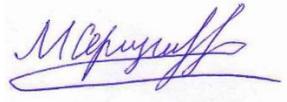


На правах рукописи

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'М. Сергушкина', is written over a light blue rectangular background.

**Сергушкина Марта Игоревна**

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ  
ЛЕЙКОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ К ХОЛОДОВОМУ  
СТРЕССУ В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИСАХАРИДОВ**

1.5.5. – Физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Сыктывкар – 2023

Работа выполнена в Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, доцент  
**Полежаева Татьяна Витальевна**

**Официальные оппоненты:** **Межевикина Людмила Михайловна,**  
доктор биологических наук, Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"», и.о. руководителя лаборатории биологических эффектов электромагнитных, магнитных и акустических воздействий (г. Пушино).  
**Атрощенко Михаил Михайлович,**  
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией криобиологии (п. Дивово, Рязанская обл.).

**Ведущая организация:** Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России (гп. Кузьмоловский, Ленинградская обл.).

Защита диссертации состоится 11 октября 2023 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.038.01 в Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, [nivarlam@physiol.komisc.ru](mailto:nivarlam@physiol.komisc.ru)  
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, д. 24 и на сайте <http://www.physiol.komisc.ru/>  
Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета



Варламова Н.Г.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 холодовом 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 цитоплазмы 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; Девятьярова, 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; Elliott 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 -СООН 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 от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  (Polezhaeva et al., 2014; Zaitseva et al., 2017, 2018; Khudyakov et al., 2019). Hu 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 (но не диметилсульфоксида, диметилацетамида, 1.2-пропандиола) 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 субумеренно-низкой 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 АУ-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 АУ-701.

Предложена гипотеза о совместном криозащитном действии глицерина и полисахарида. Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому 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 заморозания 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°C; -80°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 диссертации состоялась 29.03.2023 г. (протокол № 2) на заседании ученого совета Института физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

**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 внутренней среды организма», п.3. «Исследование закономерностей функционирования основных систем организма (... , крови, ...), п.6. «Изучение механизмов функционирования клеток ....».

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлен анализ научных исследований, посвящённых изучению механизмов криоповреждения клеток и способам их криозащиты, а также физиологическим свойствам полисахаридов и их возможной роли в повышении устойчивости клеток к охлаждению.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы:

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

- 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°С) 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%);

- классические криопротекторы проникающего действия: глицерин (ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск), диметилсульфоксид

(ДМСО; Sigma, США), диметилацетамид (ДМАЦ, PanReac AppliChem, Испания), 1,2-пропандиол (1.2-ПД, Ланкастер, Англия);  
 - концентраты клеток (лейкоцитные, тромбоцитные) предоставлены 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.). Из цельной донорской крови (доноры-добровольцы  $35.6 \pm 5.2$  лет) методом цитафереза на центрифуге «Sorvell» (США, 5 мин, 2500 об/мин, консервант цитратфосфатдекстроза) выделены лейкоцитные концентраты, с помощью сепараторов клеток крови Haemonetics (США) – тромбоцитные концентраты.

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
Танacetан, 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.

**Криоскопический метод** позволяет определить понижение температуры замерзания (кристаллизации) раствора в сравнении с температурой замерзания чистого растворителя (вода). При помощи прибора осмометр-криоскоп ОСКР-1 (НПП «Буревестник», С. Петербург) проводилось измерение осмолярных концентраций (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  $\pm 0.010$ ) водных растворов 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. Выполнено более 1500 исследований. Выбор концентраций традиционных криопротекторов определялся их практическим применением (Lawson et al., 2011; Elliott et al., 2017). Концентрации полисахаридов были выбраны в соответствии с ранее полученными данными о применении пектиновых полисахаридов в составе криозащитных сред (Svedentsov et al., 2008; Zaitseva et al., 2018). Все растворы готовили с использованием дистиллированной воды. Тестируемый раствор объемом 0.3 мл помещали в пластиковую кювету, погружали в нее измерительный элемент и устанавливали в термостатируемую камеру прибора.

