

## Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы

Кит О.И., Гненная Н.В., Филиппова С.Ю., Чембарова Т.В., Лысенко И.Б., Новикова И.А., Розенко Л.Я., Димитриади С.Н., Шалашная Е.В., Ишонина О.Г.  
ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии" Минздрава России. Ростов-на-Дону, Россия

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) периферической крови хорошо зарекомендовала себя как процедура лечения гематологических, онкологических и аутоиммунных заболеваний. У онкологических больных трансплантация ГСК позволяет использовать в процессе лечения высокодозные цитотоксические препараты в сочетании с лучевой терапией, что обеспечивает выраженный противоопухолевый эффект. Гематологическая токсичность подобного лечения устраняется последовательным введением стволовых клеток, способствующих восстановлению роста кроветворения. Перед трансплантацией ГСК периферической крови подвергаются процедуре сбора и криоконсервации с целью дальнейшего хранения. Важным требованием, предъявляемым к криоконсервации, является сохранение жизнеспособности ГСК, ответственных за восстановление роста кроветворения. Цель обзора — анализ литературы, посвященной изучению влияния различных способов криоконсервации ГСК периферической крови человека на сохранение жизнеспособности клеток после размораживания, а также развитие нежелательных явлений у пациентов. Рассмотрены вопросы, связанные с использованием различных криопротекторов, а также методы хранения трансплантатов ГСК. Представленные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения влияния криопротекторов на организм человека

и клеточный состав трансплантата и усовершенствования протоколов криоконсервации ГСК.

**Ключевые слова:** биобанкирование, гемопоэтические стволовые клетки, криоконсервация, криопротекторы, трансплантация.

**Отношения и деятельность:** нет.

Поступила 06/08-2023

Рецензия получена 21/09-2023

Принята к публикации 10/10-2023



**Для цитирования:** Кит О.И., Гненная Н.В., Филиппова С.Ю., Чембарова Т.В., Лысенко И.Б., Новикова И.А., Розенко Л.Я., Димитриади С.Н., Шалашная Е.В., Ишонина О.Г. Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(11):3691. doi:10.15829/1728-8800-2023-3691. EDN YCTTMM

### Cryostorage of peripheral blood hematopoietic stem cells in transplantology: current status and prospects

Kit O. I., Gnennaya N. V., Filippova S. Yu., Chembarova T. V., Lysenko I. B., Novikova I. A., Rozenko L. Ya., Dimitriadi S. N., Shalashnaya E. V., Ishonina O. G.  
National Medical Research Center of Oncology. Rostov-on-Don, Russia

Peripheral blood hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is a well-established procedure for the treatment of hematological, cancer and autoimmune diseases. In cancer patients, HSC transplantation allows the use of high-dose cytotoxic drugs in combination with radiation therapy during treatment, which provides a pronounced antitumor effect. The hematological toxicity of such treatment is eliminated by the sequential introduction of stem cells, which contribute to hematopoiesis restoration. Before transplantation, peripheral blood HSCs are subjected to collection and cryopreservation for further storage. An important requirement for cryopreservation is viable HSCs responsible for hematopoietic restoration. The aim

of the review was to analyze the literature devoted to the influence of various methods of cryopreservation of human peripheral blood HSCs on the preservation of cell viability after thawing, as well as the development of adverse events in patients. Issues related to the use of various cryoprotectants, as well as methods for storing HSC grafts, are considered. The presented data indicate the need for further study of the effect of cryoprotectants on the human body and the cellular composition of the graft and improvement of protocols for HSC cryopreservation.

**Keywords:** biobanking, hematopoietic stem cells, cryopreservation, cryoprotectants, transplantation.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
e-mail: ngnennaya@inbox.ru

[Кит О.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор, ORCID: 0000-0003-3061-6108, Гненная Н.В.\* — м.н.с. лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-3691-3317, Филиппова С.Ю. — н.с. лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-4558-5896, Чембарова Т.В. — м.н.с. лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-4555-8556, Лысенко И.Б. — д.м.н., профессор, зав. отделением онкогематологии, ORCID: 0000-0003-4457-3815, Новикова И.А. — д.м.н., зам. генерального директора по науке, ORCID: 0000-0002-6496-9641, Розенко Л.Я. — д.м.н., профессор, врач-радиотерапевт отделения радиотерапии № 2, ORCID: 0000-0001-7032-8595, Димитриади С.Н. — д.м.н., врач-уролог отделения онкоурологии, ORCID: 0000-0002-2565-1518, Шалашная Е.В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ORCID: 0000-0001-7742-4918, Ишонина О.Г. — к.б.н., зав. отделом подготовки и переподготовки специалистов, ORCID: 0000-0002-5300-1213].

**Relationships and Activities:** none.

Kit O.I. ORCID: 0000-0003-3061-6108, Gnennaya N.V.\* ORCID: 0000-0002-3691-3317, Filippova S.Yu. ORCID: 0000-0002-4558-5896, Chembarova T.V. ORCID: 0000-0002-4555-8556, Lysenko I.B. ORCID: 0000-0003-4457-3815, Novikova I.A. ORCID: 0000-0002-6496-9641, Rozenko L.Ya. ORCID: 0000-0001-7032-8595, Dimitriadi S.N. ORCID: 0000-0002-2565-1518, Shalashnaya E.V. ORCID: 0000-0001-7742-4918, Ishonina O.G. ORCID: 0000-0002-5300-1213.

