

УДК 57.04:57.085.23-612.112

ХАРАКТЕРИСТИКА КРИОПРОТЕКТОРОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ДОЛГОВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ ДОНОРСКИХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

О. В. ТИМОХИНА¹⁾, А. Е. ГОНЧАРОВ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Полученные из донорских моноцитов дендритные клетки перспективны для использования в лечении онкологических заболеваний. Однако имеются проблемные вопросы, лимитирующие в настоящее время их клиническое применение. Одним из таковых является протокол криоконсервации клеток с последующим восстановлением по востребованию. В целях снижения или полного исключения повреждающих факторов, действующих на клетки при замораживании, в питательную среду добавляется криопротектор. Используемые криопротекторы относятся к широкому спектру сахаров, диолов и аминокислот, которые стабилизируют биомолекулы различными способами в зависимости от их молекулярной массы и механизма действия на клетки. В работе охарактеризованы группы криопротекторов (эндо- и экзоцеллюлярные, смешанные и комбинированные), а также представлены методики криоконсервации дендритных клеток.

Ключевые слова: дендритные клетки; донорские дендритные клетки; криопротектор.

Образец цитирования:

Тимохина ОВ, Гончаров АЕ. Характеристика криопротекторов, используемых для длительного хранения донорских дендритных клеток. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;3:102–108. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-102-108>

For citation:

Timohina OV, Hancharou AY. Characteristics of cryoprotectors used for long-term storage of donor dendritic cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;3:102–108. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-102-108>

Авторы:

Оксана Васильевна Тимохина – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биофизики.
Андрей Евгеньевич Гончаров – кандидат медицинских наук, доцент; директор.

Authors:

Oksana V. Timohina, junior researcher at the laboratory of immunology and cell biophysics.
oksanabuschik@gmail.com
Andrei Y. Hancharou, PhD (medicine), docent; director.
andrei.hancharou@gmail.com



CHARACTERISTICS OF CRYOPROTECTORS USED FOR LONG-TERM STORAGE OF DONOR DENDRITIC CELLS

O. V. TIMOHINA^a, A. Y. HANCHAROU^a

^a*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus*

Corresponding author: O. V. Timohina (oksanabuschik@gmail.com)

Monocyte-derived donor dendritic cells are promising for use in the treatment of cancer. However, there are some problems that currently limit their clinical use. One of which is the cryopreservation of cells followed by restoration on demand. A cryoprotector must be added to the nutrient medium in order to reduce or completely eliminate the damaging factors acting on cells during freezing. Cryoprotectors refer to a wide range of sugars, diols and amino acids that stabilise biomolecules in various ways, depending on their molecular weight and mechanism of action on cells. The work describes groups of cryoprotectors (endo- and exocellular, mixed and combined cryoprotectors), as well as presents techniques of cryopreservation of dendritic cells.

Keywords: dendritic cells; donor dendritic cells; cryoprotector.

Введение

В последние годы появились работы, посвященные применению полученных из донорских моноцитов дендритных клеток (ДК), отражающие перспективы аллогенного использования ДК в лечении онкологических заболеваний [1–3]. Однако имеются проблемные вопросы, лимитирующие в настоящее время их клиническое применение: отсутствие стандартизации протоколов генерации, индукции созревания, а также криоконсервации донорских ДК.

Для длительного хранения клеточного продукта необходима криоконсервация, которая позволит восстановить биологические функции клеток после размораживания. При замораживании на живые объекты воздействуют два повреждающих фактора – формирование внутриклеточного льда и обезвоживание. Чтобы снизить или полностью исключить эти факторы, в питательную среду следует добавлять криопротектор [4]. Для достижения оптимального режима криоконсервации необходимо обеспечить сбалансированное соотношение питательной среды и криопротектора, так как чрезмерно низкая концентрация криопротектора приводит к шоковому охлаждению, а слишком высокая его концентрация токсична [5].

Используемые криопротекторы относятся к широкому спектру сахаров, диолов и аминокислот, которые стабилизируют биомолекулы различными способами в зависимости от их молекулярной массы и механизма действия на клетки. Выделяют две основные группы криопротекторов – эндоцеллюлярные (глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид (ДМАЦ), пропиленгликоль (ПГ), этиленгликоль (ЭГ)) и экзоцеллюлярные (поливинилпирролидон (ПВП), гидроксипропилкрахмал (ГЭК)).

