

UDC 57.086.13:611.018.83

А.М. Гольцев^{1,2*}, К.Є. Ямпольська^{1,2}, Г.Г. Кисельова¹, М.В. Останков¹,
Т.Г. Дубрава¹, Н.М. Бабенко¹, Ю.О. Гаєвська¹, М.О. Бондарович¹

Кріоконсервування дендритних клітин як етап біотехнологічного процесу для їх застосування у клінічній практиці

UDC 57.086.13:611.018.83

A.M. Goltsev^{1,2*}, K.Ye. Yampolska^{1,2}, H.G. Kisielova¹, M.V. Ostankov¹,
T.G. Dubrava¹, N.M. Babenko¹, Yu.O. Gaevska¹, M.O. Bondarovich¹

Cryopreservation as Biotechnological Application of Dendritic Cells in Clinical Practice

Реферат: Важлива складова патогенезу аутоімунних захворювань – дисрегуляція імунної системи у вигляді порушень толерантності до власних антигенів за зниження вмісту Т-регуляторних клітин. Їх формування тісно пов'язано з функцією дендритних клітин (ДК), тому перспективним для відновлення антиген-специфічної толерантності на тлі аутоімунних захворювань є застосування ДК із толерогенним потенціалом. Останнім часом активно обговорюється питання щодо створення банків толерогенних ДК для клінічного використання, яке передбачає їх кріоконсервування. Дотепер не існує єдиного протоколу заморозування ДК, який би враховував різні джерела їх одержання, вихідний структурно-функціональний стан перед заморозуванням, склад середовища кріоконсервування та інші фактори. У огляді узагальнено експериментальні дані щодо кріоконсервування мононуклеарів або моноцитів периферичної крові й кісткового мозку. Вивчено потенціал подальшого їх диференціювання *ex vivo* у ДК для забезпечення стабільності незрілого фенотипу й толерогенної функції.

Ключові слова: кріоконсервування, мононуклеарні клітини, моноцити, толерогенні дендритні клітини, аутоімунні захворювання.

Abstract: An important component of the pathogenesis of autoimmune diseases is the immune system deregulation as an impaired tolerance to its own antigens by reducing the content of T-regulatory cells. Their formation is closely related to the function of dendritic cells (DCs), so in autoimmune diseases the use of DCs with tolerogenic potential is promising for the restoration of antigen-specific tolerance. Recently, the issue of establishing the banks of tolerogenic DCs for clinical use, which involves their cryopreservation, has been actively discussed. To date, there is no common protocol for DCs freezing, which would take into account the different sources of their obtaining, the initial structural and functional state before freezing, composition of cryopreservation media and other factors. The review summarizes experimental data on cryopreservation of peripheral blood and bone marrow mononuclear cells or monocytes. The potential for their further *ex vivo* differentiation into DCs to ensure the stability of immature phenotype and tolerogenic function has been studied.

Key words: cryopreservation, mononuclear cells, monocytes, tolerogenic dendritic cells, autoimmune diseases.

Останнім часом розширюється спектр препаратів для клітинної та тканинної терапії [2, 3, 27, 60]. Визначення нових патогенетичних ознак тих чи тих захворювань орієнтує клініцистів не тільки до використання препаратів із поліфункціональними властивостями, але і тих, що здатні цілеспрямовано коригувати різні ланки патогенезу захворювання, до яких можуть бути віднесені дендритні клітини (ДК) [2, 56].

Відомо, що ДК – мінорна популяція мононуклеарів та «професійні» клітини кістково-мозкового походження, які презентують анти-

Recently, the range of cell and tissue therapy products has been expanding [18, 21, 26, 60]. Identification of new pathogenetic features of certain diseases orients clinicians not only to use the products with multifunctional properties, but also those that can purposefully correct various links in the disease pathogenesis, which may include dendritic cells (DCs) [18, 56].

DCs are known to be a minor population of mononuclear and 'professional' cells of bone marrow origin that present antigens [27]. On the one hand, DCs initiate an immune response by stimulating the

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

² ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини» НАН України, АМН України та МОЗ України

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: cryopato@gmail.com

Надійшла 26.01.2021

Прийнята до друку 19.10.2021

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² Interdepartmental Scientific Center of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences of Ukraine and Ministry of Health of Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: cryopato@gmail.com

Received 26, January, 2021

Accepted 19, October, 2021

гени [28]. З одного боку, ДК ініціюють імунну відповідь, стимулюючи формування широкого спектра клітин запального каскаду, у тому числі ефекторні Т-клітини, з іншого – пригнічують вираженість імунної відповіді через активацію Т-супресорної ланки імунної системи [2, 55]. При цьому дуалістичний характер Т-клітинної відповіді (активація або інгібіція) та її маніфестація через диференціювання в бік Th1 або Th2 каскаду зумовлені гістогенетичним походженням, зрілістю і функціональною активністю ДК [12, 26].

В останнє десятиліття був виділений ще один тип ДК – толерогенні, для яких характерні низька експресія ко-стимуляторних (CD80, CD86, CD83) і HLA (human leukocyte antigen) молекул, здатність до міграції у вторинні лімфоїдні органи, підвищена продукція протизапального цитокіну IL-10 на тлі низької або нульової секреції медіаторів запального каскаду (IL-12 і IFN- γ). Толерогенні ДК несприйнятливі до прозапальних стимулів і експресують молекули PDL1, CD95L, IDO, що пригнічують активацію Т-лімфоцитів [8, 50].

Результати експериментальних і «пілотних» клінічних досліджень свідчать про високий імунотерапевтичний потенціал ДК. Важливо підкреслити, що ці клітини виконують різні терапевтичні завдання. З одного боку, ДК входять до складу протипухлинних вакцин як природний ад'ювант для посилення імуногенності пухлинних клітин: виконують функцію спеціалізованих клітин, які оптимізують умови для ефективної презентації пухлинних антигенів, реалізують місцеву або системну імуносупресію шляхом індукції й підтримки імунної відповіді, спрямованої на елімінацію пухлинних клітин. З іншого боку, ДК є компонентом адаптивної терапії аутоімунних захворювань (АІЗ): реалізують толерогенну функцію через стимуляцію Т-регуляторних клітин (T_{reg}), дисфункція яких спостерігається в умовах АІЗ [14, 32].

Ідентифікація структурних та функціональних біомаркерів, які підтверджують перебування ДК у толерогенному стані – один із критеріїв клінічного застосування аутологічних, отриманих *ex vivo* толерогенних ДК. Визначення геномного і постгеномного профілю ДК, який підтверджує їх належність до толерогенних клітин [40] – найбільш поширений метод ідентифікації біомаркерів, які є «свідками» толерогенного потенціалу ДК. Саме такий рівень атестації ДК може надати надійну інформацію щодо їх толерогенного стану порівняно з іншими методами, зокрема визначенням фенотипових ознак або функціональних

formation of a wide range of inflammatory cascade cells, including effector T cells, on the other hand, they suppress the immune response expression by activating the T-suppressor part of immune system [2, 55]. The dualistic nature of T-cell response (activation or inhibition) and its manifestation via differentiation towards the Th1 or Th2 cascade are due to histogenetic origin, maturity and functional activity of DCs [7, 25].

In the last decade, another type of DCs has been identified, *i. e.* tolerogenic ones, which are characterized by low expression of co-stimulatory (CD80, CD86, CD83) and HLA (human leukocyte antigen) molecules, the ability to migrate to secondary lymphoid organs, increased production of anti-inflammatory cytokine IL-10 when secretion of mediators of inflammatory cascade (IL-12 and IFN- γ) is low or zero. Tolerogenic DCs are insensitive to pro-inflammatory stimuli and express PDL1, CD95L, IDO molecules, which inhibit the activation of T lymphocytes [2, 50].

The results of experimental and pilot clinical trials indicate a high immune therapeutic potential of DCs. It is important to emphasize that these cells perform various therapeutic tasks. On the one hand, DCs are part of antitumor vaccines as a natural adjuvant to enhance the immunogenicity of tumor cells: they perform the function of specialized cells that optimize the conditions for effective presentation of tumor antigens, implement local or systemic immune suppression by inducing and supporting immune response directed to elimination of tumor cells. On the other hand, DCs is a component of adoptive therapy of autoimmune diseases (AIDs): *i. e.* they implement the tolerogenic function through stimulation of T-regulatory cells (T_{reg}), the dysfunction of which is observed in AIDs [10, 32].