\*Corresponding author: ngennaya@inbox.ru

**Received:** 06/08-2023

**Revision Received:** 21/09-2023

**Accepted:** 10/10-2023

**For citation:** Kit O.I., Gnennaya N.V., Filippova S.Yu., Chembarova T.V., Lysenko I.B., Novikova I.A., Rozenko L.Ya., Dimitriadi S.N., Shalashnaya E.V., Ishonina O.G. Cryostorage of peripheral blood hematopoietic stem cells in transplantology: current status and prospects. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(11):3691. doi:10.15829/1728-8800-2023-3691. EDNYTCTTM

ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, ДМСО — диметилсульфоксид, PIM — pentaisomaltose (пентаизомальтоза), КОЕ — колониеобразующие единицы, 7-AAD — 7-аминоактиномицин D.

### Ключевые моменты

#### Что известно о предмете исследования?

- Токсичность диметилсульфоксида диктует необходимость поиска новых агентов, обладающих криопротекторными свойствами.

#### Что добавляют результаты исследования?

- Приведены литературные данные о методах снижения негативного влияния диметилсульфоксида на клеточный состав трансплантата, а также рассмотрены вещества, которые сохраняют жизнеспособность гемопоэтических стволовых клеток, и могут рассматриваться как потенциальные криопротекторы для широкого использования в трансплантации.

### Key messages

#### What is already known about the subject?

- The toxicity of dimethyl sulfoxide dictates the need to search for novel cryoprotective agents.

#### What might this study add?

- Literary data on methods for reducing the negative effect of dimethyl sulfoxide on the cellular composition of a transplant are presented. Agents preserving the viability of hematopoietic stem cells are described and can be considered as potential cryoprotectants for widespread use in transplantation.

## Введение

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) представляют собой мультипотентные стволовые клетки, которые могут дифференцироваться в лимфоидные и миелоидные клетки-предшественники, давая начало лейкоцитам, эритроцитам и тромбоцитам. Трансплантация ГСК является одним из наиболее широко используемых методов клеточной иммунотерапии. Используют ее для лечения онкологических, а также гематологических и аутоиммунных заболеваний.

Выделяют две основные формы трансплантации ГСК:

- Аутологичная (аутогенная трансплантация) — происходит забор собственных ГСК пациента с их последующей реинфузией;

- Аллогенная (аллотрансплантация) — забор ГСК происходит от HLA-идентичного родственного донора, родственного либо неродственного донора, совместимого по HLA-генам, с последующей инфузией реципиенту [1, 2].

Множественная миелома и лимфома являются основными показаниями для аутогенной трансплантации, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, миелодиспластический синдром и миелопролиферативные новообразования — для ал-

лотрансплантации [3]. Проведение трансплантации ГСК также может быть использовано для лечения некоторых солидных опухолей, таких как герминогенные опухоли, нейробластомы [4], саркома Юинга [5] и медуллобластома [6].

Трансплантация ГСК представляет собой многоэтапную процедуру, включающую сбор ГСК периферической крови, проведение химиолучевого лечения с последующей инфузией ГСК с целью восстановления роста кроветворения. Аутогенная трансплантация ГСК позволяет реципиенту оправиться от аплазии костного мозга, которая неизбежно следует за высокодозной терапией, поэтому аутогенную трансплантацию следует рассматривать как форму спасательной терапии таких пациентов.

ГСК, используемые в трансплантации, могут быть получены из костного мозга, пуповинной или периферической крови [7]. Трансплантаты пуповинной крови содержат меньшее количество ГСК, чем трансплантаты, полученные из костного мозга или периферической крови, поэтому восстановление иммунитета при их применении, как правило, медленное. Кроме того, использование пуповинной крови ассоциировано с более высоким риском развития инфекционных осложнений и смерти в раннем посттрансплантационном периоде [8, 9].



крови — количество введенных CD34+ клеток. Принято считать, что количество CD34+ клеток, превышающее  $2,0 \times 10^6$  клеток/кг массы тела реципиента на момент сбора ГСК, является надежным предиктором успешного приживления нейтрофилов и тромбоцитов. Традиционно подсчет количества CD34+ клеток происходит перед криоконсервацией, следовательно, количество клеток после оттаивания не учитывается. В работе D’Rozario J, et al. (2014) оценивали количество CD34+ клеток во время сбора ГСК и после оттаивания, а также анализировали приживление нейтрофилов и тромбоцитов после проведения процедуры трансплантации ГСК. Было показано, что средняя потеря количества жизнеспособных CD34+ клеток при обработке и криоконсервации составляет ~33% от исходного количества. Однако низкое количество жизнеспособных CD34+ клеток, введенное после оттаивания, по-прежнему приводит к приживлению нейтрофилов, но может влиять на скорость приживления тромбоцитов [16].

