

УДК 611.018.5:618.48]:57.086.132

А.М. Гольцев*, О.Д. Луценко, Л.В. Останкова, М.О. Бондарович,
М.В. Останков, Л.В. Сокіл, І.Г. Гриша, Л.Г. Чернишенко

Сучасні підходи і перспективи методів ліофілізації ядерних клітин кордової крові людини

UDC 611.018.5:618.48]:57.086.132

A.M. Goltsev*, O.D. Lutsenko, L.V. Ostankova, M.O. Bondarovich,
M.V. Ostankov, L.V. Sokil, I.H. Grisha, L.G. Chernyshenko

Modern Approaches and Perspectives of Human Cord Blood Nucleated Cells' Freeze-Drying

Реферат: В огляді узагальнено дані щодо перспектив застосування ліофілізації як методичного підходу до збереження структурно-функціональних характеристик з метою довгострокового зберігання лейкоконцентрату кордової крові людини (ЛККЛ). Показано переваги методу ліофілізації порівняно з низькотемпературним зберіганням, природнім або тепловим висушуванням. Розглянуто питання впливу фізико-хімічних факторів, які реалізуються на етапі ліофілізації, на структурно-функціональні характеристики клітин ЛККЛ. Обговорюється важливість таких чинників, як-от концентрація клітин, умови зберігання, залишкова вологість у забезпеченні збереження ліофілізованого матеріалу. У роботі проаналізовано дані щодо використання ліопротекторів та антиоксидантів в умовах ліофілізації та обговорюються питання безпеки використання методів доставлення ліопротекторів відносно геномного профілю клітин.

Ключові слова: лейкоконцентрат кордової крові людини, ліофілізація, ліопротектори, антиоксиданти.

Abstract: The review summarizes data on the prospects of using lyophilization as a methodical approach to preserve structure and functions for a long-term storage of human cord blood leukoconcentrate (HCBL). The advantages of the freeze-drying compared to low-temperature storage, natural or thermal drying have been shown. The question of the impact of physical and chemical factors, which are implemented at the stage of lyophilization, on structure and functions of HCBL cells has been considered. The importance of such factors as cell concentration, storage conditions, residual moisture in ensuring the preservation of lyophilized material was disputed. The paper analyzes the data on the use of lyoprotectants and antioxidants during freeze-drying as well as discusses the safety of using lyoprotectant delivery methods in relation to the genomic profile of cells.

Key words: leukoconcentrate of human cord blood, freeze-drying, lyoprotectants, antioxidants.

Кордова (пуповинна) кров людини (ККЛ) завдяки своїм унікальним властивостям знайшла широке застосування в клінічній практиці під час лікування багатьох захворювань [7, 99]. Існує думка, що ККЛ за своїми структурно-функціональними характеристиками є проміжною ланкою між продуктами ембріофетоплацентарного комплексу і компонентами дорослого організму людини [7]. Для ККЛ властива мінорна імуногенність, високий вміст стовбурових клітин різного ступеня потентності (стовбурові кровотвірні клітини (СКК), мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) тощо) та комітованих клітин-попередниць [59], наявність збалансованого комплексу біологічно активних речовин (БАР).

Due to its unique properties, human cord (umbilical) blood has been widely used in clinical practice during the treatment of many diseases [30, 99]. There is an opinion that human cord blood (HCB) by its structural and functional traits, is an intermediate link between the products of the embryo-fetoplacental complex and the adult human body component [30]. HCB is characterized by minor immunogenicity, a high content of stem cells of various potency degrees (hematopoietic stem cells (HSCs), mesenchymal stem cells (MSCs), etc.) and committed progenitor cells [54], the presence of a balanced combination of biologically active substances (BAS). An important issue is the absence of ethical

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

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

*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

*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

Надійшла 22.09.2022
Прийнята до друку 08.11.2023

Received 22, September, 2022
Accepted 08, November, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Важливою характеристикою ККЛ є відсутність етичних проблем під час отримання цього біоматеріалу. У клінічній практиці використовують як цільну ККЛ, так і виділені з неї еритроцити, клітини лімфоїдного ряду, формені елементи стовбурового компартмента, а також плазму та сироватку [70]. Відомо, що застосування ККЛ та її компонентів для корекції імунозапальних процесів приводить до зниження їх вираження та нормалізації показників імунного статусу [5, 13, 92]. Показано, що лейкоконцентрат ККЛ (ЛККЛ), збагачений СКК та комітованими клітинами-попередницями, активізує процеси регенерації в умовах тканинної гіпоксії, викликаної порушенням мікроциркуляції [42], покращує утилізацію кисню та сприяє відновленню системи антиоксидантного захисту під час лікування ішемічного інсульту [14]. У деяких роботах [1, 51] наводяться дані про те, що виділені з ККЛ стовбурові кровотвірні клітини застосовують як довгоживучі трансплантати у пацієнтів після променевої та хіміотерапії.

Важливою умовою успішного застосування ККЛ та її компонентів в експериментальній роботі та клінічній практиці є забезпечення умов тривалого зберігання біоматеріалу у життєздатному стані та можливості його використання за необхідності. Наразі для цього використовуються різні методичні підходи — низькотемпературне зберігання, ліофілізація, природне і теплове висушування.

Для створення запасів замороженої ККЛ та її компонентів у світі існують низькотемпературні банки цього матеріалу [6, 27, 45]. Проблемою зберігання ККЛ у низькотемпературному банку за умов ультранизких температур (-196°C) є необхідність використання дорогого обладнання та рідкого азоту. При цьому виникають стрибки температури та ризик перехресної контамінації [23, 82].

В останнє десятиліття у науковій літературі активно обговорюється тема ліофілізації біологічних об'єктів [38], зокрема і ККЛ [17]. Ліофілізація може бути перспективним методом довгострокового та економічного зберігання біоматеріалу, зокрема клітинної суспензії ЛККЛ. Ця технологія дозволяє зберігати ліофілізовані зразки в умовах холодильника при $4-8^{\circ}\text{C}$, а також нетривалий проміжок часу за кімнатної температури (до 25°C), що може спростити зберігання і транспортування зразків, знизити матеріальні витрати. Водночас застосування цієї технології вимагає перегляду наявних протоколів ліофілізації ЛККЛ з метою підвищення збереження клітин. Для цього необхідне більш глибоке розуміння процесів, які забезпечують збере-

problems when obtaining this biomaterial. In clinical practice, both whole HCB and erythrocytes isolated from it, the lymphoid cells, formed elements of the stem compartment, as well as plasma and serum are used [66]. The use of HCB and its components to correct immune inflammation is known to decrease their expression and normalization of immune status indices [34, 53, 91]. It has been shown that HCB leukoconcentrate (HCBL), enriched with HSCs and committed progenitor cells, activates regeneration under tissue hypoxia caused by microcirculation disturbance [29], improves oxygen utilization and promotes restoration of the antioxidant defense system during the ischemic stroke treatment [55]. Some publications [2, 45] provide the data that hematopoietic stem cells isolated from HCB are used as long-lived transplants in the patients after radiation and chemotherapy.

An important condition for the successful use of HCB and its components in experiments and clinical practice is to ensure the conditions for long-term storage of biomaterial in a viable state and the possibility of its usage if necessary. Currently, various methodical approaches are applied with this purpose, namely, low-temperature storage, freeze-drying, natural and thermal drying.

To create the stocks of frozen HCB and its components, there are low-temperature banks of this material in the world [35, 14, 39]. The problem of the HCB storage at a low-temperature bank at ultra-low temperatures (-196°) is the need to use expensive equipment and liquid nitrogen. At the same time, there are temperature jumps and the risk of cross-contamination [10, 80].

In the last decade, the topic of freeze-drying of biological objects [25], in particular HCB [89], has been actively discussed in the scientific literature. Lyophilization can be a promising method of long-term and economic storage of biomaterial, in particular, cell suspension for HCBL. This technique enables to store the frozen-dried samples in a freezer at $4-8^{\circ}\text{C}$, as well as for a short period of time at room temperature (up to 25°C), that can simplify the storage and transportation of samples, reduce material costs. At the same time, the application of this technique requires a revision of the existing protocols of HCBL lyophilization to improve the cell preservation. With this aim, there is a need in a deeper understanding of the processes that ensure the preservation of the structure and functions of the HCBL cells in freeze-drying during their dehydration, as well as during the long-term storage in a lyophilized form, taking into account the terms and conditions.



ження структурно-функціональних характеристик клітин ЛККЛ в умовах ліофілізації під час їх зневоднення, а також у процесі тривалого зберігання у ліофілізованому вигляді з урахуванням термінів та умов.

Використання методів природного та теплого висушування призводить до значних стресорних впливів на клітини, що пов'язано зі зміною їх об'єму, осмотичним тиском, зморщуванням мембранних органел, зміною активності ферментів, збільшенням концентрації солей, зміною в'язкості клітин та синтезом стрес-білків [19]. Тому застосування даних підходів зумовлює необхідність проведення додаткових експериментальних досліджень перед їх можливим практичним застосуванням.

Короткий аналіз сучасних способів переведення клітин ККЛ в ангідробіоз шляхом ліофілізації або природної та теплової дегідратації

Високий функціональний потенціал і затребуваність ККЛ у біотехнологіях і клітинній терапії передбачає наявність постійних її запасів, що може бути забезпечене за рахунок використання клітин у стані ангідробіозу шляхом переведення їх в зневоднений стан. Для цього можливе застосування різних технологічних підходів висушування — із замороженого стану (ліофілізація) або шляхом природної чи теплової дегідратації.

Ліофілізація здійснюється в два етапи: первинна сушка (сублімація) із замороженого стану та вторинна сушка (досушування).

Первинна сушка проходить у середовищі, близькому до вакууму, після заморожування біооб'єкта при $-10...-70^{\circ}\text{C}$ [2]. Цей технологічний етап дозволяє стабілізувати структуру клітин та суттєво збільшити термін їх зберігання. Видалення води з біооб'єкта на цьому етапі відбувається в камері субліматора за температури й тиску нижче її потрійної (нонваріантної) точки, тобто $0,0098^{\circ}\text{C}$ та 4,6 мм рт. ст. (610,6 Па). Сублімація починається після того, як зразок перейде у склоподібний стан за рахунок підведення до біооб'єкта енергії для компенсації питомої теплоти плавлення. Рушійною силою сублімаційного сушіння є різниця парціальних тисків пари у поверхні матеріалу та навколишньому середовищі [79].

Етап вторинної сушки характеризується скороченням інтенсивності вологовиділення. Цей етап поділяють на дві фази. Перша — це випаровування незамороженої води, коли ще весь лід сублімувався в матеріалі. Друга фаза починається з моменту видалення всієї замороженої

The use of natural and thermal drying methods leads to significant stressful effects on cells, that is associated with a change in their volume, osmotic pressure, shrinkage of membrane organelles, a change in the activity of enzymes, a rise in the concentration of salts, a change in the viscosity of cells and the synthesis of stress proteins [4]. Therefore, the use of these approaches necessitates additional experimental studies before their possible practical application.

Brief analysis of modern methods of transferring HCB cells to anhydrobiosis by lyophilization or natural and thermal dehydration

The high functional potential and demand of HCB in biotechnologies and cell therapy presupposes the availability of its constant reserves, that can be ensured by using cells in a state of anhydrobiosis by transferring them to a dehydrated state. For this purpose, it is possible to use different technological approaches of drying, *i. e.* from a frozen state (lyophilization) or by natural or thermal dehydration.

Lyophilization is carried out in two stages: primary drying (sublimation) from the frozen state and secondary drying (drying itself). Primary drying takes place in an environment close to vacuum, after freezing the biological object at $-10...-70^{\circ}\text{C}$ [3]. This technological stage allows the stabilization of the cell structure and significantly increase their shelf life. At this stage water is removed from the biological object in the sublimator chamber at a temperature and pressure below its triple (nonvariant) point, *i. e.* 0.0098°C and 4.6 mmHg (610.6 Pa). Sublimation begins after the sample changes to a vitreous state due to the energy supply to the bioobject to compensate for the specific heat of fusion. The driving force of sublimation drying is the difference in the partial pressures of the steam at the material surface and the surrounding environment [76].

The stage of secondary drying is characterized by a reduced intensity of moisture release. This stage is divided into two phases. The first is the evaporation of unfrozen water, when all the ice was sublimated in the material. The second phase begins with the removal of all frozen and unfrozen water. Up to this point, the product is a material with the pores released of ice and a highly branched structure of the dry skeleton [9].

A specific value in freeze-drying of cell suspensions is attributed to the drying temperature. S.S. Buchanan *et al.* [15] reported that the tempe-



та незамороженої води. До цього моменту продукт являє собою матеріал з порами, що звільнилися від льоду, і дуже розгалуженою структурою сухого скелета [4].

Важливе значення в умовах ліофілізації клітинних суспензій приділяється температурі досушування. У роботі S.S. Buchanan та співавт. [28] показано, що температура, за якої проводилось досушування, суттєво вплинула на колонієутворюючу активність клітин ККЛ. Так, було встановлено, що застосування досушування ККЛ при 5°C призводило до зниження показника формування колоній — BFU-E (burst-forming unit-erythroid, бурстутворююча одиниця еритроцитів) і CFU-GM (colony-forming unit — Granulocyte Monocyte, колонієутворююча одиниця гранулоцитів і моноцитів) у 1,86 та 1,22 рази відповідно порівняно зі свіжовиділеними клітинами. При більш високих температурах досушування (10, 15 і 20°C), спостерігається більш виражене зниження кількості колоній: BFU-E у 1,87–1,9 разів, CFU-GM — у 1,57–1,86 разів.

