A. M. M. B. de Moraes // *Life Sciences*. – 2015. – V. 125. – P. 32–41.

222. Rekha, R. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability / R. Rekha, B. J. Saffron, W. L. Brendan, B. Gary // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). General Subjects*. – 2021. – V. 1865. – № 1. – P. 129749.

223. Ren, L. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: A review / L. Ren, C. Perera, Y. Hemar // *Food & Function*. – 2012. – V. 3. – № 11. – P. 1118–1130.

224. Rodrigues, J. P. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood / J. P. Rodrigues, F. H. Paraguassú-Braga, L. Carvalho, E. Abdelhay, L. F. Bouzas, L. C. Porto // *Cryobiology*. – 2008. – V. 56. – P. 144–151.

225. Rogers, I. Human UC-blood banking: impact of blood volume, cell separation and cryopreservation on leukocyte and CD34+ cell recovery / I. Rogers, D. R. Sutherland, D. Holt, F. Macpate, A. Lains, S. Hollowell, B. Cruickshank, R. F. Casper // *Cytotherapy*. – 2001. – V. 3. – № 4. – P. 269–276.

226. Russo, D. Hydration Dynamics Near a Model Protein Surface / D. Russo, G. Hura, T. Head-Gordon // *Biophysical Journal*. – 2004. – V. 86. – № 3. – P. 1852–1862.

227. Sa-Ardrit, M. Ultrastructural alterations of frozenthawed asian elephant (*elephas maximus*) spermatozoa / M. Sa-Ardrit, J. Saikhun, N. Thongtip, M. Damyang, S. Mahasawangkul, T. Angkawanish, S. Jansittiwate, T. Faisaikarm, Y. Kitiyanant, K. Pavasuthipaiit, A. Pinyopummin // *Int. J. Androl*. – 2006. – V. 29. – P. 346–352.

228. Said, T. M. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury / T. M. Said, A. Gaglani, A. Agarwal // *Reprod. Biomed. Online.* – 2010. – V. 21. – P. 456–462.
229. Sanogo, R. Medicinal plants traditionally used in Mali for dysmenorrhea / R. Sanogo // *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* – 2011. – V. 8. – P. 90–96.
230. Santos, R. R. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female / R. R. Santos, C. Amorim, S. Cecconi, M. Fassbender, M. Imhof, J. Lornage, M. Paris, V. Schoenfeldt, B. Martinez-Madrid // *Animal Reproduction Science.* – 2010. – V. 122. – P. 151–163.
231. Sasnoor, L. M. Supplementation of conventional freezing medium with a combination of catalase and trehalose results in better protection of surface molecules and functionality of hematopoietic cells / L. M. Sasnoor, V. P. Kale, L. S. Limaye // *J Hematother StemCellRes.* – 2003. – V. 12. – P. 553–564.
232. Schepetkin, I. A. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential / I. A. Schepetkin, M. T. Quinn // *International Immunopharmacolog.* – 2006. – V. 6. – № 3. – P. 317–333.
233. Schrader, A. M. Communication: contrasting effects of glycerol and DMSO on lipid membrane surface hydration dynamics and forces / A. M. Schrader, C. - Y. Cheng, J. N. Israelachvili, S. Han // *J. Chem. Phys.* – 2016. – V. 145. – № 4. – P. 041101.
234. Shao, P. Chemical characterization: Antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* / P. Shao, X. X. Chen, P. L. Sun // *Carbohydrate Polymers.* – 2014. – V. 105. – P. 260–269.
235. Shu, Z. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion / Z. Shu, S. Heimfeld, D. Gao // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – V. 49. – № 4. – P. 469–476.
236. Sieme, H. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation / H. Sieme, H. Oldenhof, W. F. Wolkers // *Anim. Reprod. Sci.* – 2016. – V. 169. – P. 2–5.

237. Srivastava, P. K. Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-Peptide complexes / P. K. Srivastava // *Curr. Oncol. Rep.* – 2005. – V. 7. – № 2. – P. 104-108.

