

DOI: 10.33741/3083-6883.43.07

УДК: 678.744.7:577.454:547.426.1 - 311:612.111:57.086.13

РОЛЬ ІНГІБІТОРІВ РЕКРИСТАЛІЗАЦІЇ ЛЬОДУ В ПІДВИЩЕННІ ЕФЕКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ У РОЗЧИНАХ НА ОСНОВІ ОКСИЕТИЛЬОВАНОГО ГЛІЦЕРИНУ

Пахомова Ю. С., Чеканова В. В., Дьяконенко Г. Ю.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

Анотація

Вступ. У статті розглядається можливість підвищення ефективності кріоконсервування еритроцитів людини шляхом застосування речовин, здатних впливати на процес рекристалізації льоду (полівінілового спирту з молекулярною масою 9 кДа (ПВС 9 кДа), сахарози та глюкози) у складі кріопротекторних розчинів.

Мета. Оцінити вплив комбінації оксигетильованого гліцерину зі ступенем полімерізації $n = 25$ та інгібіторів рекристалізації льоду (ПВС 9 кДа, сахарозою, глюкозою) на ефективність кріоконсервування еритроцитів.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на еритроцитах людини, заморожених у рідкому азоті (-196°C) у таких кріопротекторних розчинах: 30 % ОЕГ $_{n=25}$; 20 % ОЕГ $_{n=25}$; 20 % ОЕГ $_{n=25}$ + 0,1 М глюкоза; 20 % ОЕГ $_{n=25}$ + 0,1 М сахароза; 20 % ОЕГ $_{n=25}$ + 10 мг / мл ПВС 9 кДа. Оцінювали показники гемолізу, гематокриту та осмотичної стійкості клітин. Статистичну обробку результатів проводили з використанням U-критерію Манна-Уїтні.

Результати. Найнижчий рівень гемолізу кріоконсервованих еритроцитів виявлено у розчині, що містить 20 % ОЕГ $_{n=25}$ + 10 мг / мл ПВС 9 кДа. Додавання сахарози також сприяло підвищенню рівня збереження клітин, тоді як використання глюкози призводило до статистично значущого збільшення частки гемолізованих еритроцитів. Найвищі показники осмотичної стійкості еритроцитів (0,6 % NaCl – 17,2 (16,1 – 18,3) %, 0,9 % NaCl – 15,6 (13,8 – 17,4) %) отримані у розчинах, де ОЕГ $_{n=25}$ комбінувався з 10 мг/мл ПВС 9 кДа або 0,1 М сахарозою. Значення гематокриту статистично значуще не відрізнялися між всіма досліджуваними розчинами.

Висновки. Використання полівінілового спирту дозволяє знизити концентрацію ОЕГ $_{n=25}$ з 30 % до 20 % без значного погіршення якості кріоконсервованих еритроцитів за оціненими показниками. Сахароза також продемонструвала перспективні результати щодо підвищення рівня збереження еритроцитів під час кріоконсервування, на відміну від глюкози. Таким чином, застосування речовин здатних впливати на процес рекристалізації (ПВС 9 кДа, сахароза) у складі розчинів на основі ОЕГ $_{n=25}$, є перспективним напрямом для розробки ефективних протоколів зберігання еритроцитів людини.

Ключові слова: еритроцити людини, кріоконсервування, інгібітори рекристалізації, кріопротектори.

THE ROLE OF ICE RECRYSTALLIZATION INHIBITORS IN ENHANCING THE EFFICIENCY OF CRYOPRESERVATION OF ERYTHROCYTES IN OXYETHYLATED GLYCEROL-BASED SOLUTIONS

Pakhomova Yu. S., Chekanova V. V., Diakonenko H. Y.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv,
Ukraine*

Abstract

Introduktion. The article explores the possibility of improving the efficiency of human red blood cell cryopreservation by using substances that can influence the ice recrystallization process (polyvinyl alcohol with a molecular weight of 9 kDa (PVA 9 kDa), sucrose, and glucose) in cryoprotective solutions.

Aim of the study. To evaluate the effect of combining oxyethylated glycerol with a polymerization degree of $n = 25$ and ice recrystallization inhibitors (PVA 9 kDa, sucrose, glucose) on the effectiveness of red blood cell cryopreservation.

Materials and methods. The study was conducted on human red blood cells frozen in liquid nitrogen (-196°C) in the following cryoprotective solutions: 30 % $\text{OEG}_{n=25}$; 20 % $\text{OEG}_{n=25}$; 20 % $\text{OEG}_{n=25} + 0,1 \text{ M}$ glucose; 20 % $\text{OEG}_{n=25} + 0,1 \text{ M}$ sucrose; 20 % $\text{OEG}_{n=25} + 10 \text{ mg / ml}$ PVA 9 kDa. Hemolysis, hematocrit, and osmotic resistance of the cells were assessed. Statistical analysis of the results was performed using the Mann-Whitney U-test.

Results. The lowest level of hemolysis in cryopreserved red blood cells was found in the solution containing 20 % $\text{OEG}_{n=25} + 10 \text{ mg / ml}$ PVA 9 kDa. The addition of sucrose also contributed to a higher level of cell preservation, whereas the use of glucose led to a statistically significant increase in the proportion of hemolyzed erythrocytes. The highest indicators of osmotic resistance of erythrocytes (in 0,6 % NaCl – 17,2 (16,1 – 18,3)%, in 0,9 % NaCl – 15,6 (13,8 – 17,4)%) were obtained in solutions where $\text{OEG}_{n=25}$ was combined with 10 mg / ml PVA 9 kDa or 0,1 M sucrose. Hematocrit values did not show statistically significant differences between all the studied solutions.

Conclusions. The use of polyvinyl alcohol allows for a reduction in the $\text{OEG}_{n=25}$ concentration from 30 % to 20 % without significantly compromising the quality of the cryopreserved red blood cells, based on the assessed parameters. Sucrose also demonstrated promising results in improving the preservation level of erythrocytes during cryopreservation, unlike glucose. Thus, the application of substances capable of influencing the recrystallization process (PVA 9 kDa, sucrose) in $\text{OEG}_{n=25}$ -based solutions is a promising direction for developing effective human red blood cell storage protocols.

Keywords: human red blood cells, cryopreservation, recrystallization inhibition, cryoprotectants.

Вступ

Еритроцитна маса залишається одним з найбільш затребуваних компонентів донорської крові для трансфузійної терапії. Стандартним методом подовження терміну її придатності є консервування за температури 4°C , що задовольняє більшість клінічних потреб. Однак цей підхід має суттєві обмеження в контексті забезпечення еритроцитами пацієнтів із рідкісними

групами крові [1], а також в умовах ускладненої логістики, зокрема, в зонах бойових дій чи віддалених регіонах, де неможливо забезпечити стабільний холодовий ланцюг [2, 3, 4].

Альтернативою може бути низькотемпературне консервування еритроцитів з використанням проникаючого кріопротектора – гліцерину [5]. Але класичні протоколи потребують його використання у високих концентраціях (до 57 мас. %) та зберігання при низьких температурах (-80°C або -196°C) [6, 7], доступність яких обмежена. Крім того, необхідність багатоетапного відмивання клітин після відтаювання значно ускладнює процедуру [8, 9], підвищує ризик контамінації та обмежує застосування еритроцитів у польових умовах. Перспективним напрямом для подолання цих недоліків є використання непроникних кріопротекторів [10, 11], які завдяки своїй структурі не проникають у клітини й, відповідно, не потребують видалення після відтаювання.

В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) було синтезовано оксиетильований гліцерин зі ступнем полімеризації $n = 25$ ($\text{ОЕГ}_{n=25}$). Дослідження показали здатність цього кріопротектора ефективно захищати клітини при високій концентрації – 30 % [12, 13]. Але його практичне застосування у такій концентрації може бути проблематичним через високу в'язкість розчину та потенційну токсичність. Таким чином, подальші дослідження $\text{ОЕГ}_{n=25}$ мають бути зосереджені на зниженні його робочої концентрації для забезпечення високої біосумісності та практичності використання.

Проте зниження концентрації кріопротектора може призводити до механічних ушкоджень біологічних об'єктів, обумовлених кристалізацією [14]. Крім того, непроникні кріопротектори, згідно з даними [15, 16], нездатні ефективно пригнічувати рекристалізацію льоду. Ймовірно, що внаслідок цього клітини стають більш вразливими до пошкоджень під час відтаювання, зберігання та транспортування за умов коливань температури.

Вирішення цієї проблеми полягає в активному пригніченні рекристалізації льоду шляхом застосування спеціалізованих речовин – інгібіторів рекристалізації льоду [17, 18]. До таких речовин належать деякі синтетичні і природні полімери [19, 20, 21], вуглеводи [22, 23], фенольні глікозиди [24], амінокислоти [25]. Їхній механізм дії ґрунтується на специфічній адсорбції на поверхні кристалів льоду, що блокує перенос молекул води та подальше зростання кристалів, тим самим стабілізуючи структуру льоду навіть за умов температурних коливань [19, 26].

Тому, системне дослідження інгібіторів рекристалізації льоду у складі кріопротекторних розчинів є актуальним науковим завданням. Перспективними речовинами для цього дослідження є полівініловий спирт молекулярної маси 9 кДа (ПВС 9 кДа), глюкоза та сахароза, які навіть за низьких концентрацій демонструють здатність інгібувати рекристалізацію у порядку спадної ефективності: ПВС 9 кДа > сахароза > глюкоза [19, 22, 23].

Мета дослідження. Оцінити вплив комбінації оксиетильованого гліцерину зі ступенем полімерізації $n = 25$ та інгібіторів рекристалізації льоду (ПВС 9 кДа, сахарозою, глюкозою) на ефективність кріоконсервування еритроцитів.

Матеріали і методи. Донорську кров групи А (II) отримували на консерванті “ЦФДА” у Харківському обласному центрі служби крові, зберігали не довше 48 годин при температурі 4 ± 2 °С. Еритроцитарну масу (гематокрит 70 – 75 %) отримували центрифугуванням цільної донорської крові протягом 20 хв при 2500 об / хв за температури 4 ± 2 °С. Плазму та лейкоцитарний прошарок видаляли методом аспірації.

В якості кріопротекторних речовин використали ОЕГ_{n=25} (Фарба, Україна), ПВС 9 кДа зі ступенем гідролізу 80 %, глюкозу, сахарозу (Sigma-Aldrich, США). Кріопротекторні розчини готували на основі фосфатно-сольового буфера (0,9 ммоль / л Na_2HPO_4 , 0,13 ммоль / л NaH_2PO_4 , 150 ммоль / л NaCl ; рН 7,4; осмолярність – 300 мОсм / кг). Перед

використанням їх витримували за температури 20 ± 2 °C протягом 24 годин для стабілізації.

Склад кріопротекторних розчинів: 30 % ОЕГ_{n=25} (позитивний контроль), 20 % ОЕГ_{n=25} (негативний контроль), 20 % ОЕГ_{n=25} + 0,1 М глюкоза, 20 % ОЕГ_{n=25} + 0,1 М сахароза, 20 % ОЕГ_{n=25} + 10 мг / мл ПВС 9 кДа.

До суспензії еритроцитів крапельно додавали кріопротекторні розчини у співвідношенні 1 : 1 (об'єм / об'єм) протягом 5 хв, щоб уникнути осмотичного стресу. Інкубацію здійснювали протягом 15 хв за температури 20 ± 2 °C. Аліквоти еритроцитів об'ємом 2 мл заморожували у кріоампулах "Nunc" шляхом занурення у рідкий азот (– 196 °C), зберігали протягом тижня. Для розморожування кріоампули із еритроцитами поміщали у водяну баню при температурі 42 °C.

Оцінку рівня збереженості клітин проводили за показником гемолізу, який розраховували за формулою:

$$\Gamma = \frac{Hb_{sup}}{Hb} \times (1 - Ht) \times 100\%, \text{ де}$$

Hb_{sup} – концентрація вільного гемоглобіну, г / л

Hb – концентрація загального гемоглобіну, г / л

Ht – гематокрит, л / л

Концентрації вільного та загального гемоглобіну визначали за ціанметгемоглобіновим методом із використанням комерційного набору (Філіст-Діагностика, Україна). Гематокрит вимірювали на центрифугі СМ – 70 (Elmi, Литва) після центрифугування при 6500 g протягом 5 хв. Осмотичну стійкість еритроцитів визначали після їх переносу в гіпотонічний (0,6 %) та ізотонічний (0,9 %) розчини NaCl.

Статистичний аналіз даних. Дані були оброблені за допомогою пакету Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) для Windows (Microsoft, Armonk, NY, USA), а результати представлені у вигляді медіани з міжквартильним розмахом (25-й та 75-й процентилі). Для множинних порівнянь використовували U-

критерій Манна-Уїтні. Для корекції рівня значущості при множинних порівняннях застосовували метод Холма-Бонферроні. Статистично значущими вважали значення $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Дослідження показало, що додавання інгібіторів рекристалізації льоду до кріопротекторного розчину на основі 20 % ОЕГ_{n=25} по-різному впливає на рівень збереження еритроцитів після кріоконсервування (табл. 1).

Мінімальний рівень гемолізу після відтавання клітин спостерігався у розчині, що містив 20 % ОЕГ_{n=25} з додаванням 10 мг / мл ПВС 9 кДа. Цей показник був достовірно нижчим ($p < 0,05$) порівняно з контрольними розчинами. Додавання 0,1 М сахарози також призводило до низького рівня гемолізу, що свідчить про її кріопротекторну дію, однак цей ефект статистично не відрізнявся від ефекту позитивного контролю. На противагу цьому, включення 0,1 М глюкози до кріопротекторного розчину на основі 20 % ОЕГ_{n=25} викликало достовірне підвищення гемолізу порівняно з контрольними групами.

За показником гематокриту достовірних відмінностей між досліджуваними та контрольними кріопротекторними розчинами не виявлено (табл. 1).

Таблиця 1. Показники збереженості кріоконсервованих еритроцитів (Me, [25-й, 75-й процентилі], n = 5.)

Кріозахисний розчин	Гемоліз, %	Гематокрит, %
30 % ОЕГ _{n=25} (позитивний контроль)	3,7 (2,6–4,8)	26,0 (24,0–28,0)
20 % ОЕГ _{n=25} (негативний контроль)	4,2 (2,2–6,2)	26,1 (24,5–27,7)
20 % ОЕГ _{n=25} + 0,1 М глюкоза	7,8 (7,0–8,6) *^	27,2 (26,5–27,9)
20 % ОЕГ _{n=25} + 0,1 М сахароза	3,5 (2,8–4,2)	27,1 (26,2–28,0)
20 % ОЕГ _{n=25} + 10 мг / мл ПВС 9 кДа	2,5 (1,5–3,5) *^	25,0 (24,0–26,0)

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з 20 % розчином ОЕГ_{n=25}; ^ – $p < 0,05$ порівняно з 30 % розчином ОЕГ_{n=25}.

Найкращі показники осмотичної стійкості еритроцитів (табл. 2), порівняно з розчинами 20 і 30 % ОЕГ_{n=25} були отримані при використанні 20 % ОЕГ_{n=25} із додаванням 0,1 М сахарози або 10 мг / мл ПВС 9 кДа. Низьку осмотичну стійкість еритроцитів зафіксовано для розчину, що містив лише 20 % ОЕГ_{n=25}. Додавання 0,1 М глюкози до цього розчину призвело до ще більшого зниження осмотичної стійкості кріоконсервованих еритроцитів.

Таблиця 2. Осмотична стійкість еритроцитів (Me, [25-й, 75-й процентилі], n = 5.)

Кріозахисний розчин	Осмотична стійкість, %	
	0,6 % NaCl	0,9 % NaCl
30 % ОЕГ _{n=25} (позитивний контроль)	18,2 (17,2–19,2)	11,0 (9,7–12,3)
20 % ОЕГ _{n=25} (негативний контроль)	26,3 (22,9–29,7)	22,2 (20,1–24,3)
20 % ОЕГ _{n=25} / 0,1 М глюкоза	30,6 (29,7–31,5) *	25,1 (24,2–26,0) *
20 % ОЕГ _{n=25} / 0,1 М сахароза	16,6 (13,8–19,4) *	14,8 (12,1–17,5) *
20 % ОЕГ _{n=25} / 10 мг/мл ПВС 9 кДа	17,2 (16,1–18,3) *	15,6 (13,8–17,4) *

Примітка: * – p < 0,05 порівняно з 20 % розчином ОЕГ_{n=25}.

Дослідження впливу різних кріопротекторних розчинів на стан еритроцитів після кріоконсервування виявило низку ключових закономірностей. Хоча загалом не було виявлено достовірних відмінностей у показнику гематокриту між досліджуваними кріопротекторними розчинами та контролем, аналіз окремих розчинів виявив важливі особливості. Зокрема, додавання 0,1 М глюкози до 20 % ОЕГ_{n=25} призводило до підвищення гематокриту. Цей результат можна пояснити значним пошкодженням мембрани еритроцитів. Таке пошкодження, ймовірно, порушує нормальну деформаційну здатність клітин і перешкоджає їхній щільній упаковці під час центрифугування, що й призводить до артефактного завищення гематокриту. Ця гіпотеза цілком узгоджується з найгіршими показниками осмотичної стійкості еритроцитів саме в цьому розчині (табл. 2), що безпосередньо вказує на стан клітинних мембран.

Найкращі показники осмотичної стійкості, які перевищували результати негативного контролю (20 % ОЕГ_{n=25}), були отримані при використанні 20 % ОЕГ_{n=25} з додаванням 0,1 М сахарози або 10 мг/мл ПВС 9 кДа (табл. 2). Це може свідчити про те, що дані добавки ефективно запобігають ушкодженню клітинної мембрани кристалами льоду. Зниження осмотичної стійкості у групі з 20 % ОЕГ_{n=25} без добавок може бути наслідком менш ефективного попереднього зневоднення клітин, що призводить до утворення більшого об'єму внутрішньоклітинного льоду та посиленої рекристалізації під час відтаювання. Додавання ж глюкози до 20 % ОЕГ_{n=25} ще більше погіршило ці показники, демонструючи її дестабілізуючий вплив на мембрану еритроцитів за даних експериментальних умов.

Отримані результати підтверджують, що комбінування ОЕГ_{n=25} з речовинами (ПВС 9 кДа, сахароза), здатними впливати на рекристалізацію льоду дозволяє знизити концентрацію ОЕГ_{n=25} з 30 % до 20 %. Це важливо з практичної точки зору, оскільки може мінімізувати потенційний токсичний ефект та спростити процедуру відмивання клітин після відтаювання. Найефективнішою речовиною виявився ПВС 9 кДа, який не лише мінімізував гемоліз, але й підтримував високу осмотичну стійкість клітин. Високу ефективність також продемонструвала сахароза, що, ймовірно, пов'язано з її здатністю стабілізувати ліпідний бішар мембрани [27] та впливати на процес кристалоутворення при відігріванні [22, 23]. На противагу їм, глюкоза виявилася менш ефективною, що може бути обумовлено її нижчою молекулярною масою та, відповідно, меншою здатністю до пригнічення рекристалізації. Це підтверджує гіпотезу про те, що ефективність інгібітора рекристалізації корелює з його молекулярною масою та здатністю до специфічної взаємодії з льодом. Крім того, результати свідчать про те, що невдалий вибір інгібітора рекристалізації може спричинити синергетичний ефект негативних факторів, таких як осмотичний стрес і кріопошкодження, що

в підсумку призводить до зниження рівня збереженості клітин порівняно з кріопротекторними розчинами без будь-яких додаткових речовин.

Важливо зазначити, що отримані результати стосуються ефективності досліджуваних композицій *in vitro*. Питання безпеки їх парентерального застосування без попереднього відмивання потребує окремого всебічного вивчення. Хоча ОЕГ_{n=25}, як непроникний кріопротектор, теоретично мінімізує необхідність у складному відмиванні, його токсикологічний профіль та фармакокінетика при внутрішньовенному введенні потребують подальших доклінічних досліджень. Аналогічно, ПВС 9 кДа, незважаючи на доведену біосумісність для застосування у фармацевтичній промисловості [28], потребує оцінки ризиків потенційного накопичення в організмі при системному введенні.

Висновки

1. Отримані результати дослідження свідчать про те, що серед протестованих речовин, здатних інгібувати процес рекристалізації льоду, найвищу ефективність при кріоконсервуванні еритроцитів продемонстрував ПВС 9 кДа. Його включення у концентрації 10 мг / мл до кріопротекторного розчину на основі 20 % ОЕГ_{n=25} забезпечило не лише мінімальний рівень гемолізу після кріоконсервування, але й сприяло збереженню високої осмотичної стійкості еритроцитів.
2. Позитивний ефект виявлено й для сахарози, яку було ідентифіковано як перспективну кріопротекторну речовину, здатну позитивно впливати на збереження клітин за використання ОЕГ_{n=25} у низькій концентрації. На противагу цьому, глюкоза виявилася неефективною для використання в рамках даного експериментального підходу.
3. Представлені дані дозволяють зробити висновок про те, що ефективне інгібування рекристалізації льоду є важливим фактором для успішного кріоконсервування еритроцитів у присутності непроникних кріопротекторів. Реалізація цього підходу відкриває перспективи для зниження робочих концентрацій непроникаючого кріопротектору.

Джерела фінансування. Робота виконана в ІПКіК НАН України в рамках відомчої тематики «Дослідження кріозахисних властивостей середовищ на основі комбінацій проникаючих кріопротекторів з полівініловим спиртом при кріоконсервуванні еритроцитів людини», № держреєстрації 0121U109456.

Конфлікт інтересів авторів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Література

1. Thornton NM. The World Health Organization International Rare Donor Panel. *Immunohematology*. 2016; 32 (1): 3 – 7. Available from: <https://reference-global.com/issue/IMMUNOHEMATOLOGY/32/1>
2. Noorman F, van Dongen TT, Plat MJ, Badloe JF, Hess JR, Hoencamp R. Transfusion: – 80 °C Frozen Blood Products Are Safe and Effective in Military Casualty Care. *PLoS One*. [Internet]. 2016 Dec 13 [cited] 12.08.2020; 11 (12): e0168401. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0168401>
3. Bohonek M, Seghatchian J. Emergency Supply Policy of Cryopreserved RBC and PLT: The Czech Republic Concept. *Transfus Apher Sci*. 2020; 59 (3): 102788. doi:10.1016/j.transci.2020.102788.
4. Noorman F, Rijnhout TWH, Zoodsma M, Hoencamp R. – 80 °C deep frozen erythrocytes during military operations. The Dutch frozen concept. *Transfus Apher Sci*. 2020; 59 (3): 102789. doi:10.1016/j.transci.2020.102789.
5. Valeri CR, Ragno G. Cryopreservation of human blood products. *Transfus Apher Sci*. 2006; 34 (3): 271 – 287. doi:10.1016/j.transci.2005.11.010.
6. Carson JL, Grossman BJ, Kleinman S, et al. Red blood cell transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med*. 2012; 157 (1): 49 – 58. doi: 10.7326/0003-4819-157-1-201206190-00429.
7. Roback J.D, editor. Technical Manual of the American Association of Blood Banks, 16th ed. American Association of Blood Banks; 2008.
8. Lusianti RE, Benson JD, Acker JP, Higgins AZ. Rapid removal of glycerol from frozen-thawed red blood cells. *Biotechnol Prog*. 2013; 29 (3): 609 – 620. doi: 10.1002/btpr.1710.
9. Howell A, Kurach J, William N, et al. Deglycerolization of manually glycerolized, frozen red cell concentrates using a closed system cell processor. *Transfusion*. 2025; 65 (4): 664 – 668. doi:10.1111/trf.18156.
10. Knorpp CT, Merchant WR, Gikas PW, Spencer HH, Thompson NW. Hydroxyethyl starch: extracellular cryoprotective agent for erythrocytes. *Science*. 1967; 157 (3794): 1312-1313. doi:10.1126/science.157.3794.1312.
11. Sputtek A, Sputtek R. Cryopreservation in transfusion medicine and hematology. *Life in the frozen state*. CRC Press; 2004: 509-530.
12. Lubyany VG, Bredikhina LP, Shrago MI. The cryoprotectant activity of GOE oligomers in low-temperature erythrocyte preservation. *Kriobiologiya i kriomeditsina*. 1981; 8: 34-40.
13. Pakhomova YuS, Kuleshova LG, Kompaniets AM. Transformation of erythrocytes during cryopreservation with oxyethylated glycerol derivatives with n = 25 and n = 30 polymerization degree. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016; 26 (4): 349 – 360. Available from: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/1247>
14. Osetsky AI, Kirilyuk AL, Gurina TM, Vysekantsev IP. Application of Plastic Strain Method to Determine Threshold Concentrations for Cryoprotective Substances During *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cell Cryopreservation. *Problems of Cryobiology*. 2007; 17 (1): 71 – 79. Available from: <https://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/534/566>

15. Deller RC, Vatish M, Mitchell DA, Gibson MI. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. *Nat Commun* [Internet]. 2014; Feb 03 cited [12.05.2018]; 5: 3244. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms4244>.
16. Deller RC, Vatish M, Mitchell DA, Gibson MI. Glycerol-Free Cryopreservation of Red Blood Cells Enabled by Ice-Recrystallization-Inhibiting Polymers. *ACS Biomater Sci Eng*. 2015; 1 (9): 789 – 794. doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00162.
17. Wu X, Yao F, Zhang H, Li J. Antifreeze proteins and their biomimetics for cell cryopreservation: Mechanism, function and application – A review. *Int J Biol Macromol*. 2021; 192 (1): 1276-1291. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.09.211.
18. Chang T, Moses OA, Tian C, Wang H, Song L, Zhao G. Synergistic Ice Inhibition Effect Enhances Rapid Freezing Cryopreservation with Low Concentration of Cryoprotectants. *Adv Sci (Weinh)* [Internet]. 2021; Jan 29 cited [14.09.2023]; 8 (6): 2003387. doi:10.1002/advs.202003387. Available from: <https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/advs.202003387>.
19. Congdon T, Notman R, Gibson MI. Antifreeze (glyco)protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules*. 2013; 14 (5): 1578 – 1586. doi:10.1021/bm400217j.
20. Congdon T, Dean BT, Kasperczak-Wright J, Biggs CI, et al. Probing the Biomimetic Ice Nucleation Inhibition Activity of Poly(vinyl alcohol) and Comparison to Synthetic and Biological Polymers. *Biomacromolecules*. 2015; 16 (9): 2820 – 2826. doi:10.1021/acs.biomac.5b00774.
21. Murray A, Congdon TR, Tomás RMF, Kilbride P, Gibson MI. Red Blood Cell Cryopreservation with Minimal Post-Thaw Lysis Enabled by a Synergistic Combination of a Cryoprotecting Polyampholyte with DMSO/Trehalose. *Biomacromolecules*. 2022; 23 (2): 467-477. doi:10.1021/acs.biomac.1c00599.
22. Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*. 2012; 22 (1): 123 – 133. doi:10.1093/glycob/cwr115.
23. Deller RC, Congdon T, Sahid MA, et al. Ice recrystallisation inhibition by polyols: comparison of molecular and macromolecular inhibitors and role of hydrophobic units. *Biomater Sci*. 2013; 1 (5): 478 – 485. doi:10.1039/c3bm00194f.
24. Capicciotti CJ, Kurach JD, Turner TR, et al. Small molecule ice recrystallization inhibitors enable freezing of human red blood cells with reduced glycerol concentrations. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Apr 8 [cited 16.08.2024]; 5:9692. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep09692>.
25. Liu X, Hu Y, Zhang W, et al. Tricine as a Novel Cryoprotectant with Osmotic Regulation, Ice Recrystallization Inhibition and Antioxidant Properties for Cryopreservation of Red Blood Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jul 30 [cited 12.03.2023]; 23 (15): 8462. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/15/8462>.
26. Dyubko TS, Pivovarenko VG, Kuleshova LG, et al. The mechanism of influence of polyvinyl alcohol (9 kDa) on the formation of ice crystals in aqueous solutions. *Low Temp. Phys*. 2022; 48: 734 – 740. doi.org/10.1063/10.0013309.
27. Quan GB, Han Y, Liu MX, et al. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose. *Cryobiology*. 2011; 62 (2): 135 – 144. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.01.015.
28. Dalyan O, Öztürk ÖF, Pişkin M. Toxicity of polyvinyl alcohols in medicinal chemist. *MANAS Journals of Engineering*. 2021, 9(2): 129–135. doi.org/10.51354/mjen.918635

Стаття надійшла 08.09.2025 р.

Контакти: Юлія Пахомова juliyapachomova@gmail.com