Порушення структурно-функціонального потенціалу клітин ЛККЛ після ліофілізації обумовлює необхідність удосконалення самої методології та методичних підходів реалізації ліофільної сушки. У цьому може допомогти детальніший розгляд вироблених у процесі еволюційного розвитку живої природи захисно-адаптаційних реакцій організмів в умовах дефіциту води. Відомо, що в таких умовах у рослин та нижчих тварин розвивається стан ангідробіозу, що трактується як форма спокою тварин, за якої тимчасово відсутні зовнішні прояви життя, зменшується метаболізм, затримується розвиток. Такі організми повертаються у фізіологічний стан протягом кількох хвилин чи годин після появи у середовищі води [56]. Здатність до ангідробіозу була виявлена в різних таксонах, включаючи бактерії, дріжджі, безхребетних тварин та рослин [31]. У цих біооб'єктах у процесі переходу до стану ангідробіозу відзначається накопичення таких цукрів, як трегалоза або сахароза [24]. У сухому стані ці цукри утворюють високов'язку склоподібну масу, яка необхідна для стабілізації клітинних мембран [37]. Показано, що ангідробіоти для перебування у висушеному стані використовують різні захисні білки, наприклад, білки пізнього ембріогенезу (LEA-білки, від англ. Late Embryogenesis Abundant), білки теплового шоку (HSPs, Heat Shock Proteins), білки антиоксидантної системи або транспортні білки [24].

У літературі зустрічаються поодинокі дані про успішне висушування в природних умовах

temperature at which drying was carried out, significantly affected the colony-forming activity of HCB cells. Thus, it was established that the use of HCB drying at 5°C led to a decreased colony formation — BFU-E (burst-forming unit-erythroid) and CFU-GM (colony-forming unit — Granulocyte Monocyte) by 1.86 and 1.22 times, respectively, compared to freshly isolated cells. At higher drying temperatures (10, 15 and 20°C), a more pronounced decrease in the number of colonies is observed: BFU-E by 1.87–1.9 times, CFU-GM by 1.57–1.86 times.

Disordered structural and functional potential of HCBL cells after lyophilization necessitates the improvement of the methodology itself and methodical approaches to the implementation of lyophilization. This can be accomplished by a more detailed consideration of the protective and adaptive responses of organisms in water shortage emerged during the process of evolutionary development of living nature. It is known that in such conditions, plants and lower animals develop a state of anhydrobiosis, which in animals is interpreted as a quiescent state, at which external manifestations of life are temporarily absent, metabolism decreases, and development is delayed. Such organisms return to their physiological state within a few minutes or hours after appearing in the water environment. [50]. The capacity for anhydrobiosis has been found in various taxa, including bacteria, yeasts, invertebrates, and plants [18]. In these bioobjects, during transition to the state of anhydrobiosis, the sugars, such as trehalose or sucrose [11] are accumulated. In a dry state, these sugars form a highly viscous vitreous mass, which is necessary for the stabilization of cell membranes [24]. Anhydrobiotics have been shown to use various protective proteins to stay in a dried state, for example, Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA proteins), heat shock proteins (HSPs), proteins of the anti-oxidant system, or transport proteins [11].

In published reports there are poor data on successful drying of human cells under natural conditions. There are data on the possible short-term storage of human fibroblasts in a dried state [78]. Z. Huang *et al.* [44] during the study of the possibility of drying in natural conditions of the human embryonic kidney cells (HEKCs) found that these cells were not resistant to air drying and perceived this factor as a stressor. In such conditions, HEKCs respond by changes in the regulation of intracellular processes, namely activation of MAPK signaling pathways — c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38. In turn, this leads to the development



клітин людини. Є дані про можливе короткочасне зберігання у висушеному стані фібробластів людини [80]. Z. Huang та співавт. [50] під час дослідження можливості висушування в природних умовах клітин ембріональної нирки людини (КЕНЛ) встановили, що ці клітини не є стійкими до висушування на повітрі та сприймають цей фактор як стресорний. У таких умовах КЕНЛ відповідають змінами регуляції внутрішньоклітинних процесів, а саме активацією MAPK-сигнальних шляхів — c-Jun N-термінальної кінази (JNK) та p38. У свою чергу, це призводить до розвитку апоптотичних процесів у цих клітинах, які не здатні витримати висушування на повітрі більше ніж кілька годин.

Останнім часом були проведені дослідження, які дають нове уявлення про функції сигнальних шляхів MAPK (p38 та JNK) у контролі балансу аутофагії та апоптозу у відповідь на генотоксичний стрес [98]. Можна припустити, що викликаний висушуванням КЕНЛ каскад реакцій на стрес, що розвивається, є універсальною відповіддю клітин ссавців, зокрема і клітин ККЛ. Водночас показано [77], що після висушування в умовах теплового стресу (42°C) транскрипційна відповідь клітин людини відрізняється від відгуку мікроорганізмів, наприклад дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Так, в культурах, що перевиваються, клітин HeLa S3 (аденокарцинома шийки матки), нормальних диплоїдних фібробластах легень, клітинах K-562 (пухлинні клітини мієлолейкозу) на тепловий стрес відповідають 123 гена, у той час як у дріжджів — 1042.

Слід зазначити, що, незважаючи на відсутність у клітин ссавців толерантності до висушування на повітрі, у них запускаються складні сигнальні каскади, які, з одного боку, спрямовані на забезпечення їхнього виживання, а з іншого — можуть призвести до загибелі. У зв'язку з цим маніпулювання елементами сигнальних каскадів, які відповідають за життєздатність або загибель клітини разом з наданням відповідних захисних засобів чи трансфекції генів (екзогенно доставляються у клітину), може забезпечити ефективну ангідробіотичну генну інженерію чутливих до висушування клітин [50].

Таким чином, висушування на повітрі має перевагу перед ліофілізацією через простоту та вищу енергоефективність. Однак висушування на повітрі чинить значний стресорний вплив на клітини, тому як більш щадний спосіб зберігання може розглядатися ліофілізація, оскільки завдяки етапу заморожування вона допомагає уникнути ушкоджень, що відбуваються під

of apoptotic processes in these cells, which are unable to withstand air drying for more than a few hours.

Recently, studies have been conducted that provide new insights into the functions of MAPK signaling pathways (p38 and JNK) in controlling the balance of autophagy and apoptosis in response to genotoxic stress [98]. It can be assumed that the developing cascade of reactions to stress caused by the drying of HEKCs is a common response of mammalian cells, in particular, HCB ones. At the same time, it was shown [73] that after drying under heat stress (42°C), the transcriptional response of human cells differed from that of microorganisms, for example, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, in transplanted cultures of HeLa S3 cells (cervical adenocarcinoma), normal diploid lung fibroblasts, K-562 cells (myelogenous leukemia tumor cells), 123 genes respond to heat stress, while in yeast that was 1042.

It should be noted that, despite the lack of tolerance to air drying in mammalian cells, complex signaling cascades are triggered in them, that, on the one hand, are aimed at ensuring their survival, and on the other hand, can lead to death. In this regard, manipulation of elements of signaling cascades responsible for cell viability or death together with the provision of appropriate protective agents or gene transfection (delivered exogenously to the cell) can provide effective anhydrobiotic genetic engineering of desiccation-sensitive cells [44].

Therefore, air drying is preferred over freeze-drying because of its simplicity and higher energy efficiency. However, air drying has a significant stressful effect on cells, so lyophilization can be considered as a more gentle storage method, as it helps to avoid the damage that occurs during drying, due to the freezing step. To create optimal lyophilization protocols, a detailed study of the influence of factors that ensure the preservation of the structure and functions of cells at all stages of this process, as well as during their long-term storage, is necessary.

Resistance of cells to physical and chemical factors implemented during freeze-drying

When lyophilizing cells, the drying is preceded by freezing, that can be an additional factor that leads to cell death. In this regard, investigation of the influence of physical and chemical factors implemented at the stages of cell freezing is a necessary component of creating optimal lyophilization protocols.

The rate of freezing is known to affect the size and morphological characteristics of the ice



час висушування. Для створення оптимальних протоколів ліофілізації необхідне детальне вивчення впливу факторів, що забезпечують збереження структурно-функціональних характеристик клітин на всіх етапах цього процесу, а також під час їх тривалого зберігання.

Стійкість клітин до фізико-хімічних факторів, що реалізуються під час ліофілізації

При ліофілізації клітин процесу висушування передують заморожування, яке може бути додатковим фактором, що призводить до загибелі клітин. У зв'язку з цим дослідження з впливу фізико-хімічних факторів, що реалізуються на етапах заморожування клітин, є необхідним компонентом створення оптимальних протоколів ліофілізації.

Відомо, що швидкість заморожування впливає на розміри і морфологічні характеристики кристалів льоду, які формуються. Це впливає на життєздатність клітин [11, 21]. Підтвердженням цієї тези є дані D. Natan та співавт. [78] про ліофілізацію моноклеарних клітин (МНК) ККЛ. Дослідники змінювали швидкість та отримували МНК ККЛ з різними показниками збереженості. Збереженість була найбільшою після ліофілізації клітин із швидкістю формування льоду 0,2 мм/с. При даній швидкості 25% клітин мали цілісну мембрану, у той час як при швидкості 0,02 та 2,00 мм/с кількість таких клітин становила 18 та 9% відповідно. У роботі Є.О. Гордієнко і співавт. [11] показано, що за низької швидкості формування льоду (0,02 мм/с) відбувається осмотичне зневоднення клітин, у результаті якого збільшується концентрація внутрішньоклітинних речовин. Це, у свою чергу, може призвести до денатурації розчинних білків та пошкодження мембранних структур. З іншого боку, при високій швидкості формування льоду (2 мм/с) об'єм незамороженої фракції рідини більший і ймовірність внутрішньоклітинного формування льоду зростає, оскільки вода не встигає дифундувати з клітини в процесі заморожування [3, 11, 73]. О.І. Гордієнко та співавт. [43] запропонували алгоритм для оцінки оптимальної швидкості заморожування на лінійній моделі заморожування окремих клітинних суспензій залежно від показників клітин.

У літературі є повідомлення про кріоконсервування різних типів клітин людини у поєднанні із застосуванням електромагнітного поля [58]. Даний метод заснований на здатності статичних та осцилюючих електричних та магнітних полів впливати на кристалоутворення льоду. Попри те, що електромагнітні поля потуж-

crystals being formed. This has an influence on cell viability [6, 36]. This is confirmed by the data of D. Natan *et al.* [74] about lyophilization of mononuclear cells (MNCs) of HCB. The researchers changed the rate and obtained HCB MNCs with different indices of preservation. Preservation was the highest after lyophilization of cells with an ice formation rate of 0.2 mm/s. At this rate, 25% of cells had an intact membrane, while at 0.02 and 2.00 mm/s, the number of such cells was 18 and 9%, respectively. In the research of E. O. Gordiyenko *et al.* [36] it was shown that at a low rate of ice formation (0.02 mm/s) osmotic dehydration of cells occurred, as a result of which the concentration of intracellular substances increased. This, in turn, can lead to denaturation of soluble proteins and damage to membrane structures. On the other hand, at a high rate of ice formation (2 mm/s), the volume of the unfrozen liquid fraction is larger and the probability of intracellular ice formation increases, since water does not have time to diffuse from the cell during the freezing process [8, 36, 69]. O.I. Gordiyenko [37] proposed an algorithm for estimating the optimal freezing rate based on a linear model of freezing the individual cell suspensions depending on the cell parameters.

There are published reports about cryopreservation of various types of human cells in combination with the use of an electromagnetic field [52]. This method is based on the ability of static and oscillating electric and magnetic fields to influence ice crystal formation. Despite the fact that electromagnetic fields with a power of 50 Hz induce the formation of reactive oxygen species in cells, as it was reported by M. Lupke *et al.* [62] as exemplified by HCB cells, the use of a magnetic field of the same power when freezing bone marrow, on the contrary, ensures high preservation of cells. Cryopreservation of dental pulp stem cells by means of a programmed freezer using a magnetic field with a frequency of 60 Hz preserved ($73.2 \pm 5.1\%$) of viable cells, and ($56.8 \pm 1.3\%$) without it [56]. These data extend the range of technical means that can be used to improve the quality of lyophilization of biological objects, in particular, HCB.

Other factors determining the preservation of cells during freeze-drying

Among the factors that determine the preservation of cells after lyophilization, the initial concentration of cells in the suspension also affects this index. The highest resistance of HCB cells to damaging factors of lyophilization was obtained



ністю 50 Гц індукують утворення активних форм кисню в клітинах, як це було показано у роботі М. Lurke та співавт. [66] на прикладі клітин ККЛ, використання магнітного поля такої ж потужності при заморожуванні кісткового мозку, навпаки, забезпечує високе збереження клітин. Кріоконсервування стовбурових клітин зубної пульпи на програмному заморожувачі з використанням магнітного поля частотою 60 Гц зберігало $(73,2 \pm 5,1)\%$ життєздатних клітин, а без нього — $(56,8 \pm 1,3)\%$ [60]. Ці дані розширюють спектр технічних засобів, які можна використовувати для підвищення якості ліофілізації біологічних об'єктів, зокрема і ККЛ.