238. Steponkus, P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation / P. L. Steponkus // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1984. – V. 35. – № 1. – P. 543–584.

239. Streczynski, R. Current issues in plant cryopreservation and importance for *ex situ* conservation of threatened Australian native species / R. Streczynski, H. Clark, L. M. Whelehan, S. - T. Ang, L. K. Hardstaff, B. Funnekotter, E. Bunn, C. A. Offord, K. D. Sommerville, R. L. Mancera // *Aust. J. Bot.* – 2019. – V. 67. – № 1. – P. 1–15.

240. Su, C. Novel glyceryl glucoside is a low toxic alternative for cryopreservation agent / C. Su, A. J. Allum, Y. Aizawa, T. A. Kato // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – V. 476. – № 4. – P. 359–364.

241. Sui, X. Betaine combined with membrane stabilizers enables solvent-free whole blood cryopreservation and one-step Cryoprotectant removal / X. Sui, C. Wen, J. Yang, H. Guo, W. Zhao, Q. Li, J. Zhang, Y. Zhu, L. Zhang // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2019. – V. 5. – № 2. – P. 1083–1091.

242. Sutovska, M. Antitussive activity of polysaccharides isolated from the Malian medicinal plants / M. Sutovska, S. Franova, L. Priseznakova, G. Nosal'ova, A. Togola, D. Diallo // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2009. – V. 44. – P. 236–239.

243. Svedentsov, E. P. Cooling solution for freezing nuclear blood cells / E. P. Svedentsov, O. O. Zaitseva, O. N. Solomina, T. V. Polezhaeva, A. N. Khudyakov, D. S. Laptev, S. V. Utemov, A. A. Kostyaev // RU 2012/2464991 C1, *Bull.* 30, 2012.

244. Svedentsov, E. P. Cryoprotective action of Lemnan, a pectin from the duckweed *Lemna minor* / E. P. Svedentsov, T. V. Tumanova, R. G. Ovodova, V. V. Golovchenko, O. O. Zaitseva, O. N. Solomina, E. S. Stepanova, Yu. S. Ovodov // *Dokl. Biol. Sci.* – 2008. – V. 421. – P. 233–234.

245. Svedentsov, E.P. Cryopreservation of functionally active blood nuclear cell membranes at -80°C / E. P. Svedentsov, T. V. Tumanova, A. N. Khudyakov, O.

O. Zaytseva, O. N. Solomina, S. V. Utemov, F. S. Sherstnev // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. - 2008. - V. 2. - № 1. - P. 19-25.

246. Svedentsov, E.P. Preservation of leukocytes at moderately low temperatures / E.P. Svedentsov, D.S. Laptev, T.V. Polezhaeva, O.O. Zaitseva, A.N. Khudyakov, O.N. Solomina // Human Physiology. - 2012. - T. 38. - № 5. - P. 558-561.

247. Talarico, L. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell / L. B. Talarico, C. A. Pujol, R. G. M. Zibetti, P. C. S. Faria, M. D. Nosedá, M. E. R. Duarte, E. B. Damonte // Antiviral Research. – 2005. – V. 66. – № 2–3. – P. 103–110.

248. Tang, L. Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida* / L. Tang, Y. C. Chen, Z. B. Jiang, S. P. Zhong, W. Z. Chen, F. C. Zheng, S. Ganggang // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 94. – P. 642–652.

249. Tang, S. M. Astragalus polysaccharide improves type 2 diabetes mellitus in rats by protecting islet  $\beta$ -cells / S. M. Tang, Z. M. Yang, W. Q. Chen, Q. F. Yuan, S. Y. Chen, H. Z. Li // Academic Journal of Second Military Medical University. – 2017. – V. 38. – №4. – P. 482–487.

250. Toner, M. Nucleation of ice crystals inside biological cells, in: P.L. Steponkus (Ed.), Advances in Low-Temperature Biology, V. 2 / M. Toner. – UK: JAI Press Ltd., Hampton Hill, 1993. – 51 p.