Identification of structural and functional biomarkers, conforming the presence of DCs in the tolerogenic state is one of the criteria for clinical use of autologous, *ex vivo* obtained tolerogenic DCs. Determination of the DCs genomic and post-genomic profile, supporting their belonging to tolerogenic cells [40] is the most common method of identifying biomarkers being the 'witnesses' of the DCs tolerogenic potential. Actually the very this level of DCs certification can provide reliable information on their tolerogenic status compared to other methods, including the determination of phenotypic traits or functional properties. Such markers could predict both the therapeutic potential of DCs and safety of the 'cellular product' in the form of tolerogenic DCs.

Dexamethasone-induced tolerogenic DCs express the genes for regulating the immune response due



властивостей. Такі маркери могли б стати предикторами як терапевтичного потенціалу ДК, так і безпеки «клітинного продукту» у вигляді толерогенних ДК.

У дексаметазон-індукованих толерогенних ДК відзначається експресія генів регуляції імунної відповіді, обумовленої функцією T_{reg} і ефektorних Т-клітин (JAG1, TBXAS1 і MERTK), молекул, які відповідають за диференціювання і функціонування ДК (IRAK3, GILZ, C1Q і STAB1), також за пригнічення сигналів запалення (MAP3K8/TPL-2, FCGR2B і VDR) [20]. Найбільший інтерес викликає C1Q-ген, що кодує продукування А-ланцюга C1q-компонента комплекменту, і є потужним модулятором ДК, здатним гальмувати їх активацію та диференціювання. Більш того, C1Q пригнічує активацію Т-клітин і продукування прозапальних цитокінів, одночасно посилюючи секрецію IL-10 [20, 42], що робить його потенційним маркером толерогенних ДК.

Важливим є дослідження здатності глюкокортикоїдів індукувати експресію в ДК білка з багатопрофільною біологічною активністю, відомого як глюкокортикоїд-індукована лейцинова застібка (GILZ). Експресія GILZ у ДК може бути активована, крім глюкокортикоїдів, й цитокінами TGF- β /IL-10 або коктейлем для дозрівання ДК, який містить TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2, рапаміцином і мітоміцином С, грибовими протеазами та інш. [55].

Білок GILZ, який експресується базально і/або у відповідь на глюкокортикоїди, сприяє формуванню толерогенного фенотипу ДК. Він модулює диференціювання наївних Т-клітин (експресія ендogenous GILZ), яке включає індукцію Th-2 і T_{per} , інгібіцію Th-1 і/або активацію Th-17. Білок GILZ перешкоджає передачі сигналів Т-клітинам через TCR-рецептор; блокує активацію мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK) і факторів транскрипції – білка активатора-1 (AP-1) і нуклеарного фактора- κ B (NF- κ B) [8, 13]. За високого рівня GILZ збільшується продукування IL-10 та підвищується індукція експресії ліганду білка запрограмованої загибелі клітин – PD-L1 за умов обмеження секреції прозапальних інтерлейкінів IL-12 і IL-23. Крім того, підвищення рівня експресії GILZ у ДК супроводжується зниженням їх здатності до стимулювання Т-ефektorів і підвищенням проліферації антиген-специфічних T_{per} [13, 43, 56]. Показано, що GILZ обмежує диференціювання прозапальних Th17-клітин, зв'язуючись із промоторними ділянками факторів транскрипції: STAT3 і головним їхнім регулятором – орфановими рецепторами ретинової кислоти (RORs)- γ t [46]. Разом з тим експресія GILZ

to the function of T_{reg} and effector T cells (JAG1, TBXAS1 and MERTK), molecules responsible for the differentiation and function of DCs (IRAK1, CQ, and STAB1) as well as suppression of inflammation signals (MAP3K8/TPL-2, FCGR2B and VDR) [16]. Of greatest interest is the C1Q gene, encoding the production of the A-chain of the C1q component of complement, and being a powerful modulator of DCs, able to inhibit their activation and differentiation. Moreover, C1Q inhibits T cell activation and pro-inflammatory cytokine production, while enhancing IL-10 secretion [16, 42], making it a potential marker of tolerogenic DCs.

It is critical to study the ability of glucocorticoids to induce the expression in DCs of a protein with versatile biological activity known as glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ).

GILZ expression in DCs can be activated, in addition to glucocorticoids, by cytokines TGF- β /IL-10 or a cocktail for DCs maturation containing TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2, rapamycin and mitomycin C, fungal proteases *etc.* [55].

GILZ protein, which is expressed basally and/or in response to glucocorticoids, promotes the formation of a tolerogenic DCs phenotype. It modulates the differentiation of naive T cells (endogenous GILZ expression), which includes the induction of Th-2 and T_{reg} , inhibition of Th-1 and/or activation of Th-17. GILZ protein prevents the transmission of signals to T cells through the TCR receptor; blocks the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) and transcription factors, *i. e.* activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) [2, 9]. At high levels of GILZ increases the production of IL-10 and increases the induction of ligand expression of the programmed protein cell death – PD-L1 under conditions of limited secretion of pro-inflammatory interleukins IL-12 and IL-23. In addition, increased GILZ expression in DCs is accompanied by a decrease in their ability to stimulate T-effectors and increased proliferation of antigen-specific T_{regs} [9, 43, 56]. GILZ has been shown to limit the differentiation of pro-inflammatory Th17 cells by binding to the promoter regions of their transcription factors: STAT3 and their major regulator, orphan retinoic acid receptors (RORs) - γ t [46]. However, GILZ expression in DCs promotes peripheral T_{reg} production by activating the TGF- β /SMAD2 signaling pathway (Similar to Mothers Against Decapentaplegic 2), leading to induction of the *Foxp3* transcription factor responsible for the T_{reg} suppressor function [9].

The results show both an increase [15] and a decrease [34] in the expression in dexamethasone-induced tolerogenic DCs of the IDO1 gene, which



у ДК сприяє продукції T_{per} на периферії при активації сигнального шляху TGF- β /SMAD2 (Similar to Mothers Against Decapentaplegic 2), що призводить до індукції транскрипційного фактора Foxp3, який відповідає за супресорну функцію T_{per} [13].

Одержано результати, що свідчать як про збільшення [19], так і про зниження [34] експресії в дексаметозон-індукованих толерогенних ДК *IDO1* гена, який кодує продукцію індоламін 2,3-діоксигенази – ферменту, тісно пов'язаного з індукцією імунної толерантності через активацію супресорної ланки імунної системи. Подібні розбіжності можуть бути пояснені відмінностями в протоколах отримання ДК, а також різними методами виявлення досліджуваного гена. Разом з тим у дексаметозон-індукованих толерогенних ДК відзначено й різноспрямовану експресію генів ряду цитокінів: підвищений рівень відповідає за продукування протизапального цитокіну – IL-10, а знижений – прозапального IL-12 [40], що є доказом перепрофілювання ДК у толерогенний стан.

Використання ДК у програмах терапії АІЗ передбачає як створення їх запасів, так і довгострокове зберігання при ультранизьких температурах. Вирішення цього завдання знаходиться в компетенції кріоімунологів, які досліджують нові властивості клітин імунної системи, індукованих ультранизькими температурними факторами, а також розробляють біокріовакцини шляхом варіювання режимами кріовпливу на біооб'єкт [5].

Важливо зазначити, що до теперішнього часу не розроблено єдиного протоколу заморожування ДК. Неодноразово підкреслювалося, що ефективність кріоконсервування різних біологічних об'єктів залежить від їхнього початкового стану [4, 21, 24, 25]. У цьому аспекті ДК є також гетерогенним пулом клітин з різними початковими структурними і функціональними характеристиками. Вказані особливості ДК визначаються ступенем зрілості й здатності до реалізації толеро- або імуногенної функції через молекули та внутрішньоклітинні структури, тому зрілий або незрілий тип ДК має різний початковий статус й різну кріолабільність.

Основними джерелами отримання ДК є CD14^{hi} моноцити або моноклеари, виділені в градієнті щільності з периферичної крові людини, кісткового мозку або гемопоетичних органів експериментальних тварин [20, 28, 31, 52]. Аналіз опублікованих робіт з кріоконсервування ДК показав, що на початкових етапах як експериментальних, так і клінічних досліджень заморожування ДК проводилося під захистом 1 М або 2 М ДМСО

encodes the production of indolamine 2,3-dioxygenase being an enzyme closely related to associated with the induction of immune tolerance through activation of the immune system suppressor part. Such differences can be explained by differences in the protocols for DCs obtaining, as well as different methods of detecting the test gene. However, dexamethasone-induced tolerogenic DCs also show multidirectional expression of a number of cytokines: an increased level is responsible for the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 and a lower level controls the production of pro-inflammatory IL-12 [40] that is an evidence of the DCs re-profiling into tolerogenic state.