Інші фактори, що визначають збереження клітин при ліофілізації

Серед факторів, що визначають збереження клітин після ліофілізації, вихідна концентрація клітин у суспензії також впливає на цей показник. Найбільша стійкість клітин ККЛ до ушкоджуючих факторів ліофілізації була отримана при концентрації $(2,5 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6)$ кл/мл і становила $(69,28 \pm 17,1)\%$ від нативу [78]. Зі збільшенням концентрації клітин спостерігалося зниження їх кількості після ліофілізації. Так, при підвищенні концентрації клітин у суспензії до $(5 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6)$ кл/мл збереженість клітин знизилася до $(57,01 \pm 14,1)\%$, а при підвищенні до $(8 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6)$ кл/мл — зменшилася до $(55,9 \pm 5,3)\%$. Це відповідає висновкам D. Natan та співавт. [78]: чим вища концентрація клітин у суспензії, тим вища їх агрегація, що також впливає на збереження ККЛ після ліофілізації. Важливим є те, що різні типи клітин ККЛ по-різному реагують на стрес під час ліофілізації [28, 64].

Успіх застосування методу ліофілізації багато в чому також залежить від умов подальшого зберігання ліофілізованих клітин. Так, зберігання ліофілізованих клітин ККЛ в умовах холодильника (4°C) забезпечувало краще збереження, ніж зберігання за кімнатної температури [78]. Крім того, ліофілізовані клітини, як правило, необхідно зберігати у темряві, оскільки в умовах світла їхнє виживання різко знижується [15]. На думку авторів, це пов'язано з вільними радикалами, що утворюються під впливом світла (окислювальним стресом). Їх дія може призводити до пошкодження клітин через однониткові розриви ДНК.

Не менш важливим фактором, що забезпечує збереження ліофілізованого матеріалу, є залишкова вологість. Вважають, що клітини тварин

at a concentration of $(2,5 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6)$ cells/ml and was $(69,28 \pm 17,1)\%$ of the native [74]. With an increase in the concentration of cells, a decrease in their number after lyophilization was observed. Thus, when the concentration of cells in the suspension was increased to $(5 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6)$ cells/ml, cell survival decreased to $(57,01 \pm 14,1)\%$, and when it was increased to $(8 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6)$ cells/ml that was decreased to $(55,9 \pm 5,3)\%$. This corresponds to the conclusions of D. Natan *et al.* [74] that the higher the concentration of cells in the suspension, the higher their aggregation, which also affects the preservation of HCB after lyophilization. Importantly, different types of HCB cells respond differently to stress during lyophilization [15, 60].

The successful freeze-drying largely depends on the conditions of further storage of lyophilized cells. Thus, storage of lyophilized HCB cells in a refrigerator (4°C) ensured higher preservation than storage at room temperature [74]. In addition, lyophilized cells, as a rule, must be stored in the dark, since their survival is dramatically reduced under light conditions [75]. The authors believe that it results from the formation of free radicals under the influence of light (oxidative stress). Their action can lead to cell damage because of the DNA single-strand breaks.

Residual moisture is an equally important factor that ensures the preservation of lyophilized material. It is believed that animal cells are not able to withstand drying with less than 5% residual moisture [77]. Storage temperature is more crucial than a residual moisture. High temperature is particularly unfavorable: the higher it is, the worse the survival of, for example, microorganisms [61].

Thus, in order to preserve the structure and functions of HCB cells, it is necessary to develop lyophilization methods taking into account the optimal drying mode. However, even under optimal lyophilization conditions, the loss of cell viability may be associated with irreversible changes due to the formation of free radicals [78].

Protectants used in lyophilization of mammalian cell suspensions

To ensure the protection of cells sensitive to dehydration from the harmful factors of lyophilization, various protective substances are used — lyoprotectants (in particular, proteins) and polyhydroxy compounds (sugars, polyalcohols and their derivatives, *etc.*). A number of lyoprotective substances used for lyophilization and their



не витримують висушування менше ніж з 5% залишкової вологості [16]. Важливішою за залишкову вологість є температура зберігання. Особливо несприятливою є висока температура: чим вона вище, тим гірше виживання, наприклад, мікроорганізмів [65].

Таким чином, для збереження структурно-функціональних характеристик клітин ККЛ необхідно розробляти методи ліофілізації з урахуванням оптимального режиму висушування. Однак, навіть за оптимальних умов ліофілізації, втрата життєздатності клітин може бути пов'язана з незворотними змінами внаслідок утворення вільних радикалів [80].

Протектори, які застосовуються при ліофілізації суспензії клітин ссавців

Для забезпечення захисту чутливих до зневоднення клітин від ушкоджуючих факторів ліофілізації застосовують різні захисні речовини — ліопротектори (зокрема, білки) та полігидроксисполуки (цукри, поліспірти та їх похідні тощо). Низка ліопротекторних речовин, які застосовуються для ліофілізації, і механізм їх дії представлено у таблиці.

Цукри. На даний час існують дві основні гіпотези, що пояснюють захисну дію цукрів під час висушування клітин методом ліофілізації. Згідно з першою [74], при висушуванні клітин цукри замінюють воду, що взаємодіє з полярними або зарядженими групами біомолекул через прямі водневі зв'язки. При цьому цукри стабілізують нативну структуру фосфоліпідів та білків у мембранах без води. Друга гіпотеза [95] передбачає, що цукри забезпечують склоподібний стан як цитоплазми, так і позаклітинного середовища, запобігаючи денатурації або механічному пошкодженню мембран клітин та її компонентів.

Найбільш відомими, властивими майже всім тваринам-ангідробіотам [31] і часто застосованими під час ліофілізації цукрами є невідновлюючі дисахариди — трегалоза і сахароза [34]. Вони менш реакційні, ніж відновлюючі моносахариди або дисахариди, такі, наприклад, як мальтоза. Ці цукри є кращими протекторами при ліофілізації біооб'єктів, як-от сперматозоїди [52], бактерії [72], клітини кордової крові [96]. У той же час, в літературі є дані [35] про те, що відновлюючі моносахариди або дисахариди, наприклад, мальтоза, є ефективним ліопротектором для ретикулінових волокон. Однак при зберіганні клітин у висушеному стані необхідно враховувати, що мальтоза має високу реакційну здатність [57].

mechanism of action are presented in the Table.

Sugars. Currently, there are two main hypotheses explaining the protective effect of sugars during drying of cells by lyophilization. According to the first [70], when drying cells, sugars replace water, which interacts with polar or charged groups of biomolecules through direct hydrogen bonds. At the same time, with no water sugars stabilize the native structure of phospholipids and proteins in membranes. The second hypothesis [94] suggests that sugars provide a glassy state of both the cytoplasm and the extracellular medium, preventing denaturation or mechanical damage to cell membranes and their components.

The most well-known sugars characteristic of almost all anhydrobiotic animals [18] and often used during lyophilization are the non-reducing disaccharides, namely trehalose and sucrose [21]. They are less reactive than reducing monosaccharides or disaccharides such as maltose. These sugars are the best protecting agents during lyophilization of biological objects such as spermatozoa [46], bacteria [68], cord blood cells [95]. At the same time, there are published data [22] that reducing monosaccharides or disaccharides, for example, maltose, are effective lyoprotectants for reticulin fibers. However, when storing cells in a dried state, it must be taken into account that maltose has a high reactivity [51]. The use of trehalose as a lyoprotectant turned out to be more promising compared to other protecting agents due to its physical and chemical properties. So, trehalose has a radius of hydration 2.5 times larger than that of sucrose. Therefore, 2.5 times more sucrose than trehalose should be used to protect the protein in cells [86]. Unlike sucrose, trehalose interacts more actively with water and proteins [58]. It is able to displace water molecules bound to carbonyl groups in the phospholipid bilayer of the cell membrane [63]. Trehalose has antioxidant properties [43].

R. Brogna *et al.* [13] have demonstrated that plasma samples frozen-dried with trehalose or sucrose had a glass transition temperature (T_g) higher than room temperature ($(72 \pm 3.4)^\circ\text{C}$ and $(46 \pm 11)^\circ\text{C}$, respectively). Such samples will be in a glassy state when stored in ambient conditions, that reduces the degree of protein aggregation and oxidative damage over time. For trehalose, unlike sucrose, there is a large difference between storage temperature and T_g , that may be more beneficial when stored under suboptimal conditions. It is also known that trehalose, unlike sucrose, is more resistant to hydrolysis to reducing monosaccharides



Список ліопротекторних молекул та механізм їх дії
List of lyoprotective molecules and their mechanism of action

Клас сполук Class of compounds	Назва Name	Механізм дії Mechanism of action
Цукри Sugars	Трегалоза, мальтоза [35], рафіноза [37] Trehalose, maltose [22], raffinose [24]	Цукри, що забезпечують захист клітинної та макромолекулярної структури за рахунок видалення води та формування склоподібного матриксу в цитоплазмі. Цукри можуть знижувати температуру плавлення ліпідів мембрани, інгібувати злиття мембран і стабілізувати їх Sugars that protect cell and macromolecular structure by removing water and forming a vitreous matrix in the cytoplasm. Sugars can lower the melting temperature of membrane lipids, inhibit membrane fusion and stabilize them
Протеїни Proteins	Білки пізнього ембріогенезу [24, 46, 54] Proteins of late embryogenesis [11, 48, 40]	Високогідрофільні та неструктуровані протеїни, які набувають вторинної структури під час висушування. Захищають клітини від висихання шляхом зменшення агрегації денатурованих білків; стабілізують білки клітини за рахунок шапероноподібної активності, захищають мембрани клітин; стабілізують вітрифіковані цукри, збільшують температуру склування (Tg); секвеструють двовалентні іони, що синергічно взаємодіють з іншими ліопротекторами, наприклад з трегалозою Highly hydrophilic and unstructured proteins that acquire a secondary structure during drying. Protect cells against drying-out by reducing the aggregation of denatured proteins; stabilize cell proteins due to chaperone-like activity, protect cell membranes; stabilize vitrified sugars, increase the glass transition temperature (Tg); sequester the divalent ions that synergistically interact with other lyoprotectants, for example, with trehalose
	Білки TDPs [24, 68]; білки теплового шоку Hsp72, p26 [75] Proteins TDPs (tardigrade-specific intrinsically disordered proteins) [11, 64]; heat shock proteins (Hsp) Hsp72, p26 [71]	Виявляють шаперонну активність, запобігаючи агрегації протеїнів. Захищають мембрани клітин They show chaperone activity, preventing protein aggregation. Protect cell membranes
	Ангідрин [63] Anhydrin [59]	Високогідрофільний та неструктурований протеїн. Діє в умовах ангідробіозу як: - шаперон, за рахунок створення електростатичних та/або стеричних перешкод, які дозволяють уникати агрегації денатурованих протеїнів у ядрі; - ендонуклеаза, яка може бути включена в процеси репарації ушкоджень ДНК, викликаних висушуванням під час ангідробіозу Highly hydrophilic and unstructured protein. Acts in anhydrobiosis as: - a chaperone, due to the creation of electrostatic and/or steric hindrances that allow to avoid the aggregation of denatured proteins in the nucleus; - an endonuclease that can be involved in the repair of DNA damage caused by drying during anhydrobiosis
Інші речовини Other substances	Гідроксиетил-крохмаль [8] Hydroxyethyl starch [31]	Інгібує злиття між мембранами. Було показано, що комбінація глюкози та HES може збільшити толерантність до висушування Inhibits fusion between membranes. It has been shown that the combination of glucose and HES can increase desiccation tolerance
	Пролін [32] Proline [19]	Може бути осмопротекторною амінокислотою. Передбачається, що пролін може бути стабілізатором мембрани і протеїнів, може редукувати температуру плавлення (Tm) ДНК і виявляти антиоксидантні властивості Can be an osmoprotective amino acid. It is assumed that proline can be a membrane and protein stabilizer, can reduce the melting temperature (Tm) of DNA and exhibit antioxidant properties
	Знежирене молоко [86] Skimmed milk [84]	Стабілізує клітинну стінку та цитоплазматичну мембрану, зв'язує позаклітинну воду, бере участь у дегідратації клітин. БАР, що містяться у незжиреному молоці, забезпечують регенеративні процеси після регідратації Stabilizes the cell wall and cytoplasmic membrane, binds extracellular water, participates in cell dehydration. Bioactive substances contained in skimmed milk provide regenerative processes after rehydration



Застосування трегалози як ліопротектора виявилось перспективнішим порівняно з іншими протекторами у зв'язку з її фізико-хімічними властивостями. Так, у трегалози, радіус гідратації в 2,5 рази більший, ніж у сахарози. Отже, для забезпечення захисту білка в клітинах потрібно використовувати в 2,5 рази більше сахарози, ніж трегалози [88]. Трегалоза, на відміну від сахарози, активніше взаємодіє з водою і білками [62]. Вона здатна витіснити молекули води, зв'язані з карбонільними групами у фосфоліпідному подвійному шарі клітинної мембрани [67]. Трегалоза має антиоксидантні властивості [49].

У роботі R. Brogna та співавт. [26] показано, що зразки плазми, висушені виморожуванням з трегалозою або сахарозою, мають температуру склування (Tg) вищу за кімнатну ($(72 \pm 3,4)^\circ\text{C}$ і $(46 \pm 11)^\circ\text{C}$ відповідно). Такі зразки будуть у склоподібному стані при зберіганні в умовах навколишнього середовища, що знижує ступінь агрегації білків та окисного пошкодження з часом. Для трегалози, на відміну від сахарози, існує велика різниця між температурою зберігання та Tg, що може бути кориснішим при зберіганні в субоптимальних умовах. Відомо також, що трегалоза, на відміну від сахарози, більш стійка до гідролізу до відновлюючих моносахаридів [31]. У зв'язку з цим, використання як ліопротектора трегалози більш прийнятне порівняно з сахарозою в тому випадку, коли потрібне зберігання ліооб'єктів у висушеному стані тривалий час. Проте S.B. Lee та співавт. [61] у якості ліопротектора при ліофілізації бактеріальних культур використовували сахарозу.