251. Tuncer, P. B. The effect of raffinose and methionine on frozen/*thawed* *Angora buck* (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities / P. B Tuncer, M. N. Bucak, S. Sarıözkan, F. Sakin, D. Yeni, I. H. Çig̃erci, A. Ates, s, ahin, F. Avdatek, M. Gündog̃an, O. Büyükleblebici // Cryobiology. – 2010. – V. 61. – P. 89–93.

252. Ullah, K. Pectin-based (LA-co-MAA) Semi-IPNS as a Potential Biomaterial for Colonic Delivery of Oxaliplatin / K. Ullah, M. Sohail, M. A.

Buabeid, G. Murtaza, A. Ullah, H. Rashid, M. A. Khan, S. A. Khan // *Int. J. Pharm.* – 2019. – V. 569. – P. 118557.

253. Urja, P. Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview / P. Urja, U. Dhuldhaj, N. S. Sahay // *Nat Prod Res.* – 2019. – V. 33. – № 18. – P. 2668-2680.

254. Utemov, S.V. Efficiency of application original preservatives for conservation leukocytes at -40 °C / S.V. Utemov, O.N. Solomina, E.P. Svedentsov, O.O Zaytseva // *Journal of stress physiology & biochemistry.* – 2011. – V.7. - №. 4. – P. 197-206.

255. Valeri, C. R. Circulation and hemostatic function of autologous fresh, liquid - preserved, and cryopreserved baboon platelets transfused to correct an aspirin-induced thrombocytopenia / C. R. Valeri, H. MacGregor, A. Giorgio, G. Rago // *Transfusion.* – 2002. – V. 42. – P. 1206-1216.

256. Van den Ende, W. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? / W. Van den Ende, R. Valluro // *J Exp Bot.* – 2009. – V. 60. – P. 9–18.

257. Villalobos, V. M. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm / V. M. Villalobos, P. Ferreira, A. Mora // *Biotechnology Advances.* – 1991. – V. 9. – № 2. – P. 197–215.

258. Vityazev, F. V. Synthesis of sulfated pectins and their anticoagulant activity / F. V. Vityazev, V. V. Golovchenko, O. A. Patova, Y. S. Ovodov, N. N. Drozd, V. A. Makarov, A. S. Shashkov // *Biochemistry (Moscow).* – 2010. – V. 75. –P. 759–768.

259. Vongchan, P. Anticoagulant activity of a sulfated chitosan / P. Vongchan, W. Sajomsang, D. Subyen, P. Kongtawelert // *Carbohydr. Res.* – 2002. – V. 337. – P. 1239-1242.

260. Walters, C. Longevity of cryogenically stored seeds / C. Walters, L. Wheeler, P. C. Stanwood // *Cryobiology.* – 2004. – V. 48. – № 3. – P. 229–244.

261. Walters, K. R. A thermal hysteresis-producing xylomannan glycolipid antifreeze associated with cold tolerance is found in diverse taxa / K. R. Walters, A.

S. Serianni, Y. Voituren, T. Sformo, B. M. Barnes, J. G. Duman // *J. Comp. Physiol. B.* – 2011. – V. 181. – № 5. – P. 631–640.

262. Wang, B. X. Hypoglycemic activity of ginseng glycopeptide / B. X. Wang, Q. L. Zhou, M. Yang, Y. Wang, Z. - Y. Cui, Y. - Q. Liu, T. Ikejima // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2003. – V. 24. – № 1. – P. 50–54.

263. Wang, C. Antitumor and Immunomodulatory Activities of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides in Glioma-Bearing Rats / C. Wang, S. Shi, Q. Chen, S. Lin, R. Wang, S. Wang, C. Chen // *Integr Cancer Ther.* – 2018. – V. 17. – № 3. – P. 674–683.

264. Wang, D. D. Polysaccharide isolated from *Sarcodon aspratus* induces RAW264.7 activity via TLR4-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways / D. - D. Wang, W. - J. Pan, S. Mehmood, X. - D. Chen, Y. Chen // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – V. 120. – P. 1039-1047.