The use of DCs in AIDs therapy programs involves both the creation of their reserves and long-term storage at ultra-low temperatures. The solution to this problem can be found in the responsibility of cryoimmunologists, who study new properties of cells of the immune system induced by ultra-low temperature factors, as well as develop biocryovaccines by varying the modes of cryopreservation of the biological object [20].

It is crucial to note that a single protocol for DCs freezing has not been developed so far. It has been repeatedly emphasized that the effectiveness of cryopreservation of various biological objects is determined by their initial state [28, 17, 23, 24]. In this aspect, DCs are also heterogeneous pool of cells with different initial structural and functional characteristics. These features of DCs are determined by the degree of maturity and ability to implement tolerogenic or immunogenic function through the molecules and intracellular structures, so the mature or immature type of DCs has a different initial status and various cryolabilities.

The main sources of DCs are CD14^{hi} monocytes or mononuclear cells isolated in a density gradient from human peripheral blood, bone marrow or hematopoietic organs of experimental animals [16, 27, 31, 52]. Published reports on cryopreservation of DCs showed that at the initial stages of both experimental and clinical studies the DCs were frozen out under the protection of 1 M or 2 M DMSO with different cooling rates: 0.3; 1.5; 10; 20; 70; 150 deg/min to -60°C , followed by immersion into liquid nitrogen [52]. The maximum preservation of DC was observed at slow cooling rates (0.3; 1.5 deg/min) and was 57% for rats' DCs and 72% for human ones. Interestingly, DCs were more sensitive to freezing than lymphocytes and macrophages derived from human or rat spleen [52]. The low rate of DCs preservation after cryopreservation was confirmed by L. Mendoza *et al.* [36].



з різними швидкостями охолодження: 0,3; 1,5; 10; 20; 70; 150 град/хв до -60°C з наступним зануренням у рідкий азот [52]. Максимальне збереження ДК відзначалося за повільних швидкостях охолодження (0,3; 1,5 град/хв) і становило 57% для ДК щурів і 72% для ДК людини. Цікаво, що ДК виявилися більш чутливими до заморожування, ніж лімфоцити і макрофаги, які отримували з селезінки людини або щура [52]. Низький показник збереженості ДК після кріоконсервування підтверджено L. Mendoza та співавт. [36]. Так, збереження ДК, отриманих із мононуклеарів периферичної крові людини або кісткового мозку мишей C57Bl/6 та охолоджених зі швидкістю 1 град/хв до -70°C із подальшим зануренням у рідкий азот, не перевищувала 40%. У цьому ж циклі досліджень [37] у порівняльному аспекті були оцінені фенотипові характеристики нативних і кріоконсервованих ДК. Після розморожування і подальшого культивування протягом 7 діб автори оцінювали показники середньої інтенсивності флюоресценції (СІФ) таких мембранних молекул, як МНСІ, МНСІІ, CD80, CD86, CD11b, CD11c, CD54, CD205. З восьми досліджених маркерів кріоконсервованих ДК порівняно з нативними ДК зниження СІФ було відмічено у п'яти: МНСІІ – в 1,3; CD80 – 1,4; CD86 – 1,2; CD11c і CD54 – 3 рази. Даний факт демонструє зниження ступеня експресії коstimуляторних молекул, що може свідчити про гальмування потенціалу диференціювання кріоконсервованих ДК і, як наслідок, – їх здатності до презентації антигена. Встановлено, що саме початковий стан біооб'єктів, тобто структура і функція клітин, тканин, органів, визначає ступінь їх кріолабільності [4, 21, 23, 24, 25]. Цієї ж точки зору дотримуються Н. Hayden та співавт. [28], які заморожували моноцити периферичної крові людини і вирощені з них незрілі та полузрілі ДК під захистом 10% ДМСО зі швидкістю 1 град/хв до -80°C . Автори зробили висновок, що найбільш кріостійкими виявилися моноцити, а найменш стійкими – напівзрілі ДК, а структура та функція кожного типу клітин (моноцити, незрілі, полузрілі ДК), безумовно, впливають і на формування їхньої кріолабільності/кріостабільності.

З огляду на необхідність застосування у клінічній практиці переважно кріоконсервованих зрілих ДК для посилення протипухлинної активності імунної системи виникає необхідність відпрацювання підходів отримання функціонально повноцінних імуногенних ДК. У більшості експериментальних і клінічних робіт саме моноцити використовують для кріоконсервування з подальшим (після розморожування) їх диферен-

Thus, the preservation of DCs obtained from human peripheral blood or bone marrow of C57Bl/6 mice mononuclear cells and cooled at a rate of 1 deg/min to -70°C with subsequent immersion into liquid nitrogen did not exceed 40%. In the same cycle of studies [36] the phenotypic characteristics of native and cryopreserved DCs were comparatively evaluated. After thawing and subsequent cultivation for 7 days, the authors assessed the mean fluorescence intensity (MFI) of membrane molecules such as MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD11b, CD11c, CD54, CD205. Of the eight markers of cryopreserved DCs studied compared to native DCs, a reduced AFI was observed in five: MHC II – in 1.3; CD80 – 1.4; CD86 – 1.2; CD11c and 3 times for CD54. This fact demonstrates a decrease in the rate of expression of co-stimulatory molecules, which may indicate an inhibition of the differentiation potential of cryopreserved DCs and, as a consequence, their ability to present antigen.

It is established that the initial state of bioobjects, *i. e.* the structure and function of cells, tissues, organs, determines the degree of their cryolability [28, 17, 22, 23, 24]. The same is supported by Н. Hayden *et al.* [27], who froze human peripheral blood monocytes and grown from them immature and semi-mature DCs under the protection of 10% DMSO at a rate of 1 deg/min to -80°C . The authors concluded that the monocytes were the most cryostable, and the least stable were semi-mature DCs, but the structure and function of each cell type (monocytes, immature, semi-mature DCs), surely, affect the formation of their cryolability/cryostability.

In regard of the need to use in clinical practice mainly cryopreserved mature DCs to enhance the anti-tumor activity of the immune system, the approaches for obtaining functionally complete immunogenic DCs should be developed. In most experimental and clinical studies, monocytes are used for cryopreservation with their subsequent (after thawing) *in vitro* differentiation in mature DCs [16, 39, 41, 43]. Thus, Н. Hayden *et al.* [27] found a specific response of cryopreserved monocytes and immature cryopreserved DCs to factors, inducing DCs maturation *in vitro* (TNF- α , IFN- γ and LPS). It was shown that mature DCs were formed more efficiently from cryopreserved monocytes than from immature cryopreserved DCs. Further analysis of the functional properties of mature DCs derived from cryopreserved monocytes revealed their increased ability to express FOXP3 protein, *i. e.* to form T_{reg} in the CD3⁺ fraction of peripheral blood lymphocytes compared to the DCs derived from native monocytes. In addition, the freeze-thaw



ціюванням *in vitro* в зрілі ДК [20, 39, 41, 43]. Так, Н. Hayden та співавт. [28] виявили специфічну відповідь кріоконсервованих моноцитів та незрілих кріоконсервованих ДК на фактори, які індукують дозрівання ДК *in vitro* (TNF- α , IFN- γ і LPS). Було показано, що з кріоконсервованих моноцитів більш ефективно, ніж із незрілих кріоконсервованих ДК формувалися зрілі ДК. Подальший аналіз функціональних властивостей зрілих ДК, отриманих саме з кріоконсервованих моноцитів, встановив їх підвищену здатність до експресії FOXP3-білка, тобто до формування T_{per} у CD3⁺-фракції лімфоцитів периферичної крові порівняно з ДК, отриманими з нативних моноцитів. Крім того, процедура заморожування-відтавання гальмувала продукцію цими ДК запальних цитокінів (IL-12 та IFN- γ). У процесі співкультивування CD3⁺ Т-клітин пацієнтів з усіма типами ДК, отриманими з кріоконсервованих моноцитів, незрілих та полузрілих ДК, спостерігалось зниження проліферативної активності Т-клітин. Дійсно, характер впливу кріоконсервування на мононуклеари та моноцити (попередники ДК) залишається невивченим, хоча викликає безумовний інтерес, особливо щодо потенціалу подальшого їх диференціювання в ДК. Думка більшості дослідників у питанні вибору програми кріоконсервування мононуклеарів та моноцитів співпадає відносно використання повільної швидкості охолодження: 1 град/хв до -80°C із подальшим зануренням у рідкий азот [11, 28, 35, 41, 49] та відігріванням при 37°C . Т. Buhl та співавт. назвали таку програму «стандартною» [11].