Білки. Відомо, що безхребетні тварини для забезпечення виживання при ангідробіозі з цукрами використовують речовини білкової природи. Найбільш поширеними з них є білки-шаперони — білки теплового шоку (heat shock proteins, HSPs), а також білки пізнього ембріогенезу (Late Embryogenesis Abundant, LEA). Шаперони відіграють важливу роль у білковому гомеостазі (протеостазі), забезпечуючи підтримку балансу білкового синтезу, фолдингу, перенесення, складання, дезагрегації та деградації білка для правильної клітинної функції у фізіологічних та стресорних умовах.

T. Mizrahi та співавт. [75] показали, що у земляного равлика *Theba pisana* експресія невеликих за розміром HSPs тісно пов'язана зі стійкістю до стресу, включаючи толерантність до висихання. Ймовірно, у цих тварин шаперонна активність такого типу білків може пом'якшувати згубні наслідки, пов'язані зі зневодненням.

[18]. In this regard, the use of trehalose as a lyoprotectant is more acceptable compared to sucrose if it is necessary to store lyoobjects in a dried state for a long time. However, S.B. Lee *et al.* [57] used sucrose as a lyoprotectant during lyophilization of bacterial cultures.

Proteins. It is known that invertebrate animals use protein substances to ensure survival in anhydrobiosis with sugars. The most common of them are chaperone proteins, *i. e.* heat shock proteins (HSPs), as well as late embryogenesis proteins (Late Embryogenesis Abundant, LEA). Chaperones play an important role in protein homeostasis (proteostasis), providing maintenance of the balance of protein synthesis, folding, transfer, assembly, disaggregation, and protein degradation for proper cell function under physiological and stressful conditions.

T. Mizrahi *et al.* [71] showed that in the land snail *Theba pisana*, the expression of small HSPs was closely related to resistance to stress, including tolerance to desiccation. Probably, in these animals, the chaperone activity of this type of protein can mitigate the deleterious effects associated with dehydration.

It is interesting that the use of HSPs under the stressful effect of lyophilization on cells leads to their increased viability due to the blockade of apoptosis processes in them [64]. In addition, some cell populations, particularly myeloid-committed, may be more resistant to lyophilization due to their ability to synthesize high levels of HSPs [20].

LEA proteins are promising lyoprotectants that increase the stability of cells, as they contribute to the stabilization of sugars in the cytoplasm of the cell during vitrification, protect proteins subjected to drying from deactivation and aggregation, and also, interacting directly with the cell membrane, ensure its stabilization during lyophilization [40]. Proteins such as LEA can also play an important role in the formation of the vitrified medium (substrate) during drying [48].

Naturally occurring LEA proteins differ in their characteristics and localization [41, 59]. Their combination with each other or with other glass-forming solutions can be a promising method of genetic engineering of human cells capable of increasing their resistance to desiccation. S. Li *et al.* [59] showed that the LEA protein isolated from the body of the African mosquito *Polypedilum vanderplanki* could provide the same level of protection during drying of HepG2 cells (a human hepatoma cell line) as intracellular trehalose, as



Цікавим є той факт, що застосування HSPs в умовах стресорного впливу ліофілізації на клітини приводить до підвищення їхньої життєздатності за рахунок блокади в них процесів апоптозу [68]. Крім того, деякі популяції клітин, зокрема комітовані в мієлоїдному напрямку, можуть бути більш стійкими до ліофілізації завдяки їхній здатності синтезувати високий рівень HSPs [33].

LEA-білки є перспективними ліопротекторами, що підвищують стійкість клітин, оскільки сприяють стабілізації цукрів у цитоплазмі клітини під час склування, захищають від дезактивації та агрегації білки, які піддані висушуванню, а також, взаємодіючи безпосередньо з клітинною мембраною, забезпечують її стабілізацію при ліофілізації [46]. Такі білки, як LEA, також можуть відігравати важливу роль в утворенні засклованого середовища (субстрату) під час висихання [54].

Існуючі в природі LEA-білки відрізняються за своїми характеристиками та локалізацією [47, 63]. Їх поєднання один з одним або з іншими склоутворюючими розчинами може бути перспективним методом генної інженерії клітин людини, здатним підвищувати їх стійкість до висихання. S. Li та співавт. [63] показали, що LEA-білок, виділений з організму африканського комара *Polypedilum vanderplanki*, може забезпечувати такий же рівень захисту при висушуванні клітин HepG2 (лінія клітин гепатоми людини), як і внутрішньоклітинна трегалоза, про що свідчить цілісність мембран цих клітин після регідратації. Введення методом генної інженерії в клітини гепатоми генів, виділених з ембріона представника роду ракоподібних *Artemia franciscana*, що кодують два білки — AfrLEA2 або AfrLEA3m, значно підвищувало стійкість цих клітин до висушування, проведеного з використанням спін-висушувального обладнання (spin-drying technique). Незважаючи на відсутність досліджень такого напрямку щодо клітин ККЛ, перспективною є розробка можливої генетичної модифікації клітин стовбурового компартменту, зокрема СКК і МСК.

Поєднане використання ліопротекторів

Дані літератури свідчать [24], що ангідробіотичні тварини, наприклад тихоходи, раціонально використовують кілька взаємодоповнюючих ліопротекторних речовин за умов посухи. У зв'язку з цим слід відзначити результати застосування дослідниками різних поєднань ліопротекторів при ліофілізації мікроорганізмів. На-

evidenced by the integrity of the membranes of these cells after rehydration. The introduction of genes isolated from the embryo of the crustacean of genus *Artemia franciscana*, encoding two proteins – AfrLEA2 or AfrLEA3m, into hepatoma cells by means of genetic engineering significantly increased the resistance of these cells to drying by means of the spin-drying technique. Despite the lack of studies in this area regarding HCB cells, the development of possible genetic modification of cells of the stem compartment, in particular HSCs and MSCs, is optimistic.

Combined use of lyoprotectants

The publications show [11] that anhydrobiotic animals, such as tardigrades, rationally use several complementary lyoprotective substances under drought conditions. In this regard, it is worth noting the results of researchers using different combinations of lyoprotectants during lyophilization of microorganisms. For example, some authors [49] used 12% lactose in combination with 12% sucrose during lyophilization of vaginal *Lactobacillus* bacteria as protective substances, and 10% glucose with 20% sucrose was used for lyophilization of *Lactobacillus plantarum* JH287 [57].

R. Brogna *et al.* [13] investigated the advantages of the combined use of lyoprotectants when freeze-drying the mammalian cells. In the studies of H.H. Xiao *et al.* [95] there was found that the use of a 20% sucrose solution as a lyoprotectant in combination with a 10% mannitol solution contributed to a significant increase in the number of CD34⁺ cells in lyophilized HCB, compared to the use of only a sucrose solution, that as the authors believe, could occur due to stabilization of the membrane structure.

Minimization of the stressor effect of lyophilization on HCB MNCs can be achieved by using synthetic polymers in combination with sugars and alcohols [95]. Thus, the addition of a solution containing 40% polyvinylpyrrolidone (PVP), 20% sucrose, 10% mannitol to HCB MNCs before lyophilization led to a significant rise in cell safety and an increased concentration of CD34⁺ cells compared to the use of PVP or sucrose, or a combination of PVP and sucrose.

As mentioned above, cryopreservation is one of the stages of freeze-drying, therefore, the use of several cryoprotectants for the standard protocol of freeze-drying of HCB cells refers to the procedure for optimizing the entire technological process of lyophilization. Indeed, J.P. Rodri-



приклад, при ліофілізації вагінальних бактерій *Lactobacillus* в якості захисних речовин деякі автори [55] застосовували лактозу 12% в поєднанні з сахарозою 12%, для ліофілізації *Lactobacillus plantarum* JH287 використовували глюкозу 10% з сахарозою 20% [61].

У роботі R. Brogna та співавт. [26] показано переваги поєднаного використання ліопротекторів при ліофілізації клітин ссавців. У дослідженнях Н.Н. Хіао та співавт. [96] було встановлено, що застосування як ліопротектора розчину сахарози в концентрації 20% у поєднанні з розчином манітолу в концентрації 10% сприяло значущому підвищенню кількості CD34⁺ клітин у ліофілізованому ККЛ, порівняно із застосуванням лише розчину сахарози, що, на думку авторів, могло відбуватися за рахунок стабілізації структури мембрани.

Мінімізація стресорної дії ліофілізації на МНК ККЛ може бути досягнута шляхом застосування синтетичних полімерів у поєднанні з цукрами та спиртами [96]. Так, додавання до МНК ККЛ розчину, що містить 40% полівінілпіролідону (ПВП), 20% сахарози, 10% манітолу перед ліофілізацією приводило до значущого підвищення безпеки клітин і підвищення концентрації CD34⁺ клітин порівняно із застосуванням ПВП або сахарози, або комбінації ПВП та сахарози.

Як зазначалося вище, кріоконсервування є одним з етапів процесу ліофілізації, отже, використання при складанні стандартного протоколу ліофілізації клітин ККЛ декількох кріопротекторів відноситься до процедури оптимізації всього технологічного процесу ліофілізації. Справді, J.P. Rodrigues та співавт. [84] у своїх дослідженнях показали, що попередня обробка клітин ККЛ сахарозою або трегалозою підвищувала їхню життєздатність після заморожування-відтавання з ДМСО. Так, при заморожуванні клітин ККЛ з 2,5%-м ДМСО життєздатність по трипановому синьому становила 78%, при заморожуванні з 2,5%-м ДМСО та 10%-ою сахарозою — 80%, при заморожуванні з 2,5%-м ДМСО та 10%-ою трегалозою — 8%. Також було показано синергетичну дію трегалози та каталази, що забезпечує високе збереження здатності до хомінгу та адгезії у клітин ККЛ після кріоконсервування [85]. Для відповіді на запитання про те, чи можлива кореляція толерантності до кріовпливу в клітинах ссавців при сумісному використанні кріопротекторів та їх збереження після ліофілізації, потрібне вирішення додаткових теоретичних та експериментальних завдань.

gues *et al.* [82] in their studies showed that pretreatment of HCB cells with sucrose or trehalose enhanced their viability after freeze-thaw with DMSO. Thus, when freezing HCB cells with 2.5% DMSO, the viability according to trypan blue was 78%, when freezing with 2.5% DMSO and 10% sucrose that was 80%, for freezing with 2.5% DMSO and 10% trehalose it made 8%. The synergistic effect of trehalose and catalase was also shown, that ensures high preservation of homing and adhesion ability in HCB cells after cryopreservation [83]. To answer the question of whether it is possible to correlate the tolerance to cryoinfluence in mammalian cells with the combined use of cryoprotectants and their preservation after freeze-drying, extra theoretical and experimental tasks need to be solved.

Development of methods of transporting lyoprotectants into the cell

The important role of lyoprotectants in the protection of cells during lyophilization determines the need to develop the methods of their transportation into the cell. It is known that trehalose does not penetrate through the HCB cell membrane and they lack transporters for its transfer. At the same time, M. Zhang *et al.* [97] showed that human fibroblasts were able to absorb trehalose from the extracellular space by liquid-phase endocytosis. Currently, artificial methods of transporting lyoprotectant into cells are being actively developed. One of the promising directions is the use of native membrane pores of ionotropic receptor P₂X₇ (P2X-purinergic receptor-7) as transporters [26]. To induce the expression of this molecule on cells, the effect of bacterial endotoxin and extracellular ATP is needed [92].

Another pore-forming structure that can ensure the entry of trehalose into the cell is the P2Z receptor. ATP and benzoyl-ATP serve as a pore former for this receptor. Normally, the P2Z receptor is expressed on the membrane of many immature hematopoietic cells, such as CD34⁺ cells, as well as on mature cells – granulocytes, neutrophils [88], dendritic cells, *etc.* [23]. However, it should be noted that only 58% of cells among mature and immature HCB have a P2Z receptor. This indicates that when using a pore-forming structure in the form of a P2Z-receptor, the trehalose will be delivered only for certain populations of HCB cells. This is confirmed by the data of S.S. Buchanan *et al.* [15], which indicating a strong difference in the differentiation and clonogenic potential of native HCB cells and those after



Розробка способів транспортування ліопротекторів у клітину

Важлива роль ліопротекторів у захисті клітин при ліофілізації визначає необхідність розробки способів їх транспортування в клітину. Відомо, що трегалоза не проникає через клітинну мембрану ККЛ і у них відсутні транспортери для її перенесення. Разом з тим, М. Zhang та співавт. [97] показали, що фібробласти людини здатні поглинати трегалозу з позаклітинного простору рідкофазним ендоцитозом. На даний час активно розробляються штучні способи транспортування ліопротектора у клітини. Одним з перспективних напрямів є використання як транспортерів нативних мембранних пор іонотропного рецептора P₂X₇ (P2X-пуринергічного рецептора-7) [39]. Для індукції експресії даної молекули на клітинах необхідна дія бактеріального ендотоксину та позаклітинного АТФ [93].

Ще однією пороутворювальною структурою, яка може забезпечити надходження трегалози в клітину, є P2Z-рецептор. У якості пороутворювача для цього рецептора служать АТФ і бензоїл-АТФ. У нормі P2Z-рецептор експресується на мембрані багатьох незрілих гемопоетичних клітин, таких як CD34⁺ клітини, а також на зрілих клітинах — гранулоцитах, нейтрофілах [90], дендритних тощо [36]. Однак слід зазначити, що лише 58% клітин серед зрілих і незрілих ККЛ мають P2Z-рецептор. Це свідчить про те, що при використанні пороутворювальної структури у вигляді P2Z-рецептора доставлення трегалози забезпечуватиметься лише для окремих популяцій клітин ККЛ. Підтвердженням цього є дані S.S. Vuchanap та співавт. [28], що свідчать про значну різницю в диференціації та клоногенному потенціалі нативних клітин ККЛ і клітин після ліофілізації з використанням даного способу доставлення трегалози.