Характеристика различных групп криопротекторов

Эндоцеллюлярные протекторы имеют низкую молекулярную массу (<100 Да), за счет чего способны проникать в клетки через плазматическую мембрану. Вещества данной группы обладают выраженной токсичностью, это обуславливает необходимость отмывки размороженной клеточной взвеси, что приводит к потере части криоконсервированных клеток [4].

Наиболее используемым криопротектором является ДМСО (7–10 % раствор) – органическое вещество, относящееся к классу оксидов, которое хорошо проникает в клетки, реорганизует структуру образующегося льда. Благодаря наличию кислорода ДМСО обладает высокой способностью вступать в реакции с солями и оксидами фосфора, серы, формировать связи с глицерином, сахарозой и другими органическими соединениями. Показано, что токсичность ДМСО на организменном уровне имеет видовую зависимость: полулетальная доза (ЛД₅₀) для кроликов составляет 19,2 г на 1 кг массы тела животного, для обезьян – 11,0, для мышей – 3,8, для собак – 2,5 г/кг.

Имеются данные об использовании в качестве криопротекторов глицерина, ДМАЦ, ПГ, ЭГ. Глицерин (10–20 % раствор) – органическое вещество, простейший представитель трехатомных спиртов. Его криопротекторная активность высока на различных биологических объектах. Однако как трехатомный спирт глицерин оказывает токсическое действие на данные биологические объекты (ЛД₅₀ составляет (4,57 ± 0,14) г/кг). Аминоспирт ДМАЦ обладает высокой криопротекторной активностью в отношении



тромбоцитов, лейкоцитов и других клеток. Он разрешен для клинического применения. Токсичность вещества изучена на различных животных: ЛД₅₀ для мышей составляет 4,2 г/кг, для крыс – 3,56 г/кг. Двухатомный спирт ПГ обладает протекторными свойствами в отношении различных клеток животных на более высоком уровне, чем глицерин и ДМСО, но при этом вызывает изменения на цитоплазматическом уровне. Установлено, что ЛД₅₀ для кроликов составляет 13,1 г/кг, для крыс – 6,0 г/кг [6]. Двухатомный спирт ЭГ – кислородсодержащее органическое соединение, которое при использовании в качестве криопротектора не оказывает выраженного цитотоксического действия на клетки. При этом отмечены низкая токсичность на клеточном уровне и выраженная токсичность на организменном [7]. Его ЛД₅₀ для крыс составляет 4,7 г/кг.

Экзоцеллюлярные протекторы не способны проникать в клетку из-за их высокой молекулярной массы (180–594 Да). Данные криопротекторы предотвращают гиперосмотический лизис [8; 9]. Растворы не проникающих в клетки органических веществ, как правило, обладают более слабыми криопротекторными свойствами и низкой токсичностью на клеточном и организменном уровнях. Интерес к криопротекторам этой группы не ослабевает благодаря возможности синтезировать протектор, не требующий удаления из размороженной взвеси клеток. Наиболее выраженными криопротекторными свойствами обладают ПВП, ГЭК и растворы на их основе. Искусственный полимер ПВП термоустойчив, ЛД₅₀ данного вещества на мышах не установлена. При внутривенном введении 25 % раствора ПВП переносимая доза составляет 8 г/кг, летальная – 12–15 г/кг. Являясь практически нетоксичным, биологически инертным веществом с почти отсутствующей иммунологической активностью [10], ГЭК может включаться в метаболические процессы в организме [11]. Однако в клиническом аспекте отмечена его способность вызывать аллергические и анафилактические реакции различной степени тяжести.

Кроме того, известны *вещества смешанного криопротекторного действия*, проявляющие свойства эндо- и экзоцеллюлярных криопротекторов, например полимерные соединения полиэтиленоксидов (ПЭО). Так, ПЭО с молекулярной массой 400 и 1500 применяются в качестве криопротекторов клеток костного мозга, крови и других биологических объектов. Установлено, что ПЭО с молекулярной массой до 400 обладают эндоцеллюлярным действием, а высокомолекулярные ПЭО – экзоцеллюлярным. Также отмечено, что ПЭО представляет собой малотоксичное вещество, криопротекторный эффект которого заключается в способности стабилизировать молекулы воды [12].