Несмотря на то, что предиктором успешного приживления принято считать количество введенных CD34+ клеток, значительная потеря CD3+ клеток также может быть клинически значимой, поскольку инфузия недостаточного количества CD3+ клеток при аллотрансплантации может ухудшить предполагаемый эффект "трансплантат против лейкемии" [17]. В работе Araujo AB, et al. (2021) проведена оценка влияния концентрации клеток, а также процессов криоконсервации и оттаивания на жизнеспособность и функциональность ГСК. Было показано, что продолжительность хранения, а также концентрация ядродержащих клеток оказывали негативное влияние на жизнеспособность CD45+ и CD34+ клеток, а также их функциональную активность [18].

Помимо клеточного состава трансплантата при проведении процедуры криоконсервации важно учитывать условия пробоподготовки. Поскольку при добавлении диметилсульфоксида (ДМСО) к ГСК происходит экзотермическая реакция, существует опасение, что высвобождение энергии может спровоцировать повреждение клеток. Dijkstra-Tiekstra MJ, et al. (2014) провели исследование с использованием предварительно охлажденного ДМСО, а также с использованием предварительно охлажденного лейкоконцентрата. Было показано, что предварительное охлаждение оказывает минимальное влияние на скорость восстановления лейкоцитов [19].

После криоконсервации наблюдаются высокие уровни апоптотических клеток CD34+ (до 30%), что коррелирует со сниженной способностью к приживлению, замедленным восстановлением нейтрофилов после аутоаллотрансплантации ГСК [20]. Точные механизмы криоповреждения, приводящие к потере жизнеспособности криоконсервированных клеток остаются малоизученными. Су-

ществуют два механизма негативного воздействия замораживания/оттаивания на клетки: (1) механическое повреждение клеточных мембран кристаллами льда при замораживании; (2) осмотическое повреждение клеток вследствие резкого увеличения концентрации растворенных веществ в оставшейся жидкой фазе при оттаивании. Принято считать, что значительное влияние на жизнеспособность клеток оказывают две переменные: скорость охлаждения трансплантата и концентрация криопротектора. При быстром замораживании клетки замерзают до того, как произойдет выравнивание осмотического давления. Это связано с ограниченной пропускной способностью клеточных мембран, что приводит к образованию внутриклеточного льда, вызывающего механическое повреждение клеток. Поэтому существует некоторая выживаемость клеток при оптимальной скорости охлаждения, которая обеспечит сохранность ГСК [21]. Замораживание с контролируемой скоростью является наиболее распространенным методом криоконсервации. Однако данный способ является сложной, длительной и финансово затратной процедурой. Поэтому активно растет интерес к процессу замораживания с неконтролируемой скоростью с использованием стандартных морозильных камер, который можно легко адаптировать в условиях ограниченных ресурсов. Тем более, что консервация с неконтролируемой скоростью не приводит к существенному снижению эффективности трансплантации ГСК периферической крови [22]. С целью изучения и проверки более простых и экономичных способов заморозки ГСК, Calvet L, et al. (2012) провели клиническое исследование 342 аутоаллотрансплантатов после хранения в течение 3, 6 и 12 мес. при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . У наблюдаемых пациентов отмечалось успешное приживление трансплантатов и восстановление кроветворения [23]. В работе Detry G, et al. (2014) также было установлено, что на восстановление кроветворения длительное (>1 года) хранение трансплантата при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  негативного влияния не оказывало [24].

К повреждению ГСК приводит не только слишком быстрая заморозка, но и слишком медленное оттаивание, что связывают с растрескиванием и рекристаллизацией воды с последующим механическим повреждением мембран клеток. Однако это только гипотеза, поскольку почти ничего неизвестно о возможной роли биомолекул в механизмах повреждения клеток, появляющихся в процессе оттаивания [25].

#### **Влияние криопротектора на ГСК**

Негативное влияние на жизнеспособность и состав ГСК способны оказывать и криопротекторы, поэтому актуальным остается вопрос поиска новых криопротекторов с минимальными побочными эффектами. Наиболее часто используе-

мым криопротектором является ДМСО. Помимо ДМСО криопротекторными свойствами обладают глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль, поливинилпирролидон, полиэтиленоксид, гидроксипропиленкрахмал. Однако, в силу различных причин, эти вещества не нашли активного применения в рутинной практике [26].

Процедура криоконсервации ГСК характеризуется высокой неоднородностью между различными учреждениями. Отличия касаются многих факторов, которые способны повлиять на качество ГСК после оттаивания. Особенно пристальное внимание уделяется конечной концентрации ДМСО. Предполагается, что состав разбавителя ДМСО может потенциально оказывать влияние на качество трансплантата, однако, в отношении ГСК периферической крови, данный вопрос широко не исследовался. Сильно могут различаться и используемые в процедуре криоконсервации растворы криопротекторов.