Вказується на можливість варіювання компонентами середовища кріоконсервування, до складу якого входять аутологічна або ембріональна теляча сироватка (ЕТС 90%) і ДМСО (10%) або RPMI-1640 (40–70%), ЕТС (20–40%) та ДМСО (10–20%). Зокрема, Н. Hayden та співавт. [28] довели, що більш ефективно заморожування моноцитів на середовищі RPMI з 20% сироватки і 10% ДМСО, ніж з 90% сироватки. На думку деяких авторів температура відтавання (за кімнатної температури протягом 10 хв, або при 37°C протягом 1 хв) менше впливала на збереженість клітин [28, 29].

М. Makino та співавт. [31] запропонували заморожувати мононуклеари периферичної крові людини зі швидкістю охолодження 1 град/хв до кінцевої температури -70°C у захисному середовищі, яке містило різні співвідношення ЕТС (20–30%) і ДМСО (8–12%). Було показано, що кріоконсервовані мононуклеари, як й нативні, здатні генерувати під захистом 12% ДМСО *ex vivo* зрілі

inhibited the production of inflammatory cytokines by these DCs (IL-12 and IFN- γ). During coculturing of the patients' CD3⁺ T cells with all types of DCs derived from cryopreserved monocytes, immature and semi-mature DCs, a decrease in the proliferative activity of T cells was observed. Indeed, the nature of the cryopreservation effect on mononuclear cells and monocytes (DCs precursors) remains unexplored, although it is of definite interest, especially regarding the potential for their further differentiation in DCs. The opinion of most researchers on the choice of cryopreservation protocols for mononuclear cells and monocytes coincides as for the use of slow cooling rate: 1 deg/min to -80°C with subsequent immersion into liquid nitrogen [6, 27, 35, 41, 49] and warming at 37°C . T. Buhl *et al.* defined such a protocol as 'standard' [6].

The possibility of varying the components of the cryopreservation medium, which includes autologous or fetal bovine serum (90% FBS) and DMSO (10%) or RPMI-1640 (40–70%), FBS (20–40%) and DMSO (10–20%) is emphasized. In particular, Н. Hayden *et al.* [27] showed that freezing monocytes with RPMI medium with 20% serum and 10% DMSO was more effective than the applying of 90% serum. According to some authors, the warming temperature (at room temperature for 10 min, or at 37°C for 1 min) had less effect on cell preservation [27, 29].

М. Makino *et al.* [31] suggested freezing human peripheral blood mononuclear cells with a cooling rate of 1 deg/min to a final temperature of -70°C in a protective medium containing different ratios of FBS (20–30%) and DMSO (8–12%). Cryopreserved mononuclear cells, as well as native ones, have been shown to be able to generate mature immunogenic DCs under the protection of 12% DMSO *ex vivo*. Dendritic cells obtained in this study from cryopreserved mononuclear cells expressed high levels of HLA-DR-, HLA-DQ-, CD80- and CD86-molecules, as well as DCs, which were generated from native mononuclear cells. According to other authors, the rates of viability and expression of surface cell markers of mature DCs obtained from cryopreserved and native mononuclear cells did not differ [29, 36, 57]. This is confirmed by the fact that even after cryopreservation of monocytes according to the 'standard program' [6], the functional potential of DCs generated from them coincided with that of DCs obtained from native monocytes [14, 27].

However, there are a number of conflicting reports on a reduced rate of differentiation of cryopreserved mononuclear cells in mature DCs with LPS stimulation [27, 35, 36, 49]. It was shown that in



імуногенні ДК. Дендритні клітини, отримані в цьому дослідженні з кріоконсервованих мононуклеарів, експресували високі рівні HLA-DR-, HLA-DQ-, CD80- і CD86-молекул, як і ДК, які були генеровані з нативних мононуклеарів. За даними інших авторів встановлено, що рівень життєздатності та експресії поверхневих клітинних маркерів зрілих ДК, що були отримані з кріоконсервованих і нативних мононуклеарів, не відрізнялися [29, 36, 57]. Це підтверджено тим фактом, що і після кріоконсервування моноцитів за «стандартною програмою» [11] функціональний потенціал генерованих із них ДК співпадав із ДК, отриманих із нативних моноцитів [18, 28]. Однак існує ряд суперечливих повідомлень про зниження швидкості диференціювання кріоконсервованих мононуклеарів у зрілі ДК при стимуляції LPS [28, 35, 36, 49]. Показано, що у ДК, отриманих *in vitro* з кріоконсервованих моноцитів, був знижений рівень експресії CD83- і CD86-молекул, а після обробки LPS продукування ними прозапальних цитокінів IL-12 і TNF α не збільшувалося. На думку Н. Hayden та співавт. [28], саме зниженим рівнем продукції IL-12 такими ДК зумовлена і менша швидкість проліферації культивованих із ними Т-клітин у змішаній культурі лімфоцитів. Це узгоджується з даними D. Messmer та співавт. [37], які свідчать про більш низький рівень IL-12 у супернатантах ДК, отриманих із кріоконсервованих моноцитів, ніж у нативних. Отже, у вирощених із кріоконсервованих мононуклеарів ДК була знижена здатність до продукування критичного медіатора запального каскаду – IL-12.

Слід врахувати той факт, що перепрофілювання функції моноцитів та мононуклеарів після описаних процедур можливо за умов кріоконсервування. Зміна зазначених характеристик моноцитів та мононуклеарів, які пов'язані з формуванням ДК, є наслідком функціонування їх геномних і постгеномних профілів. Цю думку підтверджують дані щодо впливу кріоконсервування на експресію широкого профілю генів [18, 21, 22]. Ступінь такого впливу залежить від умов кріоконсервування. Таким чином, варіюючи компоненти технологічного процесу заморожування МНК або МОН, можна «під замовлення» отримувати з них імуно- або толерогенні ДК.

Цікаво, що саме в супернатантах ДК, вирощених із кріоконсервованих моноцитів, порівняно з нативним контролем була підвищена концентрація протизапального IL-10, асоційованого з функцією незрілих ДК. Даний факт свідчить про можливість отримання *ex vivo* після кріоконсервування з моноцитів незрілих толерогенних ДК [29, 35].

the DCs obtained *in vitro* from cryopreserved monocytes, the expression rate of CD83 and CD86 molecules was reduced, and after LPS treatment they did not increase the production of IL-12 and TNF α pro-inflammatory cytokines. According to H. Hayden *et al.* [27], it is the reduced level of IL-12 production of such DCs that causes a lower rate of proliferation of T cells cultured with them in mixed lymphocyte culture. This is consistent with the data of D. Messmer *et al.* [37], indicating lower levels of IL-12 in DCs supernatants derived from cryopreserved monocytes compared to native ones. Thus, the DCs grown from cryopreserved mononuclear cells had a reduced ability to produce a critical mediator of the inflammatory cascade, namely IL-12.

It should be borne in mind that the re-profiling of the function of monocytes and mononuclear cells after the described procedures is possible during cryopreservation. The change in these characteristics of monocytes and mononuclear cells, which are associated with the formation of DCs, is a consequence of the functioning of their genomic and postgenomic profiles. This view is supported by data on the effect of cryopreservation on the expression of a wide range of genes [14, 17, 19]. The extent of such an influence depends on the cryopreservation conditions. Thus, varying the components of the technological process of freezing of MNCs or monocytes, you can 'on request' to obtain from them immune or tolerogenic DCs.

Interestingly, the very in the supernatants of DCs grown from cryopreserved monocytes the concentration of anti-inflammatory IL-10 associated with the function of immature DCs was increased compared to the native control. This fact indicates the possibility of *ex vivo* obtaining after cryopreservation of immature tolerogenic DCs from monocytes [29, 35].