Появляется все больше фактов, свидетельствующих о том, что *комбинация эндо- и экзоцеллюлярных криопротекторов* более эффективна [13]. Перспективным направлением считается изучение эффективности комбинированных криопротекторов с включением в их состав дополнительных ингредиентов из солей органических и неорганических кислот, углеводов, белков плазмы крови, биологически активных веществ и других компонентов. По причине видоспецифичности биологического материала состав комбинированных криопротекторов вариативен (экзо- и эндоцеллюлярные криопротекторы, антиоксиданты и стабилизаторы биологических мембран (витамин Е, сывороточный альбумин)) [14]. Комбинированные криопротекторы способствуют стабилизации фракций воды, образованию мелкокристаллического льда, снижению эффекта гиперконцентрации солей и т. д. Однако в присутствии ряда криопротекторов отмечается увеличение интенсивности перекисного окисления липидов, которое зависит от вида вещества, его концентрации и времени экспозиции в нем клеток [15]. Замораживание и размораживание оказывают дополнительное влияние на повышение интенсивности процессов перекисного окисления липидов, что приводит к изменению состояния липидного бислоя клеточных мембран и нарушению структурных и функциональных систем клетки – ионных насосов, мембранных ферментов. Следовательно, при комбинировании необходимо учитывать воздействие данных веществ на клетки.

До настоящего времени остается открытым вопрос, какими свойствами должен обладать эффективный криопротектор, хотя некоторые из них известны: способность сохранять биологическую полноценность после замораживания-оттаивания, нетоксичность, отсутствие необходимости отмывания взвеси клеток после размораживания, растворимость в воде, способность стабилизировать молекулы воды, отсутствие накопления в клетках и разрушения клеточных мембран, способность участвовать в метаболических процессах жизнеспособных клеток [16].

Преимущества и недостатки охарактеризованных групп криопротекторов представлены в таблице.

В клинических исследованиях используют различные методики криоконсервации ДК [17–19]. В проведенных в США исследованиях ДК моноцитарного происхождения, культивируемые в бессывороточной среде, замораживали и хранили при –80 °С с использованием 4 % человеческого сывороточного альбумина и криопротекторов – внеклеточного 6 % ГЭК и внутриклеточного 5 % ДМСО. После размораживания оценивали жизнеспособность, фенотип ДК и представление антигена до и после криоконсервации (3, 6, 9, 12 мес. и более). Показано, что ДК сохраняли жизнеспособность ((82,0 ± 2,3) %) не менее 24 мес. Фенотип и функции ДК были сопоставимы с показателями до криоконсервации [17].



Характеристика криопротекторов
Characteristics of cryoprotectors

№ п/п	Криопротекторы	Преимущества	Недостатки
1	Эндоцеллюлярные	Низкая молекулярная масса (<100 Да), позволяющая проникать в клетки через плазматическую мембрану	Выраженная токсичность, обуславливающая необходимость отмывки взвеси клеток после размораживания
1.1	Диметилсульфоксид	Хорошее проникновение в клетки, реорганизация структуры образующегося льда, высокая способность вступать в реакции с солями и оксидами фосфата, серы, формировать связи с глицерином, сахарозой и др.	ЛД ₅₀ = 19,2 г/кг (для кроликов), ЛД ₅₀ = 11,0 г/кг (для обезьян), ЛД ₅₀ = 3,8 г/кг (для мышей), ЛД ₅₀ = 2,5 г/кг (для собак)
1.2	Глицерин	Высокая криопротекторная активность на различных биологических объектах	ЛД ₅₀ = (4,57 ± 0,14) г/кг
1.3	Диметилацетамид	Высокая криопротекторная активность в отношении тромбоцитов, лейкоцитов и других клеток, наличие разрешения на клиническое применение	ЛД ₅₀ = 4,2 г/кг (для мышей), ЛД ₅₀ = 3,56 г/кг (для крыс)
1.4	Пропиленгликоль	Протекторные свойства в отношении различных клеток животных на более высоком уровне, чем у глицерина и диметилсульфоксида	ЛД ₅₀ = 13,1 г/кг (для кроликов), ЛД ₅₀ = 6,0 г/кг (для крыс)
1.5	Этиленгликоль	Криопротекторные свойства, отсутствие выраженного цитотоксического действия на клетки	Выраженная токсичность на организменном уровне при низкой токсичности на клеточном уровне, ЛД ₅₀ = 4,7 г/кг (для крыс)
2	Экзоцеллюлярные	Низкая токсичность на клеточном и организменном уровнях, возможность синтезировать криоконсерванты, не требующие удаления из размороженной клеточной взвеси	Неспособность проникать в клетку из-за высокой молекулярной массы (180–594 Да), слабые криопротекторные свойства
2.1	Поливинилпирролидон	Термоустойчивость	Неустановление ЛД ₅₀ на мышах, переносимая доза при внутривенном введении 25 % раствора – 8 г/кг, летальная – 12–15 г/кг
2.2	Гидроксиэтилкрахмал	Нетоксичность, биологическая инертность с практически отсутствующей иммунологической активностью, способность включаться в метаболические процессы в организме	Способность вызывать аллергические и анафилактические реакции различной степени тяжести
3	Смешанные	–	–
3.1	Полимерные соединения полиэтиленоксидов	Эндоцеллюлярное (соединения полиэтиленоксидов с молекулярной массой до 400) и экзоцеллюлярное (высокомолекулярные соединения полиэтиленоксидов) действие, криопротекторный эффект, заключающийся в способности стабилизировать молекулы воды	Токсичность