#### **Фармакологические свойства ДМСО**

ДМСО представляет собой небольшую амфифильную молекулу с гидрофильной сульфоксидной группой и двумя гидрофобными метильными группами, обладающую сродством как к полярным, так и к неполярным растворителям. Амфифильная природа ДМСО является, по-видимому, важной определяющей характеристикой его действия на мембраны. Ключевой аспект механизма действия ДМСО — способность вызывать образование пор в мембранах клеток, чем объясняется значительное повышение их проницаемости для гидрофильных молекул. Поскольку ДМСО легко проникает через мембраны, его активно используют в качестве криопротектора. В исследовании Gurtovenko AA и Anwar J (2007) было показано, что выбор концентрации ДМСО имеет решающее значение. Авторами было рассмотрено 14 различных молярных концентраций ДМСО от 0 до 100%. Было показано, что ДМСО оказывает различное действие на клеточные мембраны в зависимости от его концентрации. При концентрации <10% ДМСО приводит к значительному латеральному расширению мембраны с одновременным уменьшением ее толщины. При концентрации ДМСО в диапазоне 10-20% наблюдается образование пор в дополнение к прогрессирующему истончению мембраны. Дальнейшее увеличение концентрации ДМСО приводит к десорбции отдельных молекул липидов с поверхности мембраны с последующим разрушением ее бислоевой липидной структуры [27]. Кроме того, нарастание количества молекул ДМСО в растворе снижает температуру его замерзания [28].

Как правило, конечная концентрация ДМСО при криоконсервации ГСК составляет 10%. Однако несмотря на то, что протоколы использования данного криопротектора в биологии и медицине уже

давно разработаны и активно внедрены в практику, определение оптимальной концентрации ДМСО во многом обусловлено эмпирическим подходом.

#### **Влияние ДМСО на организм человека**

Непосредственно перед трансплантацией клеточный продукт размораживают на водяной бане при температуре 37° С. Трансплантация размороженных ГСК часто сопровождается развитием у пациентов побочных реакций. Общие побочные реакции, вызываемые ДМСО, включают тошноту, рвоту, боли в животе. Они имеют место у 50% пациентов. Реже сообщается о побочных эффектах со стороны сердечно-сосудистой системы в виде гипертонии и аритмии, а также со стороны дыхательной системы с остановкой дыхания и диффузным альвеолярным кровотечением [29]. Эти эффекты могут быть обусловлены не только непосредственным действием ДМСО, но и высвобождением гистамина, индуцированным ДМСО; при этом механизмы некоторых сердечно-сосудистых побочных эффектов могут быть многофакторными [30].

Побочные реакции со стороны центральной нервной системы, такие как эпилептические припадки, инсульт, временная лейкоэнцефалопатия, бывают еще реже [31, 32]. Предполагается, что в основе патофизиологии подобных процессов лежит острая вазоконстрикция или прямое проникновение ДМСО через гематоэнцефалический барьер и прямое токсическое воздействие на мозг [33].

Несмотря на то, что токсическая доза ДМСО для человека не определена, считается, что тяжесть оказываемого токсического влияния на мозг и другие органы связана с количеством ДМСО, присутствующим в трансплантате, а также со скоростью его введения. Принято считать, что максимальная рекомендуемая доза ДМСО для введения за один сеанс составляет 1 г/кг массы тела пациента или 10 мл/кг 10% раствора ДМСО. Когда объем для инфузии превышает данный предел, следует разделять трансплантат на две или три части с интервалом между введениями в несколько часов или дней с целью уменьшения токсического действия ДМСО [34]. В работе González-López T, et al. (2011) описывается случай развития ишемического инсульта во время инфузии аутотрансплантата ГСК, криоконсервированного с использованием ДМСО, несмотря на то что максимальная рекомендуемая доза вводимого ДМСО не была достигнута. Предполагается, что токсичность ДМСО может быть идиосинкратической [35].

Помимо дробления дозы на несколько частей, еще одним способом уменьшения побочных реакций на введение трансплантата с ДМСО является использование более низких концентраций криопротектора. В работе Mitrus I, et al. (2013) исследовали влияние концентрации ДМСО (10, 7,5 и 5%) на приживление трансплантата и частоту побочных явлений у пациентов. Установлено, что самая

низкая частота побочных реакций наблюдалась в группе пациентов, получавших трансплантат с 5% ДМСО [36]. Концентрация ДМСО 7,5% благоприятно сказывалась на скорости восстановления лейкоцитов [37], тогда как при концентрации ДМСО 10% восстановление ядерных клеток и клоногенного потенциала клеток снижалось [38].

Одним из способов уменьшения общего объема, переливаемого ДМСО с целью снижения риска нежелательных явлений, является промывание трансплантата после оттаивания физиологическим раствором с последующим добавлением антикоагулянта, в качестве которого выступает цитрат декстрозы. Однако такой подход трудозатратен и связан со значительной потерей жизнеспособных клеток CD34+, что приводит к увеличению времени восстановления тромбоцитов после трансплантации [39, 40]. Таким образом, несмотря на то что предварительное удаление ДМСО из трансплантата может снизить частоту возникновения побочных реакций у пациентов, данная процедура создает риск повреждения трансплантата. Кроме того, вследствие увеличения количества манипуляций с трансплантатом увеличивается риск его контаминации.