**Методы оценки структурно-функционального состояния лейкоцитов.** Проведено более 1000 исследований по определению параметров сохранности лейкоцитов до и после воздействия отрицательных температур ( $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ ) под защитой криозащитных растворов. Перед замораживанием клетки смешивали (1:1) с глицерином (7.0%) или с глицерином (7.0%) и полисахаридом (0.1–1.2%). Экспозиция биообъекта с криоконсервантом проводилась при комнатной температуре в течение 15 мин, затем криопробирки CryoPure Tube («Sarstedt AG&Co.», Германия) помещали в спиртовую ванну (96% этиловый спирт), охлажденную до  $-20^{\circ}\text{C}$  в электроморозильнике «Derby» (Дания) на 15 мин. После этого часть криопробирок переносили для хранения в воздушную среду камеры данного электроморозильника, 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°C составила 2.6°C/мин, далее до -80°C по 3.5°C/мин. Через разные сроки хранения образцы отогревали в 20-литровой водяной ванне (+38°C) при интенсивном покачивании криопробирки в течение 20 с. Параметры жизнеспособности клеток оценивали до замораживания и после отогрева.

Степень криоустойчивости различных популяций лейкоцитов определяли с помощью метода световой микроскопии (окраска мазков по Май-Грюнвальду и Романовскому).

С помощью световой микроскопии (Nikon H550S) оценивали общее количество лейкоцитов в камере Горяева.

Целостность клеточной мембраны лейкоцитов оценивали с помощью 1%-ного раствора суправитального красителя эозина (молекулярный вес 692 г/моль) методом световой микроскопии. Признаком повреждения клеточной мембраны считали диффузное окрашивание цитоплазмы в розовый цвет, жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной имеют светло-зеленый цвет.

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по модифицированному методу С.Г. Потаповой и соавт. (1977) с использованием инертных частиц латекса диаметром 0.08 мкм клеток. Количество захваченных частиц (фагоцитарный индекс) во всех случаях до замораживания соответствовал II степени (11–30 частиц), а после отогрева – I степени (до 10 частиц).

**Методы оценки структурно-функционального состояния тромбоцитов.** Проведено более 350 исследований по изучению параметров сохранности тромбоцитов до и после воздействия отрицательных температур (-80°C) под защитой криозащитных растворов: ДМАЦ (10%) или глицерин (7%), а также ДМАЦ (10%) и AU-701 (0.2%), ДМАЦ (10%) и танацетан (0.2%), глицерин (7%) и AU-701 (0.2%), глицерин (7%) и танацетан (0.2%). Перед замораживанием клетки смешивали 1:1 с указанными растворами и выдерживали при комнатной температуре 15 мин. Замораживание до -80°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). Через 30 и

180 суток производили размораживание образцов при +38°C в водяной ванне при постоянном перемешивании содержимого в течение 20 с. До охлаждения и после отогрева оценивали параметры тромбоцитов.

Подсчет количества тромбоцитов проводили микроскопированием в камере Горяева в двух параллельных пробах с определением концентрации кровяных пластинок ( $\times 10^9/\text{л}$ ) и выражали в процентах по отношению к исходному уровню (Перфильева и соавт., 2003).

Агрегационную способность тромбоцитов оценивали после их выделения и через 15 мин экспозиции с исследуемыми растворами, а также сразу после отогрева. 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). Регистрировали максимальную величину светопропускания (показатель степени агрегации) и средний радиус агрегатов. Сохранность определяли в процентах по отношению к исходному уровню. Агрегатограммы регистрировали в течение 10 мин после добавления индукторов агрегации. Величину агрегации исследовали в пробах при стандартном количестве тромбоцитов 250000 – 350000/мкл.

**Статистическая обработка.** 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 критерии Манна–Уитни и Уилкоксона (при ненормальном распределении). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Оценка изменения температуры замерзания воды в растворах криопротекторов и биологической жидкости в присутствии полисахаридов.