The question of the mechanism of inducing the tolerogenic DCs from cryopreserved monocytes and mononuclear cells remains controversial. Thus, in the paper of G.F. Silveira *et al.* [49] it has been demonstrated that in immature DCs derived from cryopreserved monocytes, the rate of maturation and the intensity of cytokine secretion in response to LPS were lower compared to native ones. The authors explain the decrease in the intensity of immature DCs formed from cryopreserved monocytes by inhibition of receptor expression for GM-CSF (CD116) and IL-4 (CD124) or their 'shedding', which is often observed during cryopreservation of cell suspensions of various types [17]. A similar nature of the change in expression can occur with TLR4. This explains the decrease



Дискусійним залишається питання щодо механізму індукції ДК із толерогенною функцією з кріоконсервованих моноцитів та мононуклеарів. Так, у роботі G.F. Silveira та співавт. [49] показано, що у незрілих ДК, отриманих із кріоконсервованих моноцитів, швидкість дозрівання та інтенсивність секреції цитокінів у відповідь на LPS порівняно з нативними були меншими. Зниження інтенсивності формування незрілих ДК із кріоконсервованих моноцитів автори пояснюють інгібіцією експресії рецепторів до GM-CSF (CD116) і IL-4 (CD124) або їх «шедінгом», що часто спостерігається в процесі кріоконсервування клітинних суспензій різного типу [21]. Подібний характер зміни експресії може відбуватися і з TLR4. Це пояснює зниження швидкості дозрівання кріоконсервованих ДК у присутності LPS, який є лігандом для TLR4. Відомо, що під час зв'язування TLR4 з LPS активується ряд адаптерних білків і киназ, які беруть участь в індукції основних прозапальних факторів, що сприяють дозріванню ДК [1]. Таким чином, кріоконсервування індукує формування саме незрілого фенотипу ДК, обмежуючи можливість їх подальшого дозрівання. Причиною цього може бути «шедінг» або зниження рівня експресії TLR4 та інших рецепторних структур в умовах інтегральної інгібіції метаболічних процесів у клітинах після їх розморожування. При цьому механізм формування незрілого фенотипу ДК і властивості їм толерогенної функції до кінця не з'ясовані і потребує подальшого вивчення.

Загальновідомий факт модифікації під дією кріоконсервування рецепторного «репертуару» клітин, зокрема, за рахунок їхнього «шедінгу» [21, 56], пригнічення синтезу одних видів білків [15] і підвищення інших, наприклад, білків теплового шоку (Hsp) [18, 47]. Показано збільшення вмісту цитозольного білка Hsp70 після заморожування/відігрівання мієлоїдних попередників, моноцитів та ДК. Деякі автори вказують, що цей білок володіє імуносупресивним потенціалом [10, 51, 59] і сприяє модуляції фенотипу ДК у бік толерогенного, що супроводжується підвищенням продукції IL-10 [30, 50, 59]. Показано, що в ДК Hsp70 на тлі зниження продукції TNF- α пригнічує експресію таких мембранних коstimуляторних структур, як CD86 і MHCII. Також Hsp70 здатний змінювати баланс про- і протизапальних цитокінів у бік підвищення останніх [30, 50, 59]. До того ж після зв'язування з ендодитарним рецептором, а далі через TLR2 Hsp70 передає сигнал активації гена мієлоїдного диференціювання MyD88 [10]. Наступне фосфорилування регуляторної кінрази ERK може ініціювати активацію

in the maturation rate of cryopreserved DCs in the presence of LPS, which is a ligand for TLR4. Binding of TLR4 to LPS is known to activate a number of adaptor proteins and kinases involved in the induction of major pro-inflammatory factors that contribute to DCs maturation [4]. Thus, cryopreservation induces the formation of the immature phenotype of DCs, limiting the possibility of their further maturation. This can be likely caused by 'shading' or reduced expression of TLR4 and other receptor structures in terms of integrated inhibition of metabolic processes in cells after thawing. However, the mechanism of formation of the immature phenotype of DC and their inherent tolerogenic function is not fully understood and requires further investigation.

It is a well-known fact that the receptor 'repertoire' of cells is modified by cryopreservation, in particular, due to their 'shading' [17, 56], inhibition of the synthesis of some proteins [11] and increase of others, such as heat shock proteins (Hsp) [14, 47]. Enhanced content of the cytosolic protein Hsp70 after freezing/warming of myeloid precursors, monocytes and DC has been shown. Some authors point out that this protein has immune suppressive potential [5, 50, 59] and promotes modulation of the DCs phenotype towards tolerogenic, accompanied by increased production of IL-10 [30, 50, 59]. Hsp70 has been demonstrated to inhibit the expression of membrane co-stimulatory structures such as CD86 and MHCII against the background of decreased TNF- α production. Hsp70 is also able to change the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in the direction of increasing the latter [30, 50, 59]. In addition, after binding to the endocytic receptor and then via TLR2, Hsp70 transmits the activation signal of the myeloid differentiation gene MyD88 [5]. Subsequent phosphorylation of ERK regulatory kinase may initiate activation of a transcription factor that will bind to the *il-10* gene promoter, increasing IL-10 production. By activating STAT3-sensitive genes and/or inhibiting NF- κ B and MAPK activity, IL-10 inhibits the transcription of pro-inflammatory cytokine genes in activated macrophages, as well as the expression of MHCII and co-stimulatory molecules, that reduces their ability to present antigen and activate T cells.

Indeed, IL-10 is thought to be a major cytokine in the induction of tolerance during immune therapy in the patients with AIDs due to its ability to promote the formation of tolDC alone or in combination with TGF- β [45]. The cytokine IL-10 plays an important role in the formation of T_{reg}. Tolerogenic DCs obtained in protocols using dexamethasone



фактора транскрипції, який буде зв'язуватися з промотором гена *il-10*, підвищуючи продукцію ІЛ-10. Шляхом активації STAT3-чутливих генів і/або інгібіції активності NF- κ B і MAPK ІЛ-10 пригнічує транскрипцію генів прозапальних цитокінів у активованих макрофагах, а також експресію МНС II і коstimуляторних молекул, що знижує їхню здатність до презентації антигена та активації Т-клітин.

Дійсно, ІЛ-10 вважають основним цитокіном в індукції толерантності під час проведення імунотерапії пацієнтам із АІЗ з огляду на його здатність окремо або в комбінації з TGF- β сприяти утворенню толДК [45]. Цитокін ІЛ-10 відіграє важну роль у формуванні T_{per} . Толерогенні ДК, отримані у протоколах із використанням дексаметазону і вітаміну D3, які продукують ІЛ-10, здатні стимулювати утворення T_{per} (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-лімфоцитів). Причому ці ДК підсилюють толерогенний потенціал T_{per} , які продукують ІЛ-10 [44].

Для сімейства Hsp70 властива протизапальна активність як наслідок їх імуносупресивного потенціалу. Цікаво, що екзогенний Hsp70 може пригнічувати запальні реакції в моделях артриту, коліту і за відторгнення трансплантата, однак механізми, завдяки яким реалізується цей ефект, потребують подальшого вивчення [30, 33].

Відомо, що імунозапальний процес – захисна реакція організму, і розглядається як одна з форм його стресового стану [6], який супроводжується збільшенням синтезу в імунокomпетентних клітинах внутрішньоклітинного Hsp70 [33]. Підвищення вмісту цього білка є етапом реалізації толерогенної дії деяких Hsp, у тому числі й при АІЗ. Пригнічення запалення, що супроводжується підвищенням продукції протизапального цитокіну ІЛ-10, спостерігається як внаслідок імунізації тварин мікробним Hsp70, так і збільшення вмісту власних внутрішньоклітинних Hsp70 [30]. Протизапальна активність ряду Hsp полягає у захисті імунокomпетентних клітин від апоптозу через блокаду початкових шляхів його розвитку. Вважається, що підвищена кількість Hsp пухлинними клітинами запобігає запуску апоптозу у відповідь на стресорний вплив [33, 48].

Важливо, що Hsp мають відношення й до перефільювання функціонального статусу ДК: перехід від імунного до толерогенного. Така трансформація ДК відбувається під дією деяких харчових органічних сполук, зокрема карвакрола, присутнього в ефірних маслах орегано, бергамота і чебрецю [7]. Встановлено, що ці сполуки здатні підвищувати рівень ендогенних Hsp70 та інду-

and vitamin D3, which produce *IL-10*, are able to stimulate the formation of T_{reg} (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-lymphocytes). Moreover, these DCs enhance the tolerogenic potential of T_{reg} , producing IL-10 [44].

The Hsp70 family has anti-inflammatory activity as a consequence of their immune suppressive potential. Interestingly, exogenous Hsp70 may inhibit inflammatory responses in models of arthritis, colitis, and graft rejection, but the mechanisms by which this effect is implemented require further study [30, 33].

It is known that the immune inflammation is a protective response of the body, and is considered as one of the forms of its stress state [6], which is accompanied by increased synthesis in immune competent cells of intracellular Hsp70 [33]. Increasing the content of this protein is a step in implementing the tolerogenic action of some Hsp, including AIDs. Suppression of inflammation, accompanied by increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, is observed both due to immunization of animals with microbial Hsp70 and higher content of intrinsic intracellular Hsp70 [30]. The anti-inflammatory activity of a number of Hsp is to protect immune competent cells against apoptosis due to blockade of the initial pathways of its development. It is believed that increased amounts of Hsp by tumor cells prevent the initiation of apoptosis in response to stressors [33, 48].