Некоторые учреждения используют ДМСО, разведенный 5% сывороточным альбумином человека в 0,9% растворе хлорида натрия (NaCl). Данная процедура позволяет предотвратить осмотический шок клеток, а также снизить количество выделяемого тепла при смешивании клеток трансплантата с неразбавленным раствором ДМСО. В то же время, поскольку современная практика работы с коммерческими препаратами сывороточного альбумина человека по-прежнему связана с высоким риском контаминации, в качестве альтернативной замены Smagug A, et al. (2015) [41] предлагают использовать аутологичную плазму, получаемую в ходе процедуры лейкафереза. Данная процедура позволяет проводить приготовление криозащитной среды "в закрытой системе". При этом важно учитывать, что в случае использования аутологичной плазмы, содержание белка в криоконсервирующем растворе может быть переменным из-за различной концентрации альбумина и других белков плазмы. В своей работе авторы поставили цель оценить качество трансплантата и скорость его приживления при использовании криозащитного раствора с аутологичной плазмой. Результаты исследования показали, что медиана восстановления ядерных клеток и колониеобразующих единиц (КОЕ) не различались между криозащитными смесями с аутоплазмой и сывороточным альбумином человека. По клинической оценке, среднее время восстановления лейкоцитов, тромбоцитов и нейтрофилов было сопоставимо в обеих группах [41].

#### **Влияние ДМСО на ГСК периферической крови**

Наиболее важным фактором, связанным с восстановлением гемопоэза, считается количество

введенных CD34+ клеток [42, 43]. Ряд переменных в процессе криоконсервации может влиять на качество и количество жизнеспособных CD34+ клеток в трансплантате, в частности, общее количество ядерных клеток, количество лейкоцитов, криопротектор, условия процессов замораживания/оттаивания, продолжительность хранения [44]. Имеется ряд исследований, посвященных оценке влияния ДМСО на жизнеспособность ядерных клеток, восстановление CD34+ клеток, количество жизнеспособных CD34+ клеток, клеток, находящихся в состоянии апоптоза после оттаивания, а также клоногенный потенциал ГСК. Veeraputhiran M, et al. (2010) в результате анализа 262 образцов ГСК, замороженных с использованием 5 и 10% ДМСО, методом проточной цитометрии показали, что статистически значимая разница в жизнеспособности CD34+ клеток между группами отсутствует, как не было различий и в жизнеспособности в зависимости от периода криохранения, а также времени приживления лейкоцитов и тромбоцитов [45]. В работе Abrahamsen JF, et al. (2002) оценивали изменения жизнеспособности, апоптоза, а также некроза CD34+ клеток, криоконсервированных в 5 и 10% растворах ДМСО. Образцы подвергали криоконсервации с контролируемой скоростью с последующим хранением в жидком азоте на протяжении от 3 до 22 мес. Оценку количества жизнеспособных клеток CD34+, а также доли апоптотических и некротических клеток в образцах после оттаивания проводили с использованием метода проточной цитометрии. Результаты данного исследования показали, что по количеству жизнеспособных клеток образцы, криоконсервированные с 5 и 10% ДМСО, не различались, однако доля апоптотических и некротических CD34+ клеток была значительно ниже в образцах, замороженных с использованием 5% раствора ДМСО [46].

Считается, что общая жизнеспособность ядерных клеток трансплантата не является подходящим методом оценки состояния ГСК, поскольку CD34+ клетки демонстрируют более высокую устойчивость к повреждениям, связанным с криоконсервацией, по сравнению с другими лейкоцитами. Поэтому более ценным предиктором приживления ГСК служит оценка жизнеспособных CD34+ клеток после оттаивания трансплантата с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Однако некоторые авторы ставят под сомнение клиническую полезность этого метода, отдавая предпочтение оценке способности CD34-экспрессирующих клеток формировать колонии клеток *in vitro*, т.к. показатель колониеобразующей способности клеток позволяет оценить количество не просто живых клеток, но клеток, способных к восстановлению гемопоэза [47].

Несмотря на то, что ДМСО используется в качестве криопротектора уже >50 лет, его краткосроч-

ное и долгосрочное воздействия на функциональный потенциал, а также клеточный состав трансплантата ГСК периферической крови остаются малоизученными. Имеются исследования, показывающие, что использование ДМСО снижает экспрессию факторов транскрипции, таких как *Oct-4*, *Sox-2*, *Nanog* и *Rex-1*, специфичных для эмбриональных стволовых клеток человека [48, 49], а также влияние на эпигенетическое состояние клеток [50]. Предполагается, что добавление новых криопротекторов позволит улучшить жизнеспособность клеток после оттаивания и повысит успешность трансплантации [51].