С помощью криоскопического метода установлено, что водные растворы полисахаридов имеют низкую осмолярность и не влияют на температуру замерзания воды в растворе. Осмолярность 1% растворов полисахаридов составляла от 15 до 47 мОсм/л, при этом кристаллизация льда в этих растворах начиналась от  $-0.028^{\circ}\text{C}$  до  $-0.078^{\circ}\text{C}$ , соответственно. При добавлении полисахаридов 0.2% к криопротекторам статистически значимое изменение показателей криоосмотических свойств выявлено в опытах с глицерином (7.0%), но не с ДМСО, ДМАЦ, 1.2-ПД (Табл.2).

Эффект снижения температуры ( $p < 0.05$ ) замерзания раствора глицерина (3.5% – концентрация после смешивания 1:1 с биологическим объектом) установлен для AU 701 (0.7–1.0%), танацетана (0.9% и 1%), полисахаридов *H. erinaceus* (0.9% и 1.0%), пектина алоэ (1.0%). Зостеран в разных концентрациях не изменял ( $p < 0.05$ ) температуру замерзания смеси.

Вероятно, молекула полисахарида благодаря функциональным группам (гидроксильным и карбоксильным) способна образовывать связи с гидроксильными группами глицерина, что способствует образованию сети для «захвата» большего количества молекул воды. Это увеличивает осмолярность смеси глицерина с полисахаридом и смещает показатель температуры начала кристаллизации воды в область более отрицательных значений. Отсутствие гидроксильных групп у ДМСО и ДМАЦ, а также меньшее их количество у 1.2-ПД (чем у глицерина) не позволяет проявиться данному эффекту.

Установлено, что в биологической среде (венозная кровь) полисахариды с глицерином смещают температуру замерзания в область более положительных температур (Рис.). С увеличением концентрации полисахарида данный эффект усиливается. Способность полисахаридов быть матрицей для образования кристаллов льда практически не исследована (Gulevsky and Relina, 2011). Вероятно, комплекс глицерин-полисахарид в условиях

биологической среды способствует зародышеобразованию кристаллов льда, т.е. действует как катализатор кристаллизации воды, с образованием упорядоченной менее травматичной структуры льда.

Таблица 2 - Влияние полисахаридов на осмолярность и температуру замерзания криопротекторов (n=20,  $M \pm \sigma$ )

Раствор	Концентрация (%)	Осмолярность, мОсм/л	Температура замерзания, °C
ДМСО	10.0	1725 ± 230	-3.230 ± 0.02
+ AU 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
ДМАЦ	10.0	1098 ± 112	-2.050 ± 0.02
+ AU 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
+ AU 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
+ AU 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	-1.380 ± 0.01
+ полисахариды <i>H. erinaceus</i>	0.5	998 ± 53 *	-1.860 ± 0.01 *

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

Таким образом, полисахариды (0.1–1.0%) не оказывают влияния на температуру замерзания дистиллированной воды, смещают значение данного показателя в растворе глицерина, но не ДМСО, ДМАЦ, 1,2-ПД в область более отрицательных температур

или в область более положительных температур в клеточной среде с глицерином.