Слід зазначити, що для розробки способів транспортування ліопротекторів у клітину можна враховувати підходи, які успішно застосовуються під час криоконсервування. Наприклад, А. Eroglu та співавт. [41] для створення пор та введення трегалози в цитоплазму фібробластів застосовували генетично модифікований mutant α -гемолізину *Staphylococcus aureus*.

На сьогодні показано можливість використання великої кількості білків як транспортерів трегалози або інших захисних цукрів у клітину [48, 69, 81, 91]: мальтоза/мальтодекстриновий транспортер MalEFGK2, до складу якого входить зв'язуючий білок MaIE, трансмембран-

lyophilization using this method of trehalose delivery.

It should be noted that for the development of methods of transporting lyoprotectants into the cell, it is possible to take into account the approaches that are successfully used during cryopreservation. For example, A. Eroglu *et al.* [27] have used the genetically modified α -hemolysin mutant of *Staphylococcus aureus* to create pores and introduce trehalose into the cytoplasm of fibroblasts.

To date, the possibility of using a large number of proteins as transporters of trehalose or other protective sugars into the cell has been shown [42, 65, 79, 90]: the maltose/maltodextrin transporter MalEFGK2, which includes a binding protein MalE, a transmembrane channel from MalF and MalG subunits, as well as two ATPase subunits; MalK, MAL11/AGT1 (maltose transporter (Mal11), α -glucoside transporter (AGT1)), HvSUT1 (*Hordeum vulgare* (barley) sucrose transporter), HvSUT2, MdSUT2, MdAREB2 (Apple Sucrose Transporter, CIPK, TRET1 (Trehalose transporter). The advantage of TRET1 over the specified transporter proteins is a higher functional capacity, specificity for trehalose, neutral pH, and the fact that this transporter is expressed by a single gene [59]. Stable expression of TRET1 in human hepatoma cells transfected with this gene contributed to a four-fold increase in cell viability after drying using the spin-drying technique [59]. These data are in agreement with the results of other authors [90], which showed a direct correlation between the concentration of trehalose in the extracellular medium and the percentage of gene-modified chinese hamster ovary (CHO) viable cells after cryopreservation. The highest number of CHO viable cells was obtained during lyophilization with trehalose at a concentration of 500 mM. However, it is difficult to use TRET1 as a trehalose transporter to ensure a high preservation of HCB cells after lyophilization because of labor intensity of genetic modification of cells. For the same reason, the use of a method that ensures the synthesis of trehalose inside the cell is impractical for wide application. Therefore, the reports of N. Guo *et al.* [38], testifying to the possibility of successful transduction (transfection) of genes responsible for the synthesis of trehalose in human fibroblasts, are only of scientific interest. In addition, there is an ethical question about whether genetically modified cells can cause a risk to human health, so each such an approach of using genetic modification of cells must be tested on a case-by-case basis before its use.

Today, the attention of scientists is focused



ний канал із субодиниць MalF і MalG, а також дві субодиниці АТФаз; MalK, MAL11/AGT1 (maltose transporter (Mal11), α -glucoside transporter (AGT1)), HvSUT1 (*Hordeum vulgare* (ячмінь) sucrose transporter), HvSUT2, MdSUT2, MdAREB2 (Apple Sucrose Transporter, CIPK, TRET1 (Trehalose transporter)). Перевагою TRET1 перед вказаними білками-транспортерами є більш висока функціональна здатність, специфічність до трегалози, нейтральний рН і те, що цей транспортер експресується одним геном [63]. Стабільна експресія TRET1 у культурі клітин гепатоми людини, трансфектованих цим геном, сприяла чотириразовому збільшенню життєздатності клітин після висушування під час використання спін-висушувального обладнання (spin-drying technique) [63]. Ці дані узгоджуються з результатами інших авторів [91], що показали пряму кореляцію між концентрацією трегалози у позаклітинному середовищі та відсотком життєздатних генетично модифікованих клітин яєчника китайського хом'ячка (лінія CHO, Gene-modified Chinese hamster ovary cells) після кріоконсервування. Максимально високу кількість життєздатних клітин лінії CHO було отримано під час ліофілізації з трегалозою в концентрації 500 мМ. Однак складно застосувати в якості транспортера трегалози TRET1 з метою забезпечення високої збереженості клітин ККЛ після ліофілізації через трудомісткість проведення генетичної модифікації клітин. З цієї ж причини використання методу, що забезпечує синтез трегалози всередині клітини, недоцільне для широкого застосування. Тому дані N. Guo та співавт. [44], які свідчать про можливість успішної трансдукції (трансфекції) генів, відповідальних за синтез трегалози у фібробластах людини, представляють лише науковий інтерес. Крім того, існує етичне питання про те, чи можуть генетично модифіковані клітини викликати ризик для здоров'я людини, тому кожен такий підхід з використанням генної модифікації клітин необхідно тестувати в кожному конкретному випадку.

На сьогодні увага науковців акцентується на використанні прямого методу введення трегалози всередину клітини. Так, R. Shirakashi та співавт. [87] вперше застосував метод електропермеабілізації для клітин мієломи мишей. A. Eroglu та співавт. [41] для підвищення виживання ооцитів людини після кріоконсервування успішно застосували метод мікроін'єкції трегалози. Подібної кріозахисної дії на ооцити ці ж автори досягли шляхом мікроін'єкції рафінози [40]. Однак підвищення проникності клітинної мембрани

on the use of a direct method of introducing trehalose into the cell. Yes, R. Shirakashi *et al.* [85] first applied the electropermeabilization to mouse myeloma cells. A. Eroglu *et al.* [27] successfully used the trehalose microinjection to increase the survival of human oocytes after cryopreservation. The same authors achieved a similar cryoprotective effect on oocytes by microinjection of raffinose [28]. However, an increase in the permeability of the cell membrane allows non-specific transfer of molecules and ions, that entails a change in their transmembrane ratio and the possible strong damage to cells.

Another way to 'load' cells with trehalose is the use of basic amino acids, cell-penetrating peptides (CPP), in particular KRKRWHW (the letters reflect the sequence of amino acids: Arg, R; Lys; Trp, W; His, H) [93]. This peptide was engineered to deliver trehalose into mammalian cells through molecular modeling. Trehalose as a 'cargo' in combination with KRKRWHW through hydrogen and π - π -bonding was successfully introduced into mouse embryonic fibroblasts (MEF) [93]. KRKRWHW is capable of effectively delivering trehalose to mammalian cells without exhibiting cytotoxic effects even when using its high concentrations.

In published reports, there are studies on the possibility of delivering trehalose inside the cell by means of nanoparticles (NPs). So, W. Rao *et al.* [81] introduced trehalose into the cell by encapsulating its molecules in genipin (an aglycon of the iridoid glycoside geniposide, being present in the fruits of *Gardenia jasminoides*). The release of trehalose from NPs occurred when the pH of the medium changed. Nanoparticles of apatite are able to modulate the physical parameters of the membrane, contributing to increase the permeability for trehalose. The addition of apatite NPs to the cryopreservation medium of erythrocytes significantly increased their preservation up to 91%, which was 42% higher than in samples without NPs [87].

Despite the large number of studies using trehalose carriers, there are also data on the use of trehalose without its carriers with cell protection in lyophilization. So, in the research of D. Natan *et al.* [74] it was established that the use of trehalose alone or in combination with epigallocatechin-gallate increased the stability of the membrane of HCB cells during lyophilization and ensured a rise in cell viability.

Another solution for delivering trehalose inside HCB cells is the use of artificial modification of its structure [1] by its conjugation with 6



допускає неспецифічне перенесення молекул та іонів, що тягне за собою зміну їх трансмембранного співвідношення та можливість значного пошкодження клітин.

Іншим способом «навантажувати» клітини трегалозою є використання основних амінокислот, пептидів, що проникають у клітину (cell-penetrating peptides, CPP), зокрема KRKRWHW (літери відображають послідовності амінокислот: Arg, R; Lys; Trp, W; His, H) [94]. Цей пептид був створений цілеспрямовано для доставлення трегалози в клітини ссавців шляхом молекулярного моделювання. Трегалозу як «вантаж» у поєднанні з KRKRWHW через водневий і π - π -зв'язок було успішно введено в ембріональні фібробласти мишей (mouse embryonic fibroblasts, MEF) [94]. Ефективно доставляти трегалозу в клітини ссавців, не виявляючи цитотоксичної дії навіть при використанні його високих концентрацій, здатний KRKRWHW.

У літературних джерелах є роботи про можливість доставлення трегалози всередину клітини за допомогою наночастинок (НЧ). Так, W. Rao та співавт. [83] вводили трегалозу всередину клітини шляхом інкапсулювання її молекул у геніпін (аглікон іридоїдного глікозиду геніпозиду, який присутній у плодах *Gardenia jasminoides*). Вивільнення трегалози з НЧ відбувалося за зміни рН середовища. Наночастинки апатиту здатні модулювати фізичні параметри мембрани, сприяючи збільшенню проникності для трегалози. Додавання НЧ апатиту в середовище кріоконсервування еритроцитів значно збільшувало їх збереження аж до 91%, що на 42% вище, ніж у пробах без НЧ [89].

Незважаючи на велику кількість досліджень з використанням переносників трегалози, існують дані й про застосування трегалози без її переносників з захистом клітин в умовах ліофілізації. Так, у роботі D. Natan та співавт. [78] було встановлено, що застосування трегалози окремо або у поєднанні з епігалокатехін-галлатом підвищувало стійкість мембрани клітин ККЛ у процесі ліофілізації та забезпечувало підвищення життєздатності клітин.

Ще одним рішенням доставлення трегалози всередину клітин ККЛ є використання штучної модифікації її структури [18] шляхом її кон'югації з 6 ацетиловими групами (Trehalose conjugated with 6 acetyl groups (trehalose hexaacetate or 6-O-Ac-Tre)). Продемонстровано успішне введення у клітини лінії Jurkat аналогу трегалози, отриманого модифікацією трегалози шляхом естерифікації. Після інкубації з модифікова-

acetyl groups (Trehalose conjugated with 6 acetyl groups (trehalose hexaacetate or 6-O-Ac-Tre)). The successful introduction of a trehalose analogue obtained by modification of trehalose by esterification into the Jurkat cells was demonstrated. After incubation with the molecule modified in this way and 'heat shock' (42°C), the cells had a higher viability compared to untreated cells [12].

Some researchers describe that the introduction of trehalose into the cell is not necessary for successful lyophilization of HCB cells. Even without the use of trehalose, up to 46% of cells can be preserved during lyophilization of HCBL [32]. At the same time, the number of hematopoietic stem cells (CD34⁺) and their proliferative activity (the number of granulocyte-macrophage colony-forming units) differed little from the indices of the native material. Equally important is the fact that the number of regulatory T-cells (T-reg) after lyophilization of HCBL significantly increased compared to native ones. Experimental studies have demonstrated that lyophilized by this method HCBL, in which T-reg and hematopoietic stem cells were of a special therapeutic significance, preserved its functional activity, showing an immune corrective effect during an autoimmune disease development [89].

It is worth noting the inefficiency of the use in classic cryopreservation of HCB and other suspensions of cell cryoprotectants (dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol) during lyophilization of a wide range of biological objects. Thus, for lyophilization of cells, the use of DMSO is undesirable due to its toxicity to cells and, as a result, the possibility of damaging them by increasing the concentration during water evaporation. Glycerol during cell lyophilization is also inappropriate due to its hygroscopic properties at the maximum evaporation point, that can lead to an increase in viscosity in lyophilized samples [16]. A significant drawback of these chemical agents is their toxic effect on the body, that necessitates their removal from the cell suspension before use in clinical practice [67]. The use of hydroxyethyl starch, which manifests itself during dehydration as an osmolytic, on the contrary ensured a high preservation of HCB nucleated cells after lyophilization (up to 65%), bringing it as close as possible to native samples (about 85%) [31].

The results of many studies confirm the importance of lyoprotective substances for the preservation of lyophilized cells. At the same time,



ною таким чином молекулою та перенесеного ними «теплого шоку» (42°C) клітини мали вищу життєздатність порівняно з необробленими [25].

Для успішної ліофілізації клітин ККЛ, на думку деяких науковців, введення трегалози в клітину не є обов'язковим. Навіть без використання трегалози при ліофілізації ЛККЛ вдається зберегти до 46% клітин [10]. При цьому кількість гемопоетичних стовбурових клітин (CD34⁺) та їх проліферативна активність (кількість гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць) мало відрізнялися від показників нативного матеріалу. Не менш важливим є і те, що кількість регуляторних Т-клітин (Т-рег) після ліофілізації ЛККЛ значуще збільшувалася порівняно з нативними. В експериментальних дослідженнях було показано, що ліофілізований за цим методом ЛККЛ, в якому Т-рег та гемопоетичні стовбурові клітини мають особливу терапевтичну значущість, зберігав свою функціональну активність, проявляючи імунорегулюючий ефект під час розвитку аутоімунного захворювання [17].