#### Альтернативные криоконсерванты

В настоящее время существует значительный интерес к разработке новых криопротекторных растворов, которые по своей эффективности не уступали бы ДМСО, но при этом оказывали менее токсичное воздействие на организм человека. Одним из перспективных классов криопротекторов являются низкомолекулярные углеводы. Так, в работе Wu LK, et al. (2011) сообщается о том, что добавление в раствор криопротектора моно- и дисахаридов, обладающих способностью ингибировать рекристаллизацию льда, защищает CD34+ клетки от криоповреждения. Было показано, что трегалоза и сахароза при добавлении к ДМСО способны сохранять ГСК также эффективно, как и 10% ДМСО [52]. Эффективность оценивалась с точки зрения сохранения клоногенного потенциала клеток, их жизнеспособности и количества CD45+/34+, а использование 0,3 М сахарозы с 5% ДМСО приводило к улучшению функциональной способности ГСК [53]. Трегалоза, являясь внеклеточным криопротектором, может посредством липосом транспортироваться внутрь клетки, увеличивая, тем самым, количество сохраняемых клеток при криоконсервации трансплантата. В исследовании Motta JPR, et al. (2014) оценивали жизнеспособность ГСК пуповинной крови после оттаивания с использованием красителя 7-аминоактиномицина D (7-AAD), количественным определением CD45+/CD34+, МТТ-теста, а также анализом КОЕ. Была показана эффективность раствора, содержащего внутри- и внеклеточную трегалозу, используемого для криоконсервации клеток пуповинной крови, эквивалентную текущему стандарту 10% ДМСО [54]. Svalgaard JD, et al. (2016) провели сравнительную оценку восстановления жизнеспособных клеток CD34+, а также анализ колониеобразующих клеток образцов ГСК периферической крови *in vitro*. В качестве криопротекторов использовался 10% ДМСО или 16% раствор низкомолекулярного углевода пентаизомальтозы (pentaisomaltose, PIM). Было показано, что эффективность PIM в качестве криопротектора ГСК периферической крови эквивалентна таковой для ДМСО. Также не было обна-

ружено различий ни в отношении восстановления CD34+ клеток, ни в потенциале КОЕ [55]. Предполагается, что PIM может заменить ДМСО в качестве безопасного и эффективного криопротектора. Использование PIM может устранить необходимость инфузии охлажденного клеточного продукта, которая необходима, если используется ДМСО. Кроме того, PIM быстро выводится посредством клубочковой фильтрации и при деградации не образует вредных метаболитов в организме человека. Важным преимуществом данного криопротектора является его неспособность проникать через клеточную мембрану [56].

Помимо углеводов внимание исследователей привлекает новый класс криопротекторов на основе N-акрил-d-альдонамидов. В работе Briard JG, et al. (2016) сообщается о способности молекул этого класса ингибировать рекристаллизацию льда. При добавлении к обычному раствору криопротекторов эти малые нетоксичные молекулы позволяли сохранять колониеобразующую способность CD34+ клеток [57].

Клеточная мембрана является наиболее уязвимым компонентом клетки, поскольку при криоконсервации вещества, проникающие внутрь клетки, способны изменять и даже разрушать ее структуру. ДМСО, проникая через клеточную мембрану, способен вызывать ее ослабление, а также образовывать в ней поры. Следовательно, для обеспечения жизнеспособности клеток и сохранения их функциональной активности клеточная мембрана должна быть защищена от повреждений во время процедуры замораживания/оттаивания. Белки-антифризы, полимеры-антифризы, а также гликопептиды привлекают внимание как эффективные вещества, подавляющие образование кристаллов льда и способные стабилизировать мембранные фосфолипиды. Электростатические взаимодействия, гидрофобные взаимодействия и водородные связи являются основополагающими во влиянии белков-антифризов и сахаров на клеточную мембрану. Кроме того, внимание исследователей привлекают жирные кислоты, такие как стеарат, а также холестерин, поскольку они используются в качестве скаффолдов для доставки на поверхность клеточной мембраны физиологически активных веществ, удерживаемых на мембране с помощью липидного якоря. Встраивание липидного якоря в клеточную мембрану может обеспечить ее защиту в процессе криоконсервации. С целью поиска новых соединений, обладающих криопротекторными свойствами, Yoshida K, et al. (2021) синтезировали вещество, являющееся производным трегалозы, олеил-трегалозу, в котором олеильная группа и трегалоза представляют собой гидрофобную и гидрофильную части, соответственно [58]. Олеиновая кислота в составе полученного соединения

служит липидным якорем. Выбор этой кислоты обусловлен тем, что только якорь с ненасыщенной липидной цепью может быть прикреплен к клеточной мембране, не оказывая при этом негативного влияния на липидные рафты (особые мембранные домены) и клеточные сигналы. Для обеспечения вставки липидного якоря в клеточную мембрану необходимо, чтобы вещество обладало и гидрофильными свойствами. С этой целью использовали трегалозу, как вещество с уже известными криопротекторными свойствами. Трегалоза ингибирует образование кристаллов льда и стабилизирует клеточную мембрану посредством образования водородных связей с водой и фосфолипидами клеточных мембран. Полученное вещество, благодаря своим свойствам, не способно проникать через клеточную мембрану, поэтому авторы рекомендуют рассматривать его использование в сочетании с криопротектором, способным проникать внутрь мембраны. Исследователи продемонстрировали криопротекторные свойства олеил-трегалозы на гепатоцитах, показав, что ее применение в сочетании с ДМСО привело к увеличению количества жизнеспособных и функционально активных клеток в сравнении с применением только 10% ДМСО без олеил-трегалозы.