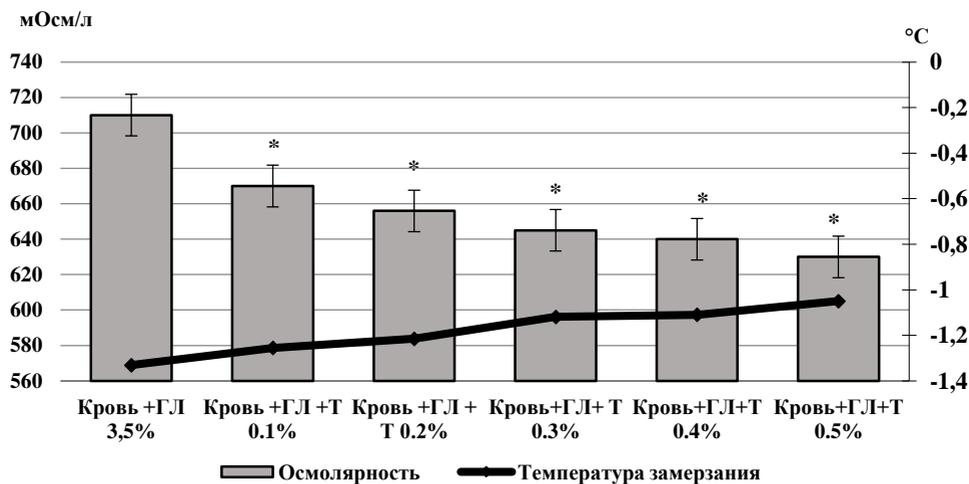


Рисунок – Динамика изменения осмолярности и температуры заморозания венозной крови человека в присутствии глицерина (ГЛ) и глицерина с танацетаном (Т) в разных концентрациях.

Примечание: \* - различие с величиной показателя «Кровь+ГЛ» значимо ( $p < 0.05$ ),  $n=10$ .

**Оценка параметров сохранности структурно-функционального состояния лейкоцитов крови, перенесших воздействие отрицательных температур  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  в присутствии полисахаридов.** Установлено, что все показатели жизнеспособности лейкоцитов при воздействии отрицательных температур  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток в среде глицерина с добавлением одного из полисахаридов были выше ( $p < 0.05$ ) при использовании AU-701, пектина алоэ, танацетана, полисахаридов *H. erinaceus*, (исключение зостеран), чем в среде одного глицерина (Табл. 3).

Полученные данные подтверждают предположение о том, что образующиеся комплексы глицерин-полисахарид-вода снижают вероятность повреждений мембран клеток (механических и осмотических), которые возникают в результате роста кристаллов льда.

Таблица 3 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательных температур (-20°C; -80°C) в течение 1 суток в среде глицерина и полисахарида (n=10, M ± σ)

Серия	°C	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%			
		количество лейкоцитов	количество эозино-резистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
Глицерин (3.5 %)	-20	72 ± 9.3	67 ± 2.5	63 ± 10.4	58 ± 3.8
	-80	84 ± 12.7	73 ± 7.1	68 ± 9.8	45 ± 4.3
+ АУ-701 0.1%	-20	89 ± 9.1*	93 ± 4.3*	84 ± 4.4*	89 ± 4.2*
	-80	78 ± 17.6	80 ± 5.4*	81 ± 8.7*	79 ± 3.4*
+ пектин Алоэ 0.1%	-20	91 ± 6.4*	87 ± 2.5*	75 ± 6.7*	61 ± 3.5*
	-80	97 ± 2.7*	87 ± 1.6*	89 ± 5.7*	78 ± 7.5*
+ Танацетан 0.1%	-20	87 ± 10.1*	87 ± 6.5*	60 ± 5.9*	67 ± 8.5*
	-80	84 ± 12.3*	83 ± 3.4*	47 ± 10.1*	69 ± 10.6*
+ Зостеран 0.1%	-20	61 ± 2.3*	31 ± 4.5*	Н	Н
	-80	61 ± 2.3*	33 ± 8.4*	Н	Н
+ Полисахариды <i>H. erinaceus</i> 0.25%	-20	74 ± 9.8	84 ± 3.4*	85 ± 8.3*	74 ± 4.4*
	-80	82 ± 10.6	87 ± 3.7*	80 ± 8.7*	63 ± 4.4*

Примечание: Н - дифференцировка клеток невозможна в связи с разрушением ядра; \* - различие со значением показателя «Глицерин» соответствующей температуры значимо при  $p < 0.05$ .

На примере АУ-701 показано, что при повышении его концентрации в замораживаемой клеточной среде с 0.1% до 0.6% степень выраженности криозащитного действия полисахарида в отношении мембран лейкоцитов не меняется, следовательно, практическое применение малых концентраций АУ-701 является целесообразным (Табл. 4).

Таблица 4 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток в среде глицерина и пектина AU-701 в различных концентрациях ( $M \pm \sigma$ )

Серия	n	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%		
		количество эозино-резистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
Глицерин (3.5%)	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%)		$85 \pm 3.2^{* \#}$	$88 \pm 6.1^{* \#}$	$79 \pm 3.7^{* \#}$

Примечание: \* - различие со значением показателя «Глицерин» значимо при  $p < 0.05$ ; # - различие со значением показателя «+AU-701 (0.05%)» значимо при  $p < 0.05$ .

Установлено, что показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-20^{\circ}\text{C}$  сохраняются на уровне выше 50% от исходного значения в течение 7 суток при наличии в клеточной среде с глицерином полисахарида (AU-701 / танацетана / пектина алоэ / *H. erinaceus*) (Табл. 5).

Также показано, что показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию отрицательной температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  сохраняются на уровне выше 50% от исходного уровня в течение 7 суток при наличии в клеточной среде с глицерином полисахарида (AU-701 / танацетана / *H. erinaceus*), однако максимально возможный срок нахождения лейкоцитов в состоянии обратимого холодового

анабиоза составляет 21 сутки при наличии в клеточной среде с глицерином полисахарида АУ-701 (Табл. 6).

Таблица 5 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию температуры  $-20^{\circ}\text{C}$  в среде глицерина и полисахарида через 5 и 7 суток ( $n=10$ ,  $M \pm \sigma$ )

Серия	Сут.	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%		
		количество эозино-резистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
Глицерин (3.5 %)	5	$41 \pm 5.7$	$10 \pm 6.1$	Н
	7	единичные	Н	Н
+ АУ-701 0.1%	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 0.1%	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 0.1%	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> 0.25%	5	$72 \pm 5.8^*$	$75 \pm 6.4^*$	$64 \pm 5.1$
	7	$70 \pm 3.9$	$71 \pm 7.9$	$53 \pm 4.6$

\* См примечание к Табл. 3.

Известно, что при  $-20^{\circ}\text{C}$  метаболизм в клетках имеет малое замедление, что обусловлено вовлечением в процесс образования и роста кристаллов льда только фракции свободной внеклеточной и внутриклеточной воды (Сведенцов, 2004). При  $-80^{\circ}\text{C}$  в данный процесс включается и фракция фиксированной воды, что способствует выраженному замедлению клеточного метаболизма. Вероятно, полисахарид АУ-701 обладает определенными структурными особенностями, которые в диапазоне температур 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.

Таблица 6 - Показатели устойчивости лейкоцитов к воздействию температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в среде глицерина и полисахарида через разные сроки ( $M \pm \sigma$ )

Серия	n	Сут.	Показатели в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%		
			количество эозино-резистентных клеток	количество гранулоцитов	количество фагоцитарно активных нейтрофилов
Глицерин (3.5 %)	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 0.1%	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 0.1%	10	7	$68 \pm 3.0$	$48 \pm 9.5^*$	Н
	10	14	$60 \pm 4.2^*$	$45 \pm 5.0^*$	Н
+ Танацетан 0.1%	10	7	$75 \pm 4.4^*$	$45 \pm 8.1^*$	$59 \pm 7.6^*$
	10	14	$60 \pm 7.2^*$	$45 \pm 4.5^*$	$43 \pm 6.2$
+ полисахариды <i>H. erinaceus</i> 0.25%	15	7	$83 \pm 3.9^*$	$80 \pm 3.6^*$	$45 \pm 5.9$
	10	14	$81 \pm 3.3^*$	$68 \pm 11.5^*$	$37 \pm 2.9$

\*См примечание к Табл. 3.

Таким образом, комбинирование криопротектора глицерина с полисахаридом в среде лейкоцитов при их замораживании до  $-20^{\circ}\text{C}$  или  $-80^{\circ}\text{C}$  является эффективным.

**Оценка параметров сохранности структурно-функционального состояния тромбоцитов, перенесших воздействие отрицательной температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в присутствии полисахаридов.** Установлено, что способность тромбоцитов к восстановлению функциональной активности после отогрева при воздействии температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 30 суток хранения

повышается ( $p < 0.05$ ) при добавлении к глицерину танацетана или AU-701 (Табл. 7). При использовании вместо глицерина криопротектора ДМАЦ (5%) эффект отсутствует. Выявленная особенность может быть альтернативой применения в практике традиционному криопротектору ДМАЦ.

Таблица 7 - Показатели устойчивости тромбоцитов ( $n=10$ ,  $M \pm \sigma$ ) к воздействию температуры  $-80^\circ\text{C}$  в течение 30 суток под защитой глицерина (3.5%) и полисахарида (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	$79 \pm 10.8$	$44 \pm 4.7$	$44 \pm 5.9$	$49 \pm 4.2$	$49 \pm 3.0$
+ AU-701	$81 \pm 5.6$	$50 \pm 3.3^*$	$53 \pm 6.3^*$	$53 \pm 4.6^*$	$54 \pm 6.1$
+ Танацетан	$79 \pm 2.8$	$51 \pm 4.3^*$	$51 \pm 4.7^*$	$54 \pm 6.2^*$	$55 \pm 4.2$

\* См примечание к Табл. 3.

Таким образом, 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.

На основании анализа полученных данных предложена гипотеза о совместном криозащитном действии глицерина и полисахарида. Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодovому стрессу может быть обусловлена способностью полисахарида к комплексообразованию с функциональными группами воды, глицерина и, возможно, мембран клеток, что при охлаждении биологической среды обеспечивает стабилизацию фракций воды (свободной, связанной, фиксированной) и способствует формированию мелких аморфных кристаллов льда. Это предупреждает критические изменения в мембранах клеток и обеспечивает активацию репаративных процессов на этапе отогрева.

## 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 холодового 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в ведущих индексируемых рецензируемых журналах иностранных баз данных:

1. Полежаева Т.В. Траметоидные трутовики Русской равнины как источник полисахаридов с криопротекторными свойствами / Полежаева Т.В., Худяков А.Н., **Сергушкина М.И.**, Широких И.Г., Широких А.А., Безмельцева О.М., Соломина О.Н., Зайцева О.О. // Теоретическая и прикладная экология. – 2017. – № 3. – С. 103-109. **Scopus. WOS.**
2. **Sergushkina M.I.** The ability of pectins modulate the action of glycerol in the freezing of nucleated cells / Sergushkina M.I., Khudyakov A.N., Polezhaeva T.V., Bezmeltseva O.M. // CryoLetters. – 2017. – V. 38. – № 6. – P. 477-481. **Scopus.**
3. Khudyakov A.N. Effect of pectin on water crystallization pattern and integrity of cells during freezing / Khudyakov A.N., Kuleshova L.G., Zaitseva O.O., **Sergushkina M.I.**, Vetoskin K.V., Polezhaeva T.V. // Biopreservation and Biobanking. – 2019. – V.17. - № 1. - P. 52-57. **Scopus. WOS.**
4. Zaitseva O.O. Application of pectin from *Aloe arborescens* Mill. to the cryopreservation of human leukocyte cell suspensions / Zaitseva O.O., Golovchenko V.V., **Sergushkina M.I.**, Khudyakov A.N., Polezhaeva T.V. // CryoLetters. – 2019. – V. 40. – №2. – P.71-76. **Scopus.**
5. Shirokikh I.G. Cryoprotective properties of the polysaccharide fraction of the mushroom *Hericium erinaceus* BP 16 / Shirokikh I.G., Polezhaeva T.V., Shirokikh A.A., Khudyakov A.N., **Sergushkina M. I.**, Nazarova Ya.I., Paturova I. G. // Biology Bulletin. – 2020. – V. 47. – № 1. – P. 1-6. **Scopus. WOS.**
6. Zaitseva O. Pectins as a universal medicine / Zaitseva O., Khudyakov A., **Sergushkina M.**, Solomina O., Polezhaeva T. // Fitoterapia. – 2020. – V. 146. – P. 104676. **Scopus. WOS.**
7. Полежаева Т.В. Влияние полисахаридов *Hericium erinaceus* БП 16 на фагоцитарную активность нейтрофилов крови человека / Полежаева Т.В., Широких И.Г., **Сергушкина М.И.**, Назарова Я.И., Широких А.А., Худякова А.Н., Зайцева О.О., Соломина О.Н., Патурова И.Г. // Теоретическая и прикладная экология. – 2020. – № 2. – P. 166-171. **Scopus. WOS.**
8. **Sergushkina M. I.** The use of pectins as part of a cryoprotective solution for long-term storage of human platelet concentrates / Sergushkina M.I., Khudyakov A.N., Zaitseva O.O., Polezhaeva T.V., Solomina O.N.,

Vetoshkin K. A., Butolina M.A. // CryoLetters. – 2022. – V. 43. – № 6. – P. 316-321. **Scopus**.

9. **Sergushkina M. I.** Apple Pectin as a New Component for Cryopreservation of Nucleated Cells / Sergushkina M.I., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Polezhaeva T.V., Solomina O.N. // Biopreservation and Biobanking. - 2022. – V. 20. - № 1. - P. 84-89. **Scopus. WOS**.

### **Другие публикации в научных изданиях:**

1. **Сергушкина М.И.** Использование коммерческого яблочного пектина для сохранения ядродержащих клеток крови человека при отрицательных температурах / Сергушкина М.И., Безмельцева О.М., Худяков А.Н., Полежаева Т.В. // Материалы XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем», Киров, 4 - 6 декабря 2017 г. – Киров: Изд-во ВятГУ, 2017. – С. 294-297.

2. **Сергушкина М.И.** Роль пектинов в сохранности клеток при замораживании / Сергушкина М.И., Полежаева Т.В., Худяков А.Н., Безмельцева О.М. // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им И.П. Павлова, Воронеж, 18-22 сентября 2017 г. – Воронеж: Изд-во «Истоки», 2017. – С. 2152-2153.

3. **Сергушкина М.И.** Влияние яблочного пектина на температуру кристаллизации воды в растворах криопротекторов разной проникающей способности / Сергушкина М.И., Худяков А.Н., Полежаева Т.В., Безмельцева О.М. // Материалы III Всероссийской (XVIII) молодежной научной конференции «Молодежь и наук на Севере» (в 2-х томах). Том 1. Сыктывкар, 12-14 марта 2018 г. – Сыктывкар: ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, 2018. – С. 122-123.

4. **Сергушкина М.И.** Применение пектинов при криоконсервировании клеточных суспензий / Сергушкина М.И., Полежаева Т.В., Зайцева О.О., Худяков А.Н., Соломина О.Н., Безмельцева О.М. // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальная гликобиология», Киров, 24 - 29 сентября 2018 г. – Киров: Изд-во ВятГУ, 2018. – С. 87

5. Худяков А.Н. Влияние пектинов на характер кристаллизации в водных растворах криопротекторов и клеточных суспензий / Худяков А.Н., Полежаева Т.В., **Сергушкина М.И.**, Зайцева О.О., Соломина О.Н. // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальная гликобиология», Киров, 24 - 29 сентября 2018 г. – Киров: Изд-во ВятГУ, 2018. – С. 157.

6. Полежаева Т. В. Роль пектина пижмы обыкновенной в сохранности ядерных клеток крови при замораживании / Полежаева Т.В.,

Худяков А.Н., Патурова И.Г., Утемов С.В., Головченко В.В., **Сергушкина М.И.**, Безмельцева О.М. // Вятский медицинский вестник. – 2018. – № 1. – С. 28 - 33.

**7. Сергушкина М.И.** Пектин как инновационный компонент криозащитной среды / Сергушкина М.И., Полежаева Т.В., Худяков А.Н., Зайцева О.О. / II Объединенный научный форум (VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды»). Научные труды. Том 1. Сочи, Дагомыс, 1-6 октября 2019. – М.: Изд-во «Перо», 2019. – С. 85.

### Список сокращений

ДМСО – диметилсульфоксид  
ДМАЦ – диметилацетамид  
КТ – концентрат тромбоцитов  
ЛК – концентрат лейкоцитов  
ПД – 1.2-пропандиол  
СЭ – степень этерификации

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.