Варто вказати на неефективність використання класичних для кріоконсервування ККЛ та інших суспензій клітинних кріопротекторів (ДМСО, гліцерин, етиленгліколь) під час ліофілізації широкого спектру біооб'єктів. Так, для ліофілізації клітин використання ДМСО небажане через його токсичність для клітин і, як наслідок, можливість їх пошкодження шляхом підвищення концентрації під час випарювання води. Гліцерин під час ліофілізації клітин також недоречний через його гігроскопічні властивості при максимальній точці випаровування, що може призвести до підвищення в'язкості в ліофілізованих зразках [29]. Істотним недоліком цих хімічних агентів є їхня токсична дія на організм, що зумовлює необхідність їх видалення із суспензії клітин перед використанням у клінічній практиці [71]. Застосування гідроксиетилкрохмалю, який виявляє себе при зневодненні як осмолітик, навпаки забезпечувало високу збереженість ядерних клітин ККЛ після ліофілізації (до 65%), максимально наближаючи до нативних зразків (близько 85%) [8].

Результати багатьох досліджень підтверджують значущість ліопротекторних речовин для збереженості ліофілізованих клітин. У той самий час успішна ліофілізація, зокрема ЛККЛ, може бути досягнута і без використання захисних речовин [10].

Антиоксиданти. Під час ліофілізації різних біооб'єктів можуть використовуватися й антиок-

successful lyophilization, in particular HCBL, can be achieved without the use of protective substances [33].

Antioxidants. During lyophilization of various biological objects, antioxidants can also be used, potentially able to prevent damage caused by oxidative stress and the formation of reactive oxygen species (ROS). Indeed, osmotic or cold shock during freezing can lead to the ROS formation, initiating the destruction of membranes, DNA, disruption of cell signaling and, ultimately, apoptosis [8]. The application of antioxidants, which are used during cryopreservation of biological objects, especially reproductive cells, will reduce the effects of oxidative stress. However, for the stabilization of cells during freeze-drying, antioxidants were used only in some studies [32].

Amino acids, in particular, glutamine [96], can also be used as an antioxidant during lyophilization of suspensions of various types of bacteria [72]. T. Morichi *et al.* [72] observed a significant increase in cell preservation when glutamine was added at a concentration of 0.06 M. Antioxidants such as coenzyme Q10 [5], melatonin [17], quercetin, tempol [7] were exploited to increase the efficiency of sperm cryopreservation. These antioxidants improve the safety of freeze-dried biomaterial.

Ascorbic acid is one of the antioxidants that ensures the viability of the nuclear cells of HCBL during lyophilization [32]. By the cell viability assessment after storage in a lyophilized state [47], it was established that different antioxidants have their protective potential.

Conclusions

Thus, polyhydroxy compounds (sugars) can be recommended to be applied as lyoprotectants during freeze-drying. To optimize lyophilization, substances used by anhydrobionts in drought conditions can be used, namely proteins (HSPs, LEA proteins and proteins of the antioxidant system) and sugars (trehalose). Trehalose is widely used to store cells in a lyophilized state, but because it does not penetrate cells, methodical approaches to deliver this molecule into the cell are vitally important. Long-term storage of lyophilized HCB cells is another important task that needs to be solved. Thus, for successful long-term storage of lyophilized HCB cells, it is necessary to optimize the physical and chemical parameters of lyophilization, as well as to ensure continuous monitoring and control of their long-



сиданти, потенційно здатні запобігати пошкодженням, спричиненим окислювальним стресом та утворенням активних форм кисню (АФК). Справді, осмотичний або холодний шок під час заморожування може призвести до утворення АФК, що ініціюють руйнування мембран, ДНК, порушення клітинної передачі сигналів і, зрештою до апоптозу [3]. Антиоксиданти, які застосовуються під час кріоконсервування біооб'єктів, особливо репродуктивних клітин, дозволяють зменшити наслідки окислювального стресу. Однак для стабілізації клітин під час сублімаційного сушіння антиоксиданти застосовувалися лише в окремих дослідженнях [9].

Амінокислоти, зокрема, глутамін [12], також можна використовувати як антиоксидант при ліофілізації суспензії різних видів бактерій [76]. Т. Морічі та співавт. [76] спостерігали значуще збільшення збереженості клітин при додаванні глутаміну в концентрації 0,06 М. Для підвищення ефективності кріоконсервування сперматозоїдів використовували антиоксиданти як-от коензим Q10 [20], мелатонін [30], кверцетин, темпол [22]. Ці антиоксиданти можна використовувати для підвищення безпеки ліофілізованого біоматеріалу.

Одним з антиоксидантів, що забезпечує життєздатність ядерних клітин ЛККЛ при ліофілізації, є аскорбінова кислота [9]. За допомогою оцінки життєздатності клітин після зберігання в ліофілізованому стані [53] було встановлено, що різні антиоксиданти мають свій захисний потенціал.

Висновки

Таким чином, під час ліофілізації ККЛ можуть бути рекомендовані до використання в якості ліопротекторів полігідроксисполуки (цукри). Для оптимізації ліофілізації можуть бути застосовані речовини, які використовуються ангідробіонтами в умовах посухи — білки (HSPs, білки LEA та білки антиоксидантної системи) і цукри (трегалоза). Трегалоза широко застосовується для зберігання клітин у ліофілізованому стані, але через те, що вона не проникає у клітини, важливими є методичні підходи доставлення цієї молекули у клітину. Довгострокове зберігання ліофілізованих клітин ККЛ є ще однією важливою проблемою, яку необхідно вирішувати. Так, для успішного тривалого зберігання ліофілізованих клітин ККЛ необхідно оптимізувати фізичні та хімічні параметри ліофілізації, а також забезпечити безперервний моніторинг та контроль за їх довгостроковим зберіганням.

term storage.

References

1. Abazari A, Meimetis LG, Budin G, et al. Engineered trehalose permeable to mammalian cells. PLoS ONE. [Internet]. 2015 June 26 [cited 2023 May 2]; 10(6). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130323>
2. Abdulkadyrov KM, Romanenko NA. [Preparation of placental blood. Features of its cellular composition and hematopoietic potential]. *Transfuziologiya*. 2003; 4(1): 15–33. Russian.
3. Abramova EG, Kochkalova NN, Nikiforov AK, et al. [Production of lyophilized preparation of anti-rabies immunoglobulin and examination of its main properties]. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011; (2): 75–8. Russian.
4. Alpert P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *J Exp Biol*. 2006; 209(Pt 9): 1575–84.
5. Appiah MO, Asante-Badu B, Zhao J, et al. Possible protective mechanisms of coenzyme Q10 action on spermatozoa during cryopreservation or cooled-stored condition. *CryoLetters*. 2020; 41(5): 246–56.
6. Arav A, Yavin S, Zeron Y, et al. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 187(1–2): 77–81.
7. Azadi L, Tavalae M, Deemeh MR, et al. Effects of tempol and quercetin on human sperm function after cryopreservation. *CryoLetters*. 2017; 38(1): 29–36.
8. Belous AM, Grischenko VI. [Cryobiology]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 432 p. Russian.
9. Belous AM, Tsvetkov DU. [Scientific grounds of the technology of sublimational preservation]. Kyiv: Naukova Dumka; 1985. 208 p. Russian.
10. Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2003; 46(2): 146–52.
11. Boothby TC, Pielak GJ. Intrinsically disordered proteins and desiccation tolerance: elucidating functional and mechanistic underpinnings of anhydrobiosis. *Bioessays*. 2017; 39(11): 1–4.
12. Bragg JT, D'Ambrosio HK, Smith TJ, et al. Esterified trehalose analogues protect mammalian cells from heat shock. *ChemBiochem*. 2017; 18 (18): 1863–70.
13. Brogna R. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. *PloS One* [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2023 May 3]; 15(6): e0234502. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7289390/>
14. Brown KS, Rao MS, Brown HL. The future state of newborn stem cell banking. *J Clin Med*. [Internet]. 2015 Jan 18 [cited 2023 May 2]; 8(1): 117. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6352006/>
15. Buchanan SS, Pyatt DW, Carpenter JF. Preservation of differentiation and clonogenic potential of human hematopoietic stem and progenitor cells during lyophilization and ambient storage. *PLoS One*. [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2023 May 2]; 5(9): e12518. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012518>



Література

1. Абдулкадыров КМ, Романенко НА. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопотенциала. Трансфузиология. 2003; 4(1): 15–33.
2. Абрамова ЕГ, Кочкалова НН, Никифоров АК, и др. Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; (2): 75–8.
3. Белоус АМ, Грищенко ВИ. Кробиология. Киев: Наукова думка; 1994. 432 с.
4. Белоус АМ, Цветков ЦД. Научные основы технологии сублимационного консервирования. Киев: Наукова думка; 1985. 208 с.
5. Гольцев КА, Волина ВВ, Кожина ОЮ, и др. Влияние криоконсервированной кордовой крови на структуру иммунокомпетентных и других жизненно важных органов при остром гнойном перитоните. Проблемы кробиологии. 2011. 21(4): 429–47.
6. Гольцев АН, Волина ВВ, Останков МВ, и др. Влияние криоконсервирования на функциональные свойства ядродержащих клеток лейкоконцентрата кордовой крови человека. Проблемы кробиологии. 2010. 20(1): 66–72.
7. Гольцев АН, Калиниченко ТА. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопотенциальных клеток для клинического применения. Часть 1. Характеристика гемопотенциала. Проблемы кробиологии. 1998; 8(1): 3–23.
8. Гольцев АМ, Мосійчук ВВ, Гольцев КА, Тараннік ГК, Сокіл ЛВ, Останков МВ, Бондарович МО, Гриша ІГ, Чернищенко ЛГ, винахідники; Інститут проблем кробиології і крiомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 117780. 10.07.2017.
9. Гольцев АМ, Сокіл ЛВ, Стецишин ВГ, Мосійчук ВВ, Бондарович МО, Гриша ІГ, Останков МВ, Луценко ОД, Останкова ЛВ, Чернищенко ЛГ, винахідники; Інститут проблем кробиології і крiомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України №125846. 25.05.2018.
10. Гольцев АМ, Тараннік ГК, Гриша ІГ, Сокіл ЛВ, Бондарович МО, Останков МВ, Луценко ОД, Гольцев КА, Останкова ЛВ, винахідники; Інститут проблем кробиології і крiомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові Патент України № 113006. 10.01.2017.
11. Гордиенко ЕА, Гордиенко ОИ, Кулешова ЛГ, Розанов ЛФ. Механизмы защиты клеток от криоповреждения вне- и внутриклеточным льдом. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы кробиологии и крiомедицины. Харьков; 2012. с. 9–45.
12. Иовве АВ, Кардаш ОФ. Влияние аминокислот на состояние антиоксидантной системы кардиомиоцитов в условиях гипотермической ишемии. Здоровоохранение. 2016; (3): 67–71.
13. Кожина ОЮ, Останкова ЛВ, Останков МВ, и др. Роль моноцитарно-фагоцитарной системы в формировании противовирусной резистентности у мышей после предварительного введения криоконсервированной кордовой крови. Анналы Мечниковського інституту. 2013; (1): 44–51.
14. Лебединец ВВ, Овсянников СЕ, Останков МВ, и др. Коррекция нарушений метаболизма введением криоконсервированной кордовой крови в экспериментальной модели ишемического инсульта. Научные Ведомости. Серия Медицина. Фармация. 2015; 213 (16): 156–62.
15. Охалкина ВЮ. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация. Теоретическая и прикладная экология. 2009; (4): 21–32.
16. Подольский МВ, Рыболовлев ЮР. О лиофилизации эритроцитов человека. Кробиология и крiомедицина. 1980; 6: 54–6.
16. Carrascosa A, Rosario S, Ramon M, et al. Molecular wine microbiology. Academic Press; 2011. 372 p.
17. Chen XJ, Zhang Y, Jia GX, et al. Effect of melatonin supplementation on cryopreserved sperm quality in mouse. CryoLetters. 2016; 37(2): 115–22.
18. Crowe JH. Anhydrobiosis: An unsolved problem with applications in human welfare. Subcell Biochem. 2015; 71: 263–80.
19. Cui S, Zhou W, Tang X. The effect of proline on the freeze-drying survival rate of *Bifidobacterium longum* CCFM 1029 and its inherent mechanism. Int J Mol Sci. [Internet]. 2022 Nov 4 [cited 2023 May 3]; 23(21): 13500. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9653706/>
20. D'Alessandro A, Grazzini G, Giardina B, Zolla L. In silico analyses of proteomic data suggest a role for heat shock proteins in umbilical cord blood hematopoietic stem cells. Stem Cell Rev. 2010; 6(4): 532–47.
21. De Jesús Valle MJ, Alves A, Coutinho P, et al. Lyoprotective effects of mannitol and lactose compared to sucrose and trehalose: sildenafil citrate liposomes as a case study. Pharmaceutics. [Internet]. 2021 Jul 28 [cited 2023 May 3]; 13(8): 1164. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8400243/>
22. Díaz-Moreno E, Durand-Herrera D, Carriel V, et al. Evaluation of freeze-drying and cryopreservation protocols for long-term storage of biomaterials based on decellularized intestine. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018; 106(2): 488–500.
23. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood. 2001; 97: 587–600.
24. Drake AC, Lee Y, Burgess EM, et al. Effect of water content on the glass transition temperature of mixtures of sugars, polymers, and penetrating cryoprotectants in physiological buffer. PLoS One. [Internet]. 2018 Jan 5 [cited 2023 May 2]; 13(1): e0190713. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190713>
25. Dufresne J, Hoang T, Ajambo J, et al. Freeze-dried plasma proteins are stable at room temperature for at least 1 year. Clinical proteomics. [Internet]. 2017 Oct 27 [cited 2023 May 2]; 14(1): 35. Available from: <https://clinicalproteomicsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12014-017-9170-0>
26. Elliott GD, Liu XH, Cusick JL, et al. Trehalose uptake through P₂X₇ purinergic channels provides dehydration protection. Cryobiology. 2006; 52(1): 114–27.
27. Eroglu A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: Intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. Cryobiology. 2010; 60(3): 54–9.
28. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. Fertil Steril. 2002; 77(1): 152–8.
29. Ghaffaripour HA, Jalali M, Nikraves MR, et al. Neuronal cell reconstruction with umbilical cord blood cells in the brain hypoxia-ischemia. Iran Biomed J. 2015; 19(1): 29–34.
30. Goltsev AN, Kalinichenko TA. Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part I. Nature of hemopoietic potential. Problems of Cryobiology. 1998; 8(1): 3–23.
31. Goltsev AM, Mosiychuk VV, Goltsev KA, Tarannik GK, Sokil LV, Ostankov MV, Bondarovich MO, Grisha IG, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, assignee. [Method of lyophilization of leukoconcentrate of cord blood]. Patent of Ukraine 117780U, 2017 Jul 10. Ukraine.