## Литература/References

- Balassa K, Danby R, Rocha V. Haematopoietic stem cell transplants: principles and indications. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2019; 80(1):33-9. doi:10.12968/hmed.2019.80.1.33.
- Afanasiev BV, Zubarovskaya LS, Alyanskiy AL, et al. Selection of donor of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2016; 3(3):30-6. (In Russ.) Афанасьев Б. В., Зубаровская Л. С., Алянский А. Л. и др. Выбор донора при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО)*. 2016;3(3):30-6. doi:10.15829/1560-4071-2011-6-4-8.
- Firsova MV, Mendeleeva LP, Parovichnikova EN, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Terapevticheskii Arkhiv*. 2021;93(7):778-84. (In Russ.) Фирсова М. В., Менделеева Л. П., Паровичникова Е. Н. и др. Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток пациентам с множественной миеломой. *Терапевтический архив*. 2021;93(7):778-84. doi:26442/00403660.2021.07.200929.
- Adra N, Abonour R, Althouse SK, et al. High-Dose Chemotherapy and Autologous Peripheral-Blood Stem-Cell Transplantation for Relapsed Metastatic Germ Cell Tumors: The Indiana University Experience. *J Clin Oncol*. 2017;35(10):1096-102. doi:10.1200/JCO.2016.69.5395.
- Laurence V, Pierga JY, Barthier S, et al. Long-term follow up of high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue in adults with Ewing tumor. *Am J Clin Oncol*. 2005;28(3):301-9. doi:10.1097/01.coc.0000156921.28880.e1.
- Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, et al. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2006;7(10):813-20. doi:10.1016/S1470-2045(06)70867-1.
- Sureda A, Bader P, Cesaro S, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(8):1037-56. doi:10.1038/bmt.2015.6.
- Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813-26. doi:10.1056/NEJMra052638.
- Keever-Taylor CA. Immune Reconstitution after Allogeneic Transplantation. *HSCT*. 2008;377-420. doi:10.1007/978-1-59745-438-4\_18.
- Miller JP, Perry EH, Price TH, et al. Recovery and Safety Profiles of Marrow and PBSC Donors: Experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(9):29-36. doi:10.1016/j.bbmt.2008.05.018.
- Stem Cell Trialists' Collaborative Group. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5074-87. doi:10.1200/JCO.2005.09.020.
- Friedrichs B, Tichelli A, Bacigalupo A, et al. Long-term outcome and late effects in patients transplanted with mobilised blood or bone marrow: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(4):331-8. doi:10.1016/S1470-2045(09)70352-3.
- Sugiyanto M, Gosal S, Kosim A, et al. Impact of the source of hematopoietic stem cells on immune reconstitution after transplantation: A systematic review. *Eur J Haematol*. 2023;111(1):4-14. doi:10.1111/ejh.13966.
- Mohanna A, Owaidah A, Albahrani A, et al. Validation of long-term handling and storage conditions for hematopoietic stem cell products for autologous transplants. *J Med Life*. 2023;16(4):515-9. doi:10.25122/jml-2022-0230.

## Заключение

Криоконсервация ГСК требует учета нескольких факторов, включая состав раствора криопротектора, концентрацию клеток, а также скорость замораживания/оттаивания образца и температуру хранения. Большая часть исследований, посвященных криоконсервации ГСК, сосредоточена на оптимизации протоколов криоконсервации, которые бы сводили к минимуму изменения в трансплантате после оттаивания. Растворы для криоконсервации, содержащие 10% ДМСО, до сих пор широко используются на практике, однако появляется все больше информации о повреждающем влиянии данного криопротектора на ГСК и его токсическом действии на организм человека.

Разработка эффективных методов криоконсервации без использования ДМСО или с уменьшенным его содержанием, обеспечивающих высокую жизнеспособность трансплантата после оттаивания — ключевой момент, играющий существенную роль в повышении безопасности процедуры трансплантации ГСК и увеличении ее эффективности.