№ п/п	Криопротекторы	Преимущества	Недостатки
4	Комбинированные	Большая эффективность, способствование стабилизации фракций воды, образованию мелкокристаллического льда, снижению эффекта гиперконцентрации солей и т. д.	Наблюдаемое в присутствии ряда криопротекторов увеличение интенсивности перекисного окисления липидов, приводящее к изменению состояния липидного бислоя клеточных мембран и нарушению структурных и функциональных систем клетки

В Республике Корее исследовали влияние криоконсервации моноцитов периферической крови на дифференцировку их в ДК. При этом криоконсервировали более $1 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл моноцитов периферической крови ($n = 52$ нед.) с использованием морозильника с регулируемой скоростью замораживания и хранили их в паровой фазе резервуара с жидким азотом. Влияние криоконсервации моноцитов на дифференцировку в ДК оценивали путем сравнения фенотипических и функциональных свойств незрелых и зрелых ДК, полученных из криоконсервированных моноцитов, с аналогичными свойствами ДК, дифференцированных из свежих моноцитов. В результате было показано, что дифференцированные из восстановленных после криоконсервации моноцитов ДК имели типичный иммунофенотип и сохраняли функциональную активность, эквивалентную активности ДК, полученных из свежих моноцитов [18].

В Национальном центре клеточных наук (Индия) оценивали влияние добавления трегалозы (не проникающего внутрь клеток олигосахарида) в криопротекторную среду на восстановление ДК после криоконсервации. Для длительного хранения ($n = 6$ мес.) ДК, полученные из моноцитов периферической крови, замораживали с помощью программируемой морозильной камеры с регулируемой скоростью замораживания и хранили в жидком азоте. Для кратковременного хранения ($n = 1$ мес.) клетки замораживали и хранили при -80 °С. Криопротекторная среда контрольной группы включала IMDM, 10 % ДМСО и 20 % бычьего сывороточного альбумина; в опытной группе криопротекторная среда дополнительно содержала 50 мкг/мл трегалозы. После восстановления ДК обеих групп оценивали жизнеспособность, морфологию, функциональность и фенотип клеток. Установлено, что добавление трегалозы в криопротекторную среду лучше сохраняет жизнеспособность и функциональность ДК [19].

Заключение

В настоящее время наиболее распространенным криопротектором для длительного хранения ДК является ДМСО – эндоцеллюлярный протектор, хорошо проникающий в клетку. Преимуществами применения ДМСО считаются достаточно низкая токсичность, невысокая стоимость, а также простой протокол пробоподготовки клеток перед криоконсервацией. Однако существуют альтернативные варианты, которые были описаны в единичных работах и не получили широкого распространения. Для определения подходящего протектора для криоконсервации донорских ДК, предназначенных для лечения онкозаболеваний, нужны дальнейшие исследования.