- 17.Таранник АК, Останкова ЛВ, Гриша ИГ, и др. Лиофилизированный лейкоконцентрат кордовой крови человека как корректор состояния иммунного статуса при лечении атопического дерматита (экспериментальное исследование). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(2): 165.
- 18.Abazari A, Meimetis LG, Budin G, et al. Engineered trehalose permeable to mammalian cells. PLoS ONE. [Internet]. 2015 June 26 [cited 2023 May 2]; 10(6). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130323>
- 19.Alpert P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? J Exp Biol. 2006; 209(Pt 9): 1575–84.
- 20.Appiah MO, Asante-Badu B, Zhao J, et al. Possible protective mechanisms of coenzyme Q10 action on spermatozoa during cryopreservation or cooled-stored condition. CryoLetters. 2020; 41(5): 246–56.
- 21.Arav A, Yavin S, Zeron Y, et al. New trends in gamete's cryopreservation. Mol Cell Endocrinol. 2002; 187(1–2): 77–81.
- 22.Azadi L, Tavalae M, Deemeh MR, et al. Effects of tempol and quercetin on human sperm function after cryopreservation. CryoLetters. 2017; 38(1): 29–36.
- 23.Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. Cryobiology. 2003; 46(2): 146–52.
- 24.Boothby TC, Pielak GJ. Intrinsically disordered proteins and desiccation tolerance: elucidating functional and mechanistic underpinnings of anhydrobiosis. Bioessays. 2017; 39(11): 1–4.
- 25.Bragg JT, D'Ambrosio HK, Smith TJ, et al. Esterified trehalose analogues protect mammalian cells from heat shock. ChemBiochem. 2017;18(18):1863–70.
- 26.Brogna R. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. PLoS One [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2023 May 3]; 15(6): e0234502. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7289390/>
- 27.Brown KS, Rao MS, Brown HL. The future state of newborn stem cell banking. J Clin Med. [Internet]. 2015 Jan 18 [cited 2023 May 2]; 8(1): 117. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6352006/>
- 28.Buchanan SS, Pyatt DW, Carpenter JF. Preservation of differentiation and clonogenic potential of human hematopoietic stem and progenitor cells during lyophilization and ambient storage. PLoS One. [Internet]. 2010 Sept 1 [cited 2023 May 2]; 5(9): e12518. Available from:<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012518>
- 29.Carrascosa A, Rosario S, Ramon M, et al. Molecular wine microbiology. Academic Press; 2011. 372 p.
- 30.Chen XJ, Zhang Y, Jia GX, et al. Effect of melatonin supplementation on cryopreserved sperm quality in mouse. CryoLetters. 2016; 37(2): 115–22.
31. Crowe JH. Anhydrobiosis: An unsolved problem with applications in human welfare. Subcell Biochem. 2015; 71: 263–80.
32. Cui S, Zhou W, Tang X. The effect of proline on the freeze-drying survival rate of *Bifidobacterium longum* CCFM 1029 and its inherent mechanism. Int J Mol Sci. [Internet]. 2022 Nov 4 [cited 2023 May 3]; 23(21), 13500. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9653706/>
- 33.D'Alessandro A, Grazzini G, Giardina B, Zolla L. In silico analyses of proteomic data suggest a role for heat shock proteins in umbilical cord blood hematopoietic stem cells. Stem Cell Rev. 2010; 6(4): 532–47.
- 34.De Jesús Valle MJ, Alves A, Coutinho P, et al. Lyoprotective effects of mannitol and lactose compared to sucrose and trehalose: sildenafil citrate liposomes as a case study. Pharmaceuticals. [Internet]. 2021 Jul 28 [cited 2023 May 3]; 13(8): 1164. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8400243/>
- 35.Díaz-Moreno E, Durand-Herrera D, Carriel V, et al. Evaluation of freeze-drying and cryopreservation protocols for long-term
- 32.Goltsev AM, Sokil LV, Stetsishin VG, Mosiychuk VV, Bondarovich MO, Grisha IG, Ostankov MV, Lutsenko OD, Ostankova LV, Chernyshenko LG, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, assignee. [Method of lyophilization of leukoconcentrate of cord blood]. Patent of Ukraine 125846, 2018 May 25. Ukraine.
- 33.Goltsev AM, Taranik GC, Grisha IG, Sokil LV, Bondarovich MO, Ostankov MV, Lutsenko OD, Goltsev KA, Ostankova LV, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of lyophilization of leukoconcentrate of cord blood]. Patent of Ukraine 113006, 2017 Jan 10. Ukraine.
- 34.Goltsev KA, Volina VV, Kozhina OYu, et al. Effect of cryopreserved cord blood on structure of immunocompetent and other vital organs at acute pyoperitonitis. Problems of Cryobiology. 2011. 21(4): 429–44.
- 35.Goltsev AN, Volina VV, Ostankov MV, et al. Effect of cryopreservation on functional properties of human cord blood leukoconcentrate nucleated cells. Problems of Cryobiology. 2010. 20(1): 66–72.
- 36.Gordiyenko YeA, Gordiyenko OI, Kuleshova LG, et al. [Mechanisms of cell protection from cryodamage by extra- and intracellular ice]. In: Goltsev AN, editor. [Current problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkiv; 2012. p. 9–45. Russian.
- 37.Gordiyenko OI, Kovalenko SY, Kovalenko IF, et al. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. CryoLetters. 2018; 39(6): 380–5.
- 38.Guo N, Puhlev I, Brown DR, et al. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. Nature Biotechnology. 2000; 18(2): 168–71.
39. Gupta V, Agarwal L, Ballal P, Pandey D. Cord blood banking: antenatal care provider's roles and responsibilities. Stem Cells Int. [Internet]. 2019 Mar 7 [cited 2023 May 2]; 13(1): 3598404. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/3598404/>
- 40.Hatanaka R, Gusev O, Cornette R, et al. Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki*. Planta. 2015; 242(2): 451–9.
- 41.Hatanaka H, Hagiwara-Komoda Y, Furuki T, et al. An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, PvLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2013; 43(11): 1055–67.
- 42.Henderson R, Poolman B. Proton-solute coupling mechanism of the maltose transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. Sci Rep. [Internet]. 2017 Oct 17 [cited 2023 May 2]; 7(1): 14375. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14438-1>
- 43.Honma Y, Sato-Morita M, Katsuki Y, et al. Trehalose activates autophagy and decreases proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress-mediated cytotoxicity in hepatocytes. Hepatol Res. 2018; 48 (1): 94–105.
- 44.Huang Z, Tunnacliffe A. Gene induction by desiccation stress in human cell cultures. FEBS Lett. 2005; 579(22): 4973–7.
- 45.Ichikawa S, Fukuhara N, Hatta S et al. Successful cord blood stem cell transplantation for primary cutaneous CD8-positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma complicated with cerebral infiltration. Intern Med. 2018; 57(14): 2051–5.
- 46.Ito D, Wakayama S, Kamada Y, et al. Effect of trehalose on the preservation of freeze-dried mice spermatozoa at room temperature. J Reprod Dev. 2019; 65(4): 353–9.



- storage of biomaterials based on decellularized intestine. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018; 106(2): 488–500.
36. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 2001; 97: 587–600.
 37. Drake AC, Lee Y, Burgess EM, et al. Effect of water content on the glass transition temperature of mixtures of sugars, polymers, and penetrating cryoprotectants in physiological buffer. *PLoS One.* [Internet]. 2018 Jan 5 [cited 2023 May 2]; 13(1): e0190713. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.019073>
 38. Dufresne J, Hoang T, Ajambo J et al. Freeze-dried plasma proteins are stable at room temperature for at least 1 year. *Clinical proteomics.* [Internet]. 2017 Oct 27 [cited 2023 May 2]; 14(1): 35. Available from: <https://clinicalproteomicsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12014-017-9170-0>
 39. Elliott GD, Liu XH, Cusick JL, et al. Trehalose uptake through P₂X₇ purinergic channels provides dehydration protection. *Cryobiology.* 2006; 52(1): 114–27.
 40. Eroglu A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: Intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. *Cryobiology.* 2010; 60(3): 54–9.
 41. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril.* 2002; 77(1): 152–8.
 42. Ghaffaripour HA, Jalali M, Nikravesh MR, et al. Neuronal cell reconstruction with umbilical cord blood cells in the brain hypoxia-ischemia. *Iran Biomed J.* 2015; 19(1): 29–34.
 43. Gordiyenko OI, Kovalenko SY, Kovalenko IF, et al. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. *CryoLetters.* 2018; 39(6): 380–5.
 44. Guo N, Puhlev I, Brown DR, et al. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology.* 2000; 18(2): 168–71.
 45. Gupta V, Agarwal L, Ballal P, Pandey D. Cord blood banking: antenatal care provider's roles and responsibilities. *Stem Cells Int.* [Internet]. 2019 Mar 7 [cited 2023 May 2]; 13(1): 3598404. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/3598404/>
 46. Hatanaka R, Gusev O, Cornette R, et al. Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki*. *Planta.* 2015; 242(2): 451–9.
 47. Hatanaka H, Hagiwara-Komoda Y, Furuki T, et al. An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, PvLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 2013; 43(11): 1055–67.
 48. Henderson R, Poolman B. Proton-solute coupling mechanism of the maltose transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep.* [Internet]. 2017 Oct 17 [cited 2023 May 2]; 7(1): 14375. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14438-1>
 49. Honma Y, Sato-Morita M, Katsuki Y, et al. Trehalose activates autophagy and decreases proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress-mediated cytotoxicity in hepatocytes. *Hepato Res.* 2018; 48 (1): 94–105.
 50. Huang Z, Tunnacliffe A. Gene induction by desiccation stress in human cell cultures. *FEBS Lett.* 2005; 579(22): 4973–7.
 51. Ichikawa S, Fukuhara N, Hatta S et al. Successful cord blood stem cell transplantation for primary cutaneous CD8-positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma complicated with cerebral infiltration. *Intern Med.* 2018; 57(14): 2051–5.
 52. Ito D, Wakayama S, Kamada Y, et al. Effect of trehalose on the preservation of freeze-dried mice spermatozoa at room temperature. *J Reprod Dev.* 2019; 65(4): 353–9.
 47. Jamil K, Crowe JH, Tablin F, Oliver AE. Arbutin enhances recovery and osteogenic differentiation in dried and rehydrated human mesenchymal stem cells. *Cell Preservation Technology.* 2005; 3(4): 244–55.
 48. Janis B, Uversky VN, Menze MA. Potential functions of LEA proteins from the brine shrimp *Artemia franciscana* – anhydrobiosis meets bioinformatics. *J Biomol Struct Dyn.* 2018; 36(12): 3291–309.
 49. Juárez Tomás MS, Bru E, Martos G, Nader-Macías ME. Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. *Can J Microbiol.* 2009; 55(5): 544–52.
 50. Kanazawa M, Nanri T, Saigusa M. Anhydrobiosis affects thermal habituation in the bdelloid rotifer, *Adineta* sp. *Zoolog Sci.* 2017; 34(2): 81–5.
 51. Kanzler C, Schestkova H, Haase PT, et al. Formation of reactive intermediates, color, and antioxidant activity in the maillard reaction of maltose in comparison to d-glucose. *J Agric Food Chem.* 2017; 65 (40): 8957–65.
 52. Kobayashi A, Kirschvink JL. A ferromagnetic model for the action of electric and magnetic fields in cryopreservation. *Cryobiology.* 2014; 68(2): 163–5.
 53. Kozhina OYu, Ostankova LV, Ostankov MV, et al. [The role of the monocyte-phagocytic system in formation of antiviral resistance in mice after preliminary injection of cryopreserved cord blood]. *Annals of Mechnikov Institute.* 2013; (1): 44–51. Russian.
 54. Kumar B, Madabushi SS. Identification and isolation of mice and human hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2018; 1842: 55–68.
 55. Lebedynets VV, Ovsiannykov SE, Ostankov MV, et al. [Correction of metabolic disorders by the introduction of cryopreserved cord blood in an experimental model of ischemic stroke]. *Nauchnye Vedomosti. Seryia Medytsyna. Farmatsiya.* 2015; 213 (16): 156–62. Russian.
 56. Lee SY, Huang GW, Shiung JN, et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2012; 196(1): 23–33.
 57. Lee SB, Kim DH, Park HD. Effects of protectant and rehydration conditions on the survival rate and malolactic fermentation efficiency of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* JH287. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100(18): 7853–63.
 58. Lerbret A, Bordat P, Affouard F, et al. How do trehalose, maltose, and sucrose influence some structural and dynamical properties of lysozyme? Insight from molecular dynamics simulations. *J Phys Chem.* 2007; 111(31): 9410–20.
 59. Li S, Chakraborty N, Borcar A, et al. Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(51): 20859–64.
 60. Li J, Hua TC, Gu XL, et al. Morphology study of freeze-drying mononuclear cells of human cord blood. *CryoLetters.* 2005; 26(3): 193–200.
 61. Liu J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. *Pharm Dev Technol.* 2006; 11(1): 3–28.
 62. Lupke M, Rollwitz J, Simkó M. Cell activating capacity of 50 Hz magnetic fields to release reactive oxygen intermediates in human umbilical cord blood-derived monocytes and in Mono Mac 6 cells. *Free Radic Res.* 2004; 38(9): 985–93.
 63. Luzardo M del C, Amalfa F, Nuñez AM. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers. *Biophysical Journal.* 2000; 78(5): 2452–8.
 64. Ma X, Jamil K, Macrae TH, et al. A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation



53. Jamil K, Crowe JH, Tablin F, Oliver AE. Arbutin enhances recovery and osteogenic differentiation in dried and rehydrated human mesenchymal stem cells. *Cell Preservation Technology*. 2005; 3(4): 244–55.
54. Janis B, Uversky VN, Menze MA. Potential functions of LEA proteins from the brine shrimp *Artemia franciscana* - anhydrobiosis meets bioinformatics. *J Biomol Struct Dyn*. 2018; 36(12): 3291–309.
55. Juárez Tomás MS, Bru E, Martos G, Nader-Macías ME. Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. *Can J Microbiol*. 2009; 55(5): 544–52.
56. Kanazawa M, Nanri T, Saigusa M. Anhydrobiosis affects thermal habituation in the bdelloid rotifer, *Adineta* sp. *Zoolog Sci*. 2017; 34(2): 81–5.
57. Kanzler C, Schestkova H, Haase PT, et al. Formation of reactive intermediates, color, and antioxidant activity in the maillard reaction of maltose in comparison to d-glucose. *J Agric Food Chem*. 2017; 65(40): 8957–65.
58. Kobayashi A, Kirschvink JL. A ferromagnetic model for the action of electric and magnetic fields in cryopreservation. *Cryobiology*. 2014; 68(2): 163–5.
59. Kumar B, Madabushi SS. Identification and isolation of mice and human hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2018; 1842: 55–68.
60. Lee SY, Huang GW, Shiung JN, et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2012; 196(1): 23–33.
61. Lee SB, Kim DH, Park HD. Effects of protectant and rehydration conditions on the survival rate and malolactic fermentation efficiency of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* JH287. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100(18): 7853–63.
62. Lebrat A, Bordat P, Affouard F, et al. How do trehalose, maltose, and sucrose influence some structural and dynamical properties of lysozyme? Insight from molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry*. 2007; 111(31): 9410–20.
63. Li S, Chakraborty N, Borcar A, et al. Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(51): 20859–64.
64. Li J, Hua TC, Gu XL, et al. Morphology study of freeze-drying mononuclear cells of human cord blood. *CryoLetters*. 2005; 26(3): 193–200.
65. Liu, J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. *Pharm Dev Technol*. 2006; 11(1): 3–28.
66. Lupke M, Rollwitz J, Simkó M. Cell activating capacity of 50 Hz magnetic fields to release reactive oxygen intermediates in human umbilical cord blood-derived monocytes and in Mono Mac 6 cells. *Free Radic Res*. 2004; 38(9): 985–93.
67. Luzardo M del C, Amalfa F, Nunez AM. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers. *Biophys J*. 2000; 78(5): 2452–8.
68. Ma X, Jamil K, Macrae TH, et al. A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. *Cryobiology*. 2005; 51(1): 15–28.
69. Ma QJ, Sun MH, Lu J, et al. Transcription factor AREB2 is involved in soluble sugar accumulation by activating sugar transporter and amylase genes. *Plant Physiol*. 2017; 174(4): 2348–62.
70. Maharajan N, Cho GW, Choi JH, et al. Regenerative therapy using umbilical cord serum. *In Vivo*. 2021; 35(2): 699–705.
71. Maral S, Albayrak M, Pala C, et al. Dimethyl sulfoxide-induced tonic-clonic seizure and cardiac arrest during infusion of autologous peripheral blood stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(4): 831–2.
72. Marcial-Coba MS, Cieplak T, Cahú TB, et al. Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and *in vitro* simulated upper gastrointestinal tract passage. *Food Funct*. 2018; 9(11): 5868–79.
73. Maral S, Albayrak M, Pala C, et al. Dimethyl sulfoxide-induced tonic-clonic seizure and cardiac arrest during infusion of autologous peripheral blood stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(4): 831–832.
74. Marcial-Coba MS, Cieplak T, Cahú TB, et al. Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and *in vitro* simulated upper gastrointestinal tract passage. *Food Funct*. 2018; 9(11): 5868–79.
75. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*. 1963; 47: 347–69.
76. Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, et al. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017; 114: 288–95.
77. Mizrahi T, Goldenberg S, Heller J, et al. Natural variation in resistance to desiccation and heat shock protein expression in the land snail *Theba pisana* along a climatic gradient. *Physiol Biochem Zool*. 2015; 88(1): 66–80.
78. Morichi T, Irie R, Yano N, et al. Protective effect of glutamic acid and related compounds on bacterial cells subjected to freeze-drying. *J Gen App Microbiol*. 1963; 9(2): 149–61.
79. Murray JI, Whitfield ML, Trinklein ND, et al. Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 2361–74.
80. Natan D, Nagler A, Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. *Plos One*. [Internet]. 2009 April 21 [cited 2023 May 2]; 4(4): e5240–52. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005240>
81. Okhapkina VYu. [Methods of microbe cultures maintenance. Part 2. Lyophilisation]. *Theoretical problems of ecology*. 2009;(4): 21–32. Russian.
82. Olaciregui M, Gil L. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? *Reprod Domest Anim*. 2017; 52 Suppl 2: 248–25.
83. Podolsky MV, Rybolovlev YuR. [On lyophilization of human erythrocytes]. *Kriobiologiya i Kriomeditsina*. 1980; 6: 54–6. Russian
84. Puhlev I, Guo N, Brown DR, et al. Desiccation tolerance in human cells. *Cryobiology*. 2001; 42(3): 207–17.
85. Radchuk V, Riewe D, Peukert M, et al. Down-regulation of the sucrose transporters HvSUT1 and HvSUT2 affects sucrose homeostasis along its delivery path in barley grains. *J Exp Bot*. 2017; 68(16): 4595–612.
86. Rafii H, Bernaudin F, Rouard H, et al. Family cord blood banking for sickle cell disease: a twenty-year experience in two dedicated public cord blood banks. *Haematologica*. 2017; 102(6): 976–83.
87. Rao W, Huang H, Wang H, et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7(8): 5017–28.
88. Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for tolerance on mammalian cells. *Cryobiology*. 2005; 51(1): 15–28.
89. Ma QJ, Sun MH, Lu J, et al. Transcription factor AREB2 is involved in soluble sugar accumulation by activating sugar transporter and amylase genes. *Plant Physiol*. 2017; 174(4): 2348–62.
90. Maharajan N, Cho GW, Choi JH, et al. Regenerative therapy using umbilical cord serum. *In Vivo*. 2021; 35(2): 699–705.
91. Maral S, Albayrak M, Pala C, et al. Dimethyl sulfoxide-induced tonic-clonic seizure and cardiac arrest during infusion of autologous peripheral blood stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(4): 831–2.
92. Marcial-Coba MS, Cieplak T, Cahú TB, et al. Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and *in vitro* simulated upper gastrointestinal tract passage. *Food Funct*. 2018; 9(11): 5868–79.



73. Mazur P Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.* 1963; 47: 347–69.
74. Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, et al. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017; 114: 288–95.
75. Mizrahi T, Goldenberg S, Heller J, et al. Natural variation in resistance to desiccation and heat shock protein expression in the land snail *Theba pisana* along a climatic gradient. *Physiol Biochem Zool.* 2015; 88(1): 66–80.
76. Morichi T, Irie R, Yano N, et al. Protective effect of glutamic acid and related compounds on bacterial cells subjected to freeze-drying *J Gen App Microbiol.* 1963; 9(2): 149–61.
77. Murray JI, Whitfield ML, Trinklein ND, et al. Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Mol Biol Cell.* 2004; 15: 2361–74.
78. Natan D, Nagler A, Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. *Plos One.* [Internet]. 2009 Apr 21 [cited 2023 May 2]; 4(4): e5240–52. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005240>
79. Olaciregui M, Gil L. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? *Reprod Domest Anim.* 2017; 52 Suppl 2: 248–25.
80. Puhlev I, Guo N, Brown DR, et al. Desiccation tolerance in human cells. *Cryobiology.* 2001; 42(3): 207–17.
81. Radchuk V, Riewe D, Peukert M, et al. Down-regulation of the sucrose transporters HvSUT1 and HvSUT2 affects sucrose homeostasis along its delivery path in barley grains. *J Exp Bot.* 2017; 68(16): 4595–612.
82. Rafii H, Bernaudin F, Rouard H, et al. Family cord blood banking for sickle cell disease: a twenty-year experience in two dedicated public cord blood banks. *Haematologica.* 2017; 102(6): 976–83.
83. Rao W, Huang H, Wang H, et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015; 7(8): 5017–28.
84. Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology.* 2008; 56(2): 144–51.
85. Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. A combination of catalase and trehalose as additives to conventional freezing medium results in improved cryoprotection of human hematopoietic cells with reference to *in vitro* migration and adhesion properties. *Transfusion.* 2005; 45(4): 622–33.
86. Schoug A, Fischer J, Heipieper HJ, et al. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008; 35(3): 175–81.
87. Shirakashi R, Köstner CM, Müller KJ. Intracellular delivery of trehalose into mammalian cells by electroporation. *J Membr Biol.* 2002; 189(1): 45–54.
88. Sola-Penna M, Roberto Meyer-Fernandes J. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1998; 360(1): 10–4.
89. Stefanic M, Ward K, Tawfik H, et al. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation. *Biomaterials.* 2017; 140: 138–49.
90. Suh B-C, Kim J-S, Namgung U, et al. P₂X₇ nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J Immunol.* 2001; 166: 6754–63.
91. Mazur P Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.* 1963; 47: 347–69.
92. Warren AY, Harvey L, Shaw RW, et al. Interleukin-1 beta secretion from cord blood mononuclear cells *in vitro* involves P2X 7 receptor activation. *Reprod Sci.* 2008; 15(2): 189–94.
93. Wei Y, Li C, Zhang L, et al. Design of novel cell penetrating peptides for the delivery of trehalose into mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1838(7): 1911–20.
94. Weng L, Stott SL, Toner M. Exploring dynamics and structure of biomolecules, cryoprotectants, and water using molecular dynamics simulations: implications for biostabilization and biopreservation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2019; 21: 1–31.
95. Xiao HH, Hua TC, Li J, et al. Freeze-drying of mononuclear cells and whole blood of human cord blood. *CryoLetters.* 2004; 25(2): 111–20.
96. Yovve AV, Kardash OF. [Effect of amino acids on the state of the antioxidant system of cardiomyocytes in conditions of hypothermic ischemia]. *Zdravookhranenie.* 2016; (3): 67–71. Russian.
97. Zhang M, Oldenhof H, Sieme H, et al. Combining endocytic and freezing-induced trehalose uptake for cryopreservation of mammalian cells. *Biotechnol Prog.* 2017; 33(1): 229–35.
98. Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, et al. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep.* [Internet]. 2015 Jun 11 [cited 2023 May 2]; 35(3): e00199.



91. Uchida T, Furukawa M, Kikawada T, et al. Intracellular trehalose via transporter TRET1 as a method to cryoprotect CHO-K1 cells. *Cryobiology*. 2017; 77: 50–7.
92. Vanichapol T, Pongsakul N, Srisala S. Suppressive characteristics of umbilical cord blood-derived regulatory T cells after ex vivo expansion on autologous and allogeneic T effectors and various lymphoblastic cells. *J Immunother*. 2019; 42(4): 110–8.
93. Warren AY, Harvey L, Shaw RW, et al. Interleukin-1 beta secretion from cord blood mononuclear cells *in vitro* involves P2X 7 receptor activation. *Reprod Sci*. 2008; 15(2): 189–94.
94. Wei Y, Li C, Zhang L, et al. Design of novel cell penetrating peptides for the delivery of trehalose into mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838(7): 1911–20.
95. Weng L, Stott SL, Toner M. Exploring dynamics and structure of biomolecules, cryoprotectants, and water using molecular dynamics simulations: implications for biostabilization and biopreservation. *Annu Rev Biomed Eng*. 2019; 21:1–31.
96. Xiao HH, Hua TC, Li J, et al. Freeze-drying of mononuclear cells and whole blood of human cord blood. *CryoLetters*. 2004; 25(2): 111–20.
97. Zhang M, Oldenhof H, Sieme H, et al. Combining endocytic and freezing-induced trehalose uptake for cryopreservation of mammalian cells. *Biotechnol Prog*. 2017; 33(1): 229–35.
98. Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, et al. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep*. [Internet]. 2015 Jun 11 [cited 2023 May 2]; 35(3): e00199. Available from: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/35/3/e00199/56831/MAPK-JNK-signalling-a-potential-autophagy>
99. Zhu D, Cheng K. Cardiac cell therapy for heart repair: should the cells be left out? *Cells* [Internet]. 2021 Mar 13 [cited 2023 May 2]; 10(3): 641. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/3/641>