**Отношения и деятельность:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

15. Gal'tseva IV, Davydova YuO, Gaponova TV, et al. Absolute numbers of peripheral blood CD34+ hematopoietic stem cells prior to a leukapheresis procedure as a parameter predicting the efficiency of stem cell collection. *Terapevticheskiy Arkhiv*. 2017;89(7):18-24. (In Russ.) Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Гапонова Т.В. и др. Абсолютное количество гемопоэтических стволовых клеток CD34+ в периферической крови перед процедурой лейкофереза как параметр, прогнозирующий эффективность сбора стволовых клеток. *Терапевтический архив*. 2017;89(7):18-24. doi:10.17116/terarkh201789718-24.
16. D'Rozario J, Parisotto R, Stapleton J, et al. Pre infusion, post thaw CD34+ peripheral blood stem cell enumeration as a predictor of haematopoietic engraftment in autologous haematopoietic cell transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2014;50(3):443-50. doi:10.1016/j.transci.2014.02.021.
17. Chang Y-J, Huang X-J. Donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic transplantation. When, if and for whom? *Blood Rev*. 2013;27(1):55-62. doi:10.1016/j.blre.2012.11.002.
18. Araújo AB, Salton GD, Angeli MH, et al. Effects of cell concentration, time of fresh storage, and cryopreservation on peripheral blood stem cells. *Transfus Apher Sci*. 2022;61(1):103298. doi:10.1016/j.transci.2021.103298.
19. Dijkstra-Tiekstra MJ, Setroikromo AC, Kraan M, et al. Optimization of the freezing process for hematopoietic progenitor cells: effect of precooling, initial dimethyl sulfoxide concentration, freezing program, and storage in vapor-phase or liquid nitrogen on in vitro white blood cell quality. *Transfusion*. 2014;54(12):3155-63. doi:10.1111/trf.12756.
20. Wu L, Al-Hejazi A, Filion L, et al. Increased apoptosis in cryopreserved autologous hematopoietic progenitor cells collected by apheresis and delayed neutrophil recovery after transplantation: a nested case-control study. *Cytotherapy*. 2012;14(2):205-14. doi:10.3109/14653249.2011.610302.
21. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp Cell Res*. 1972;71(2):345-55. doi:10.1016/0014-4827(72)90303-5.
22. Arora S, Setia R, Handoo A, et al. Outcome of 51 autologous peripheral blood stem cell transplants after uncontrolled-rate freezing ("dump freezing") using -80°C mechanical freezer. *Asian J Transfus Sci*. 2018;12(2):117. doi:10.4103/ajts.ajts\_42\_17.
23. Calvet L, Cabrespine A, Boiret-Dupré N, et al. Hematologic, immunologic reconstitution, and outcome of 342 autologous peripheral blood stem cell transplantations after cryopreservation in a -80°C mechanical freezer and preserved less than 6 months. *Transfusion*. 2013;53(3):570-8. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03768.x.
24. Detry G, Calvet L, Straetmans N, et al. Impact of uncontrolled freezing and long-term storage of peripheral blood stem cells at -80° C on haematopoietic recovery after autologous transplantation. Report from two centres. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(6):780-5. doi:10.1038/bmt.2014.53.
25. Wang M, Karlsson JOM, Aksan A. FTIR Analysis of Molecular Changes Associated with Warming Injury in Cryopreserved Leukocytes. *Langmuir*. 2018;35(23):7552-9. doi:10.1021/acs.langmuir.8b02982.
26. Zubairov RR, Korotayev YeV, Rabinovich VI. Cryopreservation and cryogenic storage of hemopoietic stem cells. HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. 2011;3(2):39-48. (In Russ.) Зубаиров Р.Р., Коротаев Е.В., Рабинович В.И. Криоконсервация и криохраниение гемопоэтических стволовых клеток. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011;3(2):39-48.
27. Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *J Phys Chem B*. 2007;111(35):10453-60. doi:10.1021/jp073113e.
28. Hornberger K, Yu G, McKenna D, Hubel A. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Assays, Cryoprotectant Agents, and Technology to Improve Outcomes. *Transfus Med Hemotherapy*. 2019;46(3):188-96. doi:10.1159/000496068.
29. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2013;49(4):469-76. doi:10.1038/bmt.2013.152.
30. Mancias-Guerra C, Sánchez-García SA, Carreño-Salcedo SA, et al. Dimethyl sulfoxide toxicity in umbilical cord blood transplantation in patients less than 4.5 kilos of weigh. *Hematology, Transfus Cell Therapy*. 2023;45(1):1-4. doi:10.1016/j.htct.2021.04.009.
31. Marcacci G, Corazzelli G, Becchimanzi C, et al. DMSO-associated encephalopathy during autologous peripheral stem cell infusion: a predisposing role of preconditioning exposure to CNS-penetrating agents? *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(2):133-5. doi:10.1038/bmt.2008.442.
32. Ataseven E, Tüfekçi Ö, Yılmaz Ş, et al. Neurotoxicity Associated With Dimethyl Sulfoxide Used in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39(5):e297-9. doi:10.1097/MPH.0000000000000784.
33. Windrum P, Morris TCM, Drake MB, et al. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(7):601-3. doi:10.1038/sj.bmt.1705100.
34. Júnior A, Arrais C, Saboya R, et al. Neurotoxicity associated with dimethylsulfoxide-preserved hematopoietic progenitor cell infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:95-6. doi:10.1038/sj.bmt.1705883.
35. González-López T, Sánchez-Guijo F, Ortín A, et al. Ischemic stroke associated with the infusion of DMSO-cryopreserved auto-PBSCs. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:1035-6. doi:10.1038/bmt.2010.242.
36. Mitrus I, Smagur A, Fidyk W, et al. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% and 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation: results of a prospective, randomized study. *Bone Marrow Transplant*. 2017;53(3):274-80. doi:10.1038/s41409-017-0056-6.
37. Mitrus I, Smagur A, Giebel S, et al. A faster reconstitution of hematopoiesis after autologous transplantation of hematopoietic cells cryopreserved in 7.5% dimethyl sulfoxide if compared to 10% dimethyl sulfoxide containing medium. *Cryobiology*. 2013;67(3):327-31. doi:10.1016/j.cryobiol.2013.09.167.
38. Smagur A, Mitrus I, Giebel S, et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox Sanguinis*. 2013;104:240-7. doi:10.1111/j.1423-0410.2012.01657.x.
39. Foïs E, Desmartin M, Benhamida S, et