265. Wang, J. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer / J. Wang, S. Li, Y. Fan, Y. Chen, D. Liu, H. Cheng, X. Gao, Y. Zhou // *J. Ethnopharmacol.* – 2010. – V. 130. – P. 421–423.

266. Wang, P. C. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review / P. C. Wang, S. Zhao, B. Y. Yang, Q. H. Wang, H. X. Kuang // *Carbohydrate Polymers.* – 2016. – V. 148. – P. 86–97.

267. Wang, Z. - J. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides / Z. - J. Wang, J. - H. Xie, S. - P. Nie, M. - Y. Xie // *Food & Function.* – 2017. – V. 8. – № 3. – P. 915–926.

268. Wang, Z. Sulfated *Cyclocarya paliurus* polysaccharides markedly attenuates inflammation and oxidative damage in lipopolysaccharide-treated macrophage cells and mice / Z. Wang, J. Xie, Y. Yang, F. Zhang, S. Wang, T. Wu, T., M. Shen, M. Xie // *Scientific Reports.* – 2017. – V. 7. – P. 40402.

269. Wang, X. Evaluation of Manganese Oxide Octahedral Molecular Sieves for CO and C<sub>3</sub>H<sub>6</sub> Oxidation at Diesel Exhaust Conditions / X. Wang, W. Tan, K. Guo, J. Ji, F. Gao, Q. Tong, L. Dong // *Front. Environ. Chem.* – 2021. – V.2.

270. Wasser, S. P. Medicinal mushroom science: current prospects, advances, evidences, and challenges / S. P. Wasser // *Biosphere*. – 2015. – V. 7. – № 2. – P. 238–248.
271. Witvrouw, M. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs / M. Witvrouw, E. DeClercq // *General Pharmacology-the Vascular System*. – 1997. – V. 29. – № 4. – P. 497–511.
272. Wolfe, G. Bryant // *Int. J. Refrig.* – 2001. – V. 24. – № 5. – P. 438–450.
273. Wolfe, J. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects / J.
274. Wolfe, J. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane– solute– water systems / J. Wolfe, G. Bryant // *Cryobiology*. – 1999. – V. 39. – № 2. – P. 103–129.
275. Wolfe, J. What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there? / J. Wolfe, G. Bryant, K. L. Koster // *Cryoletters*. – 2002. – V. 23. – № 3. – P. 157–166.
276. Wouters, J. A. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food related bacteria / J. A. Wouters, F. M. Rombouts, O. P. Kuipers, W. M. de Vos, T. Abee // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2000. – V. 23. – P. 165-173.
277. Wu, Y. - Z. Selective estrogen receptor modulator: A novel polysaccharide from *Sparganii Rhizomai* induces apoptosis in breast cancer cells / Y. - Z. Wu, J. Sun, Y. - B. Wang // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – V. 163. – P. 199–207.
278. Xiao, Z. Fungal polysaccharides / Z. Xiao, W. Zhou, Y. Zhang // *Advances in Pharmacology*. – 2020. – V. 87. – P. 277-299.
279. Xie, J. H. Sulfated modification: characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* / J. H. Xie, Z. J. Wang, M. Y. Shen, S. P. Nie, B. Gong, H. S. Li, Q. Zhao, W. Li, M. Xie // *Food Hydrocolloids*. – 2016. – V. 53. – P. 7–15.
280. Xie, Y. - Z. *Ganoderma lucidum* inhibits tumour cell proliferation and induces tumor cell death / Y. - Z. Xie, S. - Z. Li, A. Yee, D. P. La Pierre, Z. Deng,

D. Y. Lee, Q. Wu, Q. Chen, C. Li, Z. Zhang, J. - Q. Guo, Z. Jiang, B. B. Yang // Enzyme and Microbial Technology. – 2006. – V. 40. – № 1. – P. 177–185.