It is important that Hsp is related to the re-profiling of the functional status of DCs: the transition from immune to tolerogenic. This transformation of DCs occurs under the action of some organic food compounds, in particular carvacrol, present in the essential oils of oregano, bergamot and thyme [1]. It was found that these compounds were able to increase the level of endogenous Hsp70 and to induce the production of functionally complete T_{reg} . Hsp70 proteins play an important role in the induction of DCs tolerance and stimulation of the T-regulatory component of immunity as more important in the treatment of AIDs. Tolerogenic DCs are already used in clinical practice for the treatment of various AIDs, in particular arthritis [54, 58]. Therefore, it is important to assess the content of cytosolic Hsp70 in DCs derived from cryopreserved mononuclear cells.

It is known that in cryopreserved cells (monocytes, mononuclear cells, DCs of different degrees of maturity) under the influence of low and ultralow temperatures can develop cascade reactions that affect the genomic and postgenomic profiles of different types of human and animal cells [3, 14]. R. Morimoto and M. Santoro found an increase in frozen-thawed fibroblasts in the expression of



кувати продукцію функціонально повноцінних Трег. Білки Hsp70 відіграють важливу роль в індукції толерантності ДК і стимуляції Т-регуляторної ланки імунітету як важливішої у лікуванні АІЗ. У клінічній практиці для лікування різних АІЗ, зокрема артриту, вже використовуються толерогенні ДК [54, 58]. У зв'язку з цим актуальною є оцінка вмісту цитозольних Hsp70 у ДК, отриманих із кріоконсервованих мононуклеарів.

Відомо, що в кріоконсервованих клітинах (моноцитах, мононуклеарах, ДК різного ступеня зрілості) під впливом низьких і ультранизьких температур можуть розвиватися каскадні реакції, що впливають на стан геномного і постгеномного профілів різних видів клітин людини і тварин [9, 18]. R. Morimoto і M. Santoro встановили підвищення у деконсервованих фібробластах експресії мРНК ростових факторів (судинного ендотеліального (VEGF) і тромбоцит-продукованого (PDGF)), що розглядалося як компенсаторний механізм, який сприяє репарації можливих пошкоджень у клітинах після кріоконсервування [38]. У той самий час активація транскрипції ряду каспаз, залучених до процесу апоптозу вже в першу добу після відтавання кріоконсервованих фібробластів приводила до знищення нездатних до репарації клітин [9].

K. Desai та співавт. [16] показали істотне зниження експресії *sox2* і *sox3* генів в ембріонах *Danio rerio* вже після охолодження до 0°C, тобто температури, яка вважається стресорною для даного виду біооб'єкта. Подальше відігрівання зразків до фізіологічної для ембріонів *Danio rerio* температури (28°C) викликало короткочасну суперекспресію генів *sox3* і *sox19*, яка може бути результатом компенсаторних механізмів підтримки гомеостазу після втрати частини транскриптів генів у період охолодження [18]. Зниження експресії stemness-генів *nanog*, *oct4*, *sox2* було відзначено в клітинах аденокарциноми Ерліха безпосередньо після кріоконсервування [22]. Кріоконсервування викликало максимальну інгібіцію експресії гена *sox2*, мінімальну – *nanog*. Вплив кріоконсервування на рівень експресії різних генів може залежати як від діапазону низьких температур, так і від типу клітин. M. Francois та співавт. [17] показали зниження рівня експресії мРНК гена *ido* в мезенхімальних стовбурових клітинах приблизно в 4 рази порівняно з контролем відразу після розморожування і відновлення через 24 години наступного культивування. Це супроводжувалося нормалізацією рівня експресії ферменту IDO у відповідь на стимуляцію IFN- γ .

Як було згадано вище, в індукції толерогенної функції ДК важливу роль відіграє транскрип-

mRNA growth factor (vascular endothelial (VEGF) and platelet-produced (PDGF)), which was considered a compensatory mechanism that promotes the repair of possible damage to cells after cryopreservation [38]. At the same time, the activation of the transcription of a number of caspases involved into apoptosis on the first day after warming of cryopreserved fibroblasts led to the destruction of non-repairable cells [3].

K. Desai *et al.* [12] showed a significant decrease in the expression of *sox2* and *sox3* genes in *Danio rerio* embryos after cooling to 0°C, *i. e.* the temperature that is considered stressful for this species. Further warming of the samples to physiological temperature (28°C) for *Danio rerio* embryos caused a short-term overexpression of the *sox3* and *sox19* genes, which may result from compensatory mechanisms to maintain homeostasis after loss of some gene transcripts during cooling [14]. Decreased expression of *nanog*, *oct4*, *sox2* stemness genes was observed in Ehrlich carcinoma cells immediately after cryopreservation [19]. Cryopreservation caused the maximum inhibition of *sox2* gene expression, and the minimum one of *nanog*. The effect of cryopreservation on the expression rate of various genes may depend on the range of low temperatures and cell type. M. Francois *et al.* [13] showed a decrease in the expression rate of mRNA of the *ido* gene in mesenchymal stem cells by about 4 times compared with the control immediately after warming and recovery after 24 hours of subsequent cultivation. This was accompanied by normalization of the expression rate of the IDO enzyme in response to stimulation of IFN- γ .

As mentioned above, the transcription factor GILZ plays an important role in the induction of tolerogenic DCs function, the expression of which inhibits the maturation and realization of antigen-presenting DCs function [15, 42, 55]. The question remains: whether cryopreservation can alter GILZ expression? Surely, cryopreservation has the ability to activate/inhibit the expression of genes and structures of the postgenomic cascade that are responsible for the GILZ production and participate in the formation of tolerogenic phenotype of DCs.

Thus, autologous cell therapy, which is able to restore the tolerogenic profile of the organism, is a promising alternative therapeutic approach, as the use of traditional immune modulatory and immune suppressive products causes severe side effects. An important role in AIDs immunotherapy belongs to autologous tolerogenic DCs, which are currently being tested in phases I and II of diseases to develop an effective therapy capable of eliminating the inflammations without compromising immunity.



ційний фактор GILZ, збільшення експресії якого пригнічує дозрівання і реалізацію антиген-презентуючої функції ДК [19, 42, 55]. Цікавим залишається питання, чи може кріоконсервування змінювати експресію GILZ. Безумовно, кріоконсервування має здатність активувати/пригнічувати експресію генів і структур постгеномного каскаду, які відповідають за продукцію GILZ та беруть участь у формуванні толерогенного фенотипу ДК.

Таким чином, аутологічна клітинна терапія, яка здатна відновити толерогенний профіль організму, є перспективним альтернативним терапевтичним підходом, оскільки застосування традиційних імуномодуляторів та імуносупресивних препаратів викликає важкі побічні ефекти. Важлива роль в імунотерапії АІЗ належить аутологічним толерогенним ДК, які на даний час тестуються на I і II фазах захворювань з метою розроблення ефективної терапії, здатної анулювати запальні процеси без шкоди для імунітету.

Основними джерелами отримання ДК є моноцити або мононуклеари периферичної крові та кісткового мозку, тому триває пошук ефективних методів їх заморожування з подальшою генерацією *ex vivo* ДК із толерогенним потенціалом для адоптивного застосування при аутоімунних захворювань.

Література

1. Белоглазов ВА, Лугачев БИ. Молекулярные механизмы роли Толл-подобных рецепторов 4-го типа и убиквитин-модифицирующего фермента A 20 в патогенезе бронхиальной астмы. Иммунология. 2019; 40 (1): 62–7.
2. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, та ін. Обґрунтування адоптивного застосування толерогенних дендритних клітин в терапії ревматоїдного артриту у мишей. Клітинна та органна трансплантологія. 2019; 7 (2):125–31.
3. Гольцев АМ, Калиниченко ТО. Ствобурові клітини пуповинної крові: клінічне застосування аlogenного матеріалу, проблеми та перспективи банківського зберігання. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30(3): 213–35.
4. Гольцев АМ, Сафранчук ОВ, Бондарович МО, Останков МВ. Зміна кріолабільності ствобурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми. Фізіологічний журнал. 2011; 57(4): 68–76.
5. Гольцев АМ, Фуллер Б.Дж, Бондарович МО, та ін. COVID-19 – потенційна мішень для кріобіології та кріомедицини. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30 (2): 107–31.
6. Черешнев ВА, Гусев ЕЮ. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления. Медицинская иммунология. 2012; 14 (1–2): 9–20.
7. Alinkina ES, Misharina TA, Fatkullina LD. Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2013; 49 (1): 82–7.