Библиографические ссылки

1. Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, et al. Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2013;9(6):1217–1227. DOI: 10.4161/hv.24149.
2. Saito S, Yanagisawa R, Yoshikawa K, Higuchi Y, Koya T, Yoshizawa K, et al. Safety and tolerability of allogeneic dendritic cell vaccination with induction of Wilms tumor 1-specific T cells in a pediatric donor and pediatric patient with relapsed leukemia: a case report and review of the literature. *Cytotherapy*. 2015;17(3):330–335. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.10.003.
3. Laurell A, Lönnemark M, Brekkan E, Magnusson A, Tolf A, Wallgren AC, et al. Intratumorally injected pro-inflammatory allogeneic dendritic cells as immune enhancers: a first-in-human study in unfavourable risk patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal for Immuno Therapy of Cancer*. 2017;5(1):52. DOI: 10.1186/s40425-017-0255-0.
4. Kusuma GD, Barabadi M, Tan JL, Morton DAV, Frith JE, Lim R. To protect and to preserve: novel preservation strategies for extracellular vesicles. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1199. DOI: 10.3389/fphar.2018.01199.
5. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*. 2015;18(5):422–436. DOI: 10.1089/rej.2014.1656.
6. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, Полежаева ТВ, Мартусевич АК, Исаева НВ и др. Четырехклассная систематизация биокриоконсервантов. I класс хладоограждающих растворов – эндоцеллюлярные криоконсерванты. *Вестник гематологии*. 2016;12(3):28–35.



7. Boutron P, Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethylene glycol. *Cryobiology*. 1979; 16(1):83–89. DOI: 10.1016/0011-2240(79)90015-4.
8. Van Blitterswijk C, De Boer J, Thomsen P, Hubbell J, Cancedda R, de Bruijn JD, et al. *Tissue engineering*. Amsterdam: Elsevier; 2008. 369 p.
9. Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*. 2014;68(3):343–348. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.007.
10. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, Полежаева ТВ, Мартусевич АК, Исаева НВ и др. Четырехклассная систематизация биокриоконсервантов. II класс хладоограждающих растворов – экзоцеллюлярные криоконсерванты. *Вестник гематологии*. 2016;12(3):36–39.
11. Polushina TV, Prostavkova TM, Bogino NA. Antishock blood substitute on the basis of oxyethylated starch. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1980;25(3):40–44.
12. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, Полежаева ТВ, Мартусевич АК, Исаева НВ и др. Четырехклассная систематизация биокриоконсервантов. III класс хладоограждающих растворов – криоконсерванты смешанного действия. *Вестник гематологии*. 2016;12(4):4–8.
13. Sung Yun Ha, Byung Chul Jee, Chang Suk Suh, Hee Sun Kim, Sun Kyung Oh, Seok Hyun Kim, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Human Reproduction*. 2005;20(7):1779–1785. DOI: 10.1093/humrep/deh854.
14. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, Полежаева ТВ, Мартусевич АК, Исаева НВ и др. Четырехклассная систематизация биокриоконсервантов. IV класс хладоограждающих растворов – комбинированные криоконсерванты. *Вестник гематологии*. 2016;12(4):9–12.
15. Онищенко ЕВ, Зинченко АВ. Исследование влияния некоторых проникающих криопротекторов на микросомы методом хемилюминесценции. *Проблемы криобиологии*. 2005;15(1):50–55.
16. Сведенцов ЕП. *Криоконсерванты для живых клеток*. Оводов ЮС, редактор. Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН; 2010. 80 с.
17. Celluzzi CM, Welbon C. A simple cryopreservation method for dendritic cells and cells used in their derivation and functional assessment. *Transfusion*. 2003;43(4):488–494. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2003.00359.x.
18. Yoon Jeong Heo, Cheol Hun Son, Joo-Seop Chung, You-Soo Park, Jeong Hwa Son. The cryopreservation of high concentrated PBMC for dendritic cell (DC)-based cancer immunotherapy. *Cryobiology*. 2009;58(2):203–209. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.006.
19. Shinde P, Khan N, Melinkeri S, Kale V, Limaye L. Freezing of dendritic cells with trehalose as an additive in the conventional freezing medium results in improved recovery after cryopreservation. *Transfusion*. 2019;59(2):686–696. DOI: 10.1111/trf.15028.

References

1. Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, et al. Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2013;9(6):1217–1227. DOI: 10.4161/hv.24149.
2. Saito S, Yanagisawa R, Yoshikawa K, Higuchi Y, Koya T, Yoshizawa K, et al. Safety and tolerability of allogeneic dendritic cell vaccination with induction of Wilms tumor 1-specific T cells in a pediatric donor and pediatric patient with relapsed leukemia: a case report and review of the literature. *Cytotherapy*. 2015;17(3):330–335. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.10.003.
3. Laurell A, Lönnemark M, Brekkan E, Magnusson A, Tolf A, Wallgren AC, et al. Intratumorally injected pro-inflammatory allogeneic dendritic cells as immune enhancers: a first-in-human study in unfavourable risk patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal for Immuno Therapy of Cancer*. 2017;5(1):52. DOI: 10.1186/s40425-017-0255-0.
4. Kusuma GD, Barabadi M, Tan JL, Morton DAV, Frith JE, Lim R. To protect and to preserve: novel preservation strategies for extracellular vesicles. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1199. DOI: 10.3389/fphar.2018.01199.
5. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*. 2015;18(5):422–436. DOI: 10.1089/rej.2014.1656.
6. Kostyaev AA, Utyomov SV, Andreev AA, Polezhaeva TV, Martusevich AK, Isaeva NV, et al. A four class systematization of biocryoconservants. The I class of cold preserving solutions – endocellular cryoprotectants. *The Bulletin of Hematology*. 2016; 12(3):28–35. Russian.
7. Boutron P, Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethylene glycol. *Cryobiology*. 1979; 16(1):83–89. DOI: 10.1016/0011-2240(79)90015-4.
8. Van Blitterswijk C, De Boer J, Thomsen P, Hubbell J, Cancedda R, de Bruijn JD, et al. *Tissue engineering*. Amsterdam: Elsevier; 2008. 369 p.
9. Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*. 2014;68(3):343–348. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.007.
10. Kostyaev AA, Utyomov SV, Andreev AA, Polezhaeva TV, Martusevich AK, Isaeva NV, et al. A four class systematization of biocryoconservants. The II class of cold preserving solutions – exocellular cryoprotectants. *The Bulletin of Hematology*. 2016;12(3):36–39. Russian.
11. Polushina TV, Prostavkova TM, Bogino NA. Antishock blood substitute on the basis of oxyethylated starch. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi*. 1980;25(3):40–44.
12. Kostyaev AA, Utyomov SV, Andreev AA, Polezhaeva TV, Martusevich AK, Isaeva NV, et al. A four class systematization of biocryoconservants. The III class of cold preserving solutions – cryoprotectants of mixed action. *The Bulletin of Hematology*. 2016; 12(4):4–8. Russian.
13. Sung Yun Ha, Byung Chul Jee, Chang Suk Suh, Hee Sun Kim, Sun Kyung Oh, Seok Hyun Kim, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Human Reproduction*. 2005;20(7):1779–1785. DOI: 10.1093/humrep/deh854.
14. Kostyaev AA, Utyomov SV, Andreev AA, Polezhaeva TV, Martusevich AK, Isaeva NV, et al. A four class systematization of biocryoconservants. The IV class of cold preserving solutions – combined cryoconservants. *The Bulletin of Hematology*. 2016;12(4):9–12. Russian.



15. Onischenko EV, Zinchenko AV. Study of effect of some permeable cryoprotectants on microsomes using chemiluminescence method. *Problems of Cryobiology*. 2005;15(1):50–55. Russian.
16. Svedentsov EP. *Kriokonservanty dlya zhivykh kletok* [Cryopreservatives for living cells]. Ovodov YuS, editor. Syktyvkar: Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2010. 80 p. Russian.
17. Celluzzi CM, Welbon C. A simple cryopreservation method for dendritic cells and cells used in their derivation and functional assessment. *Transfusion*. 2003;43(4):488–494. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2003.00359.x.
18. Yoon Jeong Heo, Cheol Hun Son, Joo-Seop Chung, You-Soo Park, Jeong Hwa Son. The cryopreservation of high concentrated PBMC for dendritic cell (DC)-based cancer immunotherapy. *Cryobiology*. 2009;58(2):203–209. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.006.
19. Shinde P, Khan N, Melinker S, Kale V, Limaye L. Freezing of dendritic cells with trehalose as an additive in the conventional freezing medium results in improved recovery after cryopreservation. *Transfusion*. 2019;59(2):686–696. DOI: 10.1111/trf.15028.

Получена 02.07.2021 / исправлена 22.07.2021 / принята 06.08.2021.
Received 02.07.2021 / revised 22.07.2021 / accepted 06.08.2021.