281. Xiong, C. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the structure and antioxidant activity of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella sextelata* / C. Xiong, P. Li, Q. Luo, J. Yan, J. Zhang, X. Jin, W. Huang // Biosci Rep. – 2020. – V. 40. – № 9. – P. BSR20194522.

282. Xue, H. Astragalus polysaccharides inhibits PCV2 replication by inhibiting oxidative stress and blocking NF- $\kappa$ B pathway / H. Xue, F. Gan, Z. Zhang, J. Hu, X. Chen, K. Huang // International Journal of Biological Macromolecules. – 2015. – V. 81. – № 7. – P. 22–30.

283. Yamada, H. Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan Proteins, in: R. D. Nothnagel (Ed.) / H. Yamada – Boston: Kluwer Acad. Publ., 2000. – P. 221–251.

284. Yamada, H. Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures / H. Yamada, H. Kiyohara // Elsevier, Oxford. – 2007. – P. 663–694.

285. Yanez-Ortiza, I. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep / I. Yanez-Ortiza, J. Catalan, J. E. Rodriguez-Gil, J. Miro, M. Yeste // Animal Reproduction Science. Available online. – 2021. – V. 3. – P. 106904.

286. Yang, C. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* / C. Yang, D. Chung, I. - S. Shina, H. Lee, J. Kim, Y. Lee, S. You // International Journal of Biological Macromolecules. – 2008. – V. 43. – № 5. – P. 433–437.

287. Yang, H. J. Effect study of Poriapolysaccharide oral solution with oxaliplatin+capecitabine on quality of life and Immune function in the treatment of patients with advanced gastric cancer / H. J. Yang, D. Tian, Z. X. Liu, J. Wu // Medical Innovation of China. – 2017. – V. 14. – № 17. – P. 23–26.

288. Yeste, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs / M. Yeste // Theriogenology. – 2016. – V. 85. – P. 47–64.

289. Yoshioka T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated oxygen toxicity in the blood / T. Yoshioka, K. Kawada, S. Shimada // *Am J Obstet Gynecol.* – 1979. – V. 135. – P. 372–376.
290. Young T. P. Micro environmental role of a secreted aqueous solution in the Afro-Alpine plant *Lobelia keniensis* / T. P. Young, S. Van Orden Robe // *Biotropica.* – 1986. – V. 18. – № 3. – P. 267–269.
291. Yu, Q. Macrophage immunomodulatory activity of a purified polysaccharide isolated from *Ganoderma atrum* / Q. Yu, S. P. Nie, W. J. Li, W. Y. Zheng, P. F. Yin, D. M. Gong, M. Y. Xie // *Phytotherapy Research.* – 2013. – V. 27. – № 2. – P. 186–191.
292. Yu, Y. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review / Y. Yu, M. Shen, Q. Song, J. Xie // *Carbohydrate Polymers.* – 2018. – V. 183. – P. 91–101.
293. Yu, Y. Sulfated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* enhances the immunomodulatory activity of macrophages / Y. Yu, M. Shen, Z. Wang, Y. Wang, M. Xie, J. Xie // *Carbohydrate Polymers.* – 2017. – V. 174. – P. 669–676.
294. Yu, Z. - W. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (review) / Z. - W. Yu, P. J. Quinn // *Mol. Membr. Biol.* – 1998. – V. 15. – № 2. – P. 59–68.
295. Zaitseva, O. O. Application of pectin from *Rauvolfia serpentina* (L.) benth to the cryopreservation of human leucocyte cell suspensions / O. O. Zaitseva, T. V. Plezhaeva, O. N. Solomina, A. N. Khudyakov, V. V. Golovchenko // *CryoLetters.* – 2018. – V. 39. – P. 72–78.
296. Zaitseva, O. O. Solution for cell suspensions preservation / O. O. Zaitseva, T. V. Plezhaeva, A. N. Khudyakov, O. N. Solomina, V. V. Golovchenko // RU 2017/2621295 C2, 2017.
297. Zaitseva, O. Pectins as a universal medicine / O. Zaitseva, A. Khudyakov, M. Sergushkina, O. Solomina, T. Polezhaeva // *Fitoterapia.* – 2020. – V. 146. – P. 104676.

298. Zaitseva, O. Seaweed sulfated polysaccharides and their medicinal properties / O. Zaitseva, M. Sergushkina, A. Khudyakov, T. Polezhaeva, O. Solomina // *Algal Research*. – 2022. – V. 68. – P. 102885.

299. Zaitseva, O. O. Influence of pectins on NADPH oxidase and phagocytic activity of neutrophils during cryopreservation / O. O. Zaitseva, T. V. Polezhaeva, A. N. Khudyakov, O. N. Solomina, D. S. Laptev, E. P. Svedentsov, S. V. Utemov, A. A. Kostyaev // *CryoLetters*. – 2013. – V. 34. –P. 544–548.

300. Zeng, P. Chemical, biochemical, preclinical and clinical studies of *Ganoderma lucidum* polysaccharide as an approved drug for treating myopathy and other diseases in China / P. Zeng, Z. Guo, X. Zeng, C. Hao, Y. Zhang, M. Zhang, Y. Liu, H. Li, J. Li, L. Zhang // *J Cell Mol Med*. – 2018. – V. 22. – № 7. – P. 3278-3297.

301. Zhang, D. Partial characterization, antioxidant and antitumor activities of three sulfated polysaccharides purified from *Bullacta exarata* / D. Zhang, H. Wu, Z. Xia, C. Wang, J. Cai, H. Zhenhua, L. Du, P. Sun, J. Xie // *Journal of Functional Foods*. – 2012. – V. 4. – № 4. – P. 784–792.

302. Zhang, R. - L. Evaluation of antioxidant and immunity-enhancing activities of *Sargassum pallidum* aqueous extract in gastric cancer rats / R. - L. Zhang, W. - D. Luo, T. - N. Bi, S. - K. Zhou // *Molecules*. – 2012. – V. 17. – № 7. – P. 8419–8429.

303. Zhang, X. B. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of cfus, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-scid repopulating cells / X. B. Zhang, K. Li, K. H. Yau, K. S. Tsang, T. F. Fok, C. K. Li, S. M. Lee, P. M. Yuen // *Transfusion*. – 2003. – V. 43. – P. 265–272.

304. Zhang, K – J. Traditional Chinese Medicine for Coronary Heart Disease: Clinical Evidence and Possible Mechanisms / K- J. Zhang, Q. Zheng, P –C. Zhu, Q. Tong, Z. Zhuang, J – Z. Zhu, X – Y. Bao, Y – Y. Huang, G – Q. Zheng, Y. Wang // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. - V. 10. – P. 844.

305. Zhao, G. Microfluidics for cryopreservation / G. Zhao, J. Fu // *Biotechnol. Adv.* – 2017. – V. 35. – № 2. – P. 323–336.
306. Zhao, J. Synthetic polyampholytes as macromolecular cryoprotective agents / J. Zhao, M. A. Johnson, R. Fisher, N. A. D. Burke, H. D. H. Stöver // *Langmuir*. – 2019. – V. 35. – № 5. – P. 1807–1817.
307. Zhao, L. Y. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* / L. Y. Zhao, Y. H. Dong, G. T. Chen, O. H. Hu // *Carbohydrate Polymers*. – 2010. – V. 80. – № 3. – P. 783–789.
308. Zhao, Z. Y. The role of modified citrus pectin as an effective chelator of lead in children hospitalized with toxic lead levels / Z. Y. Zhao, L. Liang, X. Fan, Z. Yu, A. T. Hotchkiss, B. J. Wilk, I. Eliaz // *Altern. Ther. Health. Med.* – 2008. – V. 14. – P. 34–38.
309. Zhou, W. The antidiabetic effect and potential mechanisms of natural polysaccharides based on the regulation of gut microbiota / W. Zhou, G. Chen, D. Chen, H. Ye, X. Zeng // *Journal of Functional Foods*. – 2020. – V. 75. – P. 104222.