The main sources of DCs are either monocytes or mononuclear cells of peripheral blood and bone marrow, so the search for effective ways to freeze them with subsequent DCs *ex vivo* generation with tolerogenic potential for adoptive treatment of autoimmune diseases is underway.

References

1. Alinkina ES, Misharina TA, Fatkullina LD. Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2013; 49 (1): 82–7.
2. Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. The FASEB Journal. 2012; 26: 4805–20.
3. Baust J, Van Buskirk R, Baust G. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2000; 36 (4): 262–70.
4. Beloglazov VA, Lugachov BI. [Molecular mechanisms of the role of Toll-like 4 receptors and ubiquitin editing enzyme A 20 in the pathogenesis of bronchial asthma]. Immunology. 2019; 40 (1): 62–7. Russian.
5. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. Front Immunol [internet]. 2012 May 4 [cited Dec 09 2020]; 3: 95. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00095/full>
6. Buhl T, Legler TJ, Rosenberger A, et al. Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2012; 61 (11): 2021–31.
7. Byoungjae K, Kim TH. Fundamental role of dendritic cells in inducing Th2 responses. Korean J Intern Med 2018; 33: 483–9.
8. Chereshnev VA, Gusev EYu. [Immunological and pathophysiological mechanisms of systemic inflammation]. Med Immunol. 2012; 14 (1–2): 9–20. Russian.
9. Cannarile L, Delfino DV, Adorisio S, et al. Implicating the role of GILZ in glucocorticoid modulation of T-cell activation. Front Immunol [internet]. 2019 Aug 7 [cited Dec 09 2020]; 10: 1823. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01823/full>
10. Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from *ex vivo* to *in vivo* strategies. Front Immunol [internet]. 2020 May 14 [cited Nov 10 2020]; 11: 674. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00674/full>
11. De Loecker P, Fuller BJ, De Loecker W. The effects of cryopreservation on protein synthesis and membrane transport in isolated rat liver mitochondria. Cryobiology. 1991; 28(5): 445–53.
12. Desai K, Spikings E, Zhang T. Use of methanol as cryoprotectant and its effect on sox genes and proteins in chilled zebrafish embryos. Cryobiology. 2015; 71(1): 1–11.
13. François M, Copland IB, Yuan S, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. Cytotherapy. 2012; 14(2): 147–52.



8. Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *The FASEB Journal*. 2012; 26: 4805–20.
9. Baust J, Van Buskirk R, Baust G. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2000; 36 (4): 262–70.
10. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* [internet]. 2012 May 4 [cited Dec 09 2020]; 3: 95. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00095/full>.
11. Buhl T, Legler TJ, Rosenberger A, et al. Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61 (11): 2021–31.
12. Byoungjae K, Kim TH. Fundamental role of dendritic cells in inducing Th2 responses. *Korean J Intern Med* 2018; 33: 483–9.
13. Cannarile L, Delfino DV, Adorisio S, et al. Implicating the role of GILZ in glucocorticoid modulation of T-cell activation. *Front Immunol* [internet]. 2019 August 7 [cited Dec 09 2020]; 10: 1823. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01823/full>.
14. Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from *ex vivo* to *in vivo* strategies. *Front Immunol* [internet]. 2020 May 14 [cited Nov 10 2020]; 11: 674. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00674/full>.
15. De Loecker P, Fuller BJ, De Loecker W. The effects of cryopreservation on protein synthesis and membrane transport in isolated rat liver mitochondria. *Cryobiology*. 1991; 28 (5): 445–53.
16. Desai K, Spikings E, Zhang T. Use of methanol as cryoprotectant and its effect on sox genes and proteins in chilled zebrafish embryos. *Cryobiology*. 2015; 71(1): 1–11.
17. François M, Copland IB, Yuan S, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy*. 2012; 14(2): 147–52.
18. Fuller BJ. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. *CryoLetters*. 2003; 24 (2): 95–102.
19. García-González PA, Schinnerling K, Sepúlveda-Gutiérrez A, et al. Dexamethasone and monophosphoryl lipid A induce a distinctive profile on monocyte-derived dendritic cells through transcriptional modulation of genes associated with essential processes of the immune response. *Front Immunol* [internet]. 2017 Oct 23 [cited Nov 02 2020]; 8: 1350. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01350/full>.
20. Ghanekar SA, Bhatia S, Ruitenberg JJ, et al. Phenotype and *in vitro* function of mature MDDC generated from cryopreserved PBMC of cancer patients are equivalent to those from healthy donors. *J Immune Based Ther Vaccines* [internet]. 2007 May 3 [cited Nov 02 2020]; 5: 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868730/pdf/1476-8518-5-7.pdf>
21. Goltsev AN, Babenko NN, Dubrava TG, et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation. *Intern J Refrigeration*. 2006; 29 (3): 358–67.
22. Goltsev A, Babenko N, Gaevska Yu, et al. Change of expression of tumor cell pluripotency genes after cryopreservation. *Cryobiology*. 2020; 97: 289.
23. Goltsev AN, Kozlova YuA, Dubrava TG, et al. Cryopreservation as a method regulating functional potential of bone marrow hemopoietic stem cells in experimental autoimmune pathology. *Cell preservation technology*. 2007; 5 (1): 33–40.
24. Goltsev AN, Lutsenko ED, Dimitrov AY, et al. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation. *Cryoletters*. 2011; 32(6): 543–44.
25. Fuller BJ. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. *CryoLetters*. 2003; 24 (2): 95–102.
26. García-González PA, Schinnerling K, Sepúlveda-Gutiérrez A, et al. Dexamethasone and monophosphoryl lipid A induce a distinctive profile on monocyte-derived dendritic cells through transcriptional modulation of genes associated with essential processes of the immune response. *Front Immunol* [internet]. 2017 Oct 23 [cited Nov 02 2020]; 8: 1350. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01350/full>.
27. Hayden H, Friedl J, Dettke M, et al. Cryopreservation of monocytes is superior to cryopreservation of immature or semi-mature dendritic cells for dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunother*. 2009; 32(6): 638–54.
28. Hol'tsev AM, Safranchuk OV, Bondarovykh MO, Ostankov MV. [Change in cryolability of tumor stem cells depending on growth phase of Ehrlich adenocarcinoma *in vivo*]. *Fiziol Zh*. 2011; 57 (4): 68–76. Ukrainian.
29. Hori S, Heike Y, Takei M, et al. Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional



25. Goltsev AN, Porozhan IaA, Babenko NN, Ostankov MV. Cryopreservation of fetal neural cells. Refrigeration science and technology. 2014; 1: 201–6.
26. Gueguen C, Bouley J, Moussu H, et al. Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 137(2): 545–58.
27. Haddock R, Lin-Gibson S, Lumelsky N, et al. Manufacturing cell therapies: the paradigm shift in health care of this century. NAM Perspectives. Discussion Paper. National Academy of Medicine, Washington, DC [internet]. 2017 June 23 [cited Dec 09 2020]. Available from: <https://nam.edu/manufacturing-cell-therapies-the-paradigm-shift-in-health-care-of-this-century/>
28. Hayden H, Friedl J, Dettke M, et al. Cryopreservation of monocytes is superior to cryopreservation of immature or semi-mature dendritic cells for dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunother*. 2009; 32(6): 638–54.
29. Hori S, Heike Y, Takei M, et al. Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14⁺ monocytes. *J Immunother*. 2004 ; 27(1): 27–35.
30. Jansen MAA, Spiering R, Broere F, et al. Targeting of tolerogenic dendritic cells towards heat-shock proteins: a novel therapeutic strategy for autoimmune diseases? *Immunology*. 2018; 153(1): 51–9.
31. Makino M, Baba M. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scand J Immunol*. 1997; 45(6): 618–22.
32. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010; 108: 111–65.
33. Martine P, Chevriaux A, Derangère V, et al. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death Dis* [internet]. 2019 March 15 [cited Dec 09 2020]; 10(4): 256. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1491-7>
34. Mbongue JC, Nicholas DA, Torrez TW, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in immune suppression and autoimmunity. *Vaccines*. 2015; 3: 703–29.
35. Meijerink M, Ulluwishewa D, Anderson RC, Wells JM. Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. *J Immunol Methods*. 2011; 373(1–2): 136–42.
36. Mendoza L, Bubeník J, Indrová M, et al. Freezing and thawing of murine bone marrow-derived dendritic cells does not alter their immunophenotype and antigen presentation characteristics. *Folia Biol (Praha)*. 2002; 48(6): 242–5.
37. Messmer D, Hatsukari I, Hitosugi N, et al. Morphine reciprocally regulates IL-10 and IL-12 production by monocyte-derived human dendritic cells and enhances T cell activation. *Mol Med*. 2006; 12(11–12): 284–90.
38. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol*. 1998; 16(9): 833–8.
39. Munawara U, Perveen K, Small AG, et al. Human dendritic cells express the complement receptor immunoglobulin which regulates T cell responses. *Front Immunol* [internet]. 2019 Dec 10 [cited Dec 06 2020]; 10: 2892. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02892/full>
40. Navarro-Barriuso J, Mansilla MJ, Martínez-Cáceres EM. Searching for the transcriptomic signature of immune tolerance induction-biomarkers of safety and functionality for tolerogenic dendritic cells and regulatory macrophages. *Front Immunol* [internet]. 2018 Sep 19 [cited Dec 02 2020]; 9: 2062. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02062/full>
41. Radhakrishnan AK, Sim GC, Cheong SK. Comparing the ability of freshly generated and cryopreserved dendritic cell vaccines development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14⁺ monocytes. *J Immunother*. 2004; 27(1): 27–35.
42. Jansen MAA, Spiering R, Broere F, et al. Targeting of tolerogenic dendritic cells towards heat-shock proteins: a novel therapeutic strategy for autoimmune diseases? *Immunology*. 2018; 153(1): 51–9.
43. Makino M, Baba M. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scand J Immunol*. 1997; 45(6): 618–22.
44. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010; 108: 111–65.
45. Martine P, Chevriaux A, Derangère V, et al. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death Dis* [internet]. 2019 March 15 [cited Dec 09 2020]; 10: 256. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1491-7>
46. Mbongue JC, Nicholas DA, Torrez TW, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in immune suppression and autoimmunity. *Vaccines*. 2015; 3: 703–29.
47. Meijerink M, Ulluwishewa D, Anderson RC, Wells JM. Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. *J Immunol Methods*. 2011; 373(1–2): 136–42.
48. Mendoza L, Bubeník J, Indrová M, et al. Freezing and thawing of murine bone marrow-derived dendritic cells does not alter their immunophenotype and antigen presentation characteristics. *Folia Biol (Praha)*. 2002; 48(6): 242–5.
49. Messmer D, Hatsukari I, Hitosugi N, et al. Morphine reciprocally regulates IL-10 and IL-12 production by monocyte-derived human dendritic cells and enhances T cell activation. *Mol Med*. 2006; 12(11–12): 284–90.
50. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol*. 1998; 16(9): 833–8.
51. Munawara U, Perveen K, Small AG, et al. Human dendritic cells express the complement receptor immunoglobulin which regulates T cell responses. *Front Immunol* [internet]. 2019 Dec 10 [cited Dec 06 2020]; 10: 2892. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02892/full>
52. Navarro-Barriuso J, Mansilla MJ, Martínez-Cáceres EM. Searching for the transcriptomic signature of immune tolerance induction-biomarkers of safety and functionality for tolerogenic dendritic cells and regulatory macrophages. *Front Immunol* [internet]. 2018 Sept 19 [cited Dec 02 2020]; 9: 2062. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02062/full>
53. Radhakrishnan AK, Sim GC, Cheong SK. Comparing the ability of freshly generated and cryopreserved dendritic cell vaccines to inhibit growth of breast cancer in a mouse model. *Biores Open Access*. 2012; 1(5): 239–46.
54. Ronchetti S, Migliorati G, Riccardi C. GILZ as a mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Front Endocrinol (Lausanne)* [internet]. 2015 Nov 09 [cited Dec 02 2020]; 6: 170. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2015.00170/full>
55. Sauter A, Yi DH, Li Y, Roersma S, Appel S. The culture dish surface influences the phenotype and cytokine production of human monocyte-derived dendritic cells. *Front Immunol* [internet]. 2019 Oct 02 [cited Dec 20 2020]; 10: 2352. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02352/full>
56. Sesti-Costa R, Mendes de Moraes-Vieira PM, Cervantes-Barragan L. Dendritic cells: immune response in infectious diseases and autoimmunity mediators of inflammation.



- to inhibit growth of breast cancer in a mouse model. *Biores Open Access*. 2012; 1(5) : 239–46.
42. Ronchetti S, Migliorati G, Riccardi C. GILZ as a mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Front Endocrinol (Lausanne)* [internet]. 2015 Nov 09 [cited Dec 02 2020]; 6: 170. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2015.00170/full>
 43. Sauter A, Yi DH, Li Y, Roersma S, Appel S. The culture dish surface influences the phenotype and cytokine production of human monocyte-derived dendritic cells. *Front Immunol* [internet]. 2019 Oct 02 [cited Dec 20 2020]; 10: 2352. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02352/full>.
 44. Sesti-Costa R, Mendes de Moraes-Vieira PM, Cervantes-Barragan L. Dendritic cells: immune response in infectious diseases and autoimmunity mediators of inflammation. *Mediators Inflamm.* [internet]. 2020 March 20 [cited Dec 20 2020]; 2020: 294852. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2020/294852/>.
 45. Sevilla LM, Pérez P. Glucocorticoids and glucocorticoid-induced-leucine-zipper (GILZ) in psoriasis. *Front Immunol* [internet]. 2019 Sept 13 [cited Oct 15 2020]; 10: 2220. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02220/full>.
 46. Schülke S. Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Front Immunol* [internet]. 2018 March 19 [cited Oct 02 2020]; 9: 455. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00455/full>.
 47. Shaik S, Hayes D, Gimble J, Devireddy R. Inducing heat shock proteins enhances the stemness of frozen-thawed adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. 2017; 26(8): 608–16.
 48. Shevtsov M, Huile G, Multhoff G. Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. *Phil Trans R Soc B* [internet]. 2017 Dec 04 [cited Dec 07 2020]; 373: 20160526. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rstb.2016.0526>.
 49. Silveira GF, Wowk PF, Machado AM, et al. Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PLoS One* [internet]. 2013 Jul 31 [cited Dec 07 2020]; 8(7): e71291. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071291>
 50. Stocki P, Dickinson AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis* [internet]. 2012 Dec 17 [cited Dec 07 2020]; 2012: 617213. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2012/617213/>
 51. Suwandi JS, Nikolic T, Roep BO. Translating mechanism of regulatory action of tolerogenic dendritic cells to monitoring endpoints in clinical trials. *Front Immunol* [internet]. 2017 Nov 22 [cited Dec 07 2020]; 8: 1598. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01598/full>
 52. Taylor MJ, London NJ, Thirdborough SM, et al. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing. *Cryobiology*. 1990; 27(3): 269–78.
 53. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*. 1974; 84(3): 389–98.
 54. Tukaj S, Kaminski M. Heat shock proteins in the therapy of autoimmune diseases: too simple to be true? *Cell Stress Chaperones*. 2019; 24(3): 475–79.
 55. Vétillard M, Schlecht-Louf G. Glucocorticoid-induced leucine zipper: fine-tuning of dendritic cells function. *Front Immunol* [internet]. 2018 Jun 4 [cited Dec 07 2020]; 9: 1232. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01232/full>
 56. Wang L, Huckelhoven A, Hong J, et al. Standardization of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells through a resting process for clinical immunomonitoring- development of an algorithm. *Cytometry*. 2016; 89(3): 246–58.
 57. Westermann J, Körner IJ, Kopp J, et al. Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52(3): 194–8.
 58. Wieten L, Vander ZR, Spiering R, et al. A novel heat-shock protein coinducer boosts stress protein Hsp70 to activate T cell regulation of inflammation in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 1026–35.
 59. Yurinskaya MM, Kochetkova OY, Shabarchina LI, et al. Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNF α in human phagocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2017; 22(1): 163–71.



57. Westermann J, Körner IJ, Kopp J, et al. Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52(3): 194–8.
58. Wieten L, Vander ZR, Spiering R, et al. A novel heat-shock protein coinducer boosts stress protein Hsp70 to activate T cell regulation of inflammation in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 1026–35.
59. Yurinskaya MM, Kochetkova OY, Shabarchina LI, et al. Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNF α in human phagocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2017; 22(1): 163–71.
60. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* [internet]. 2019 Feb 26 [cited Dec 07 2020]; 10: 68. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1165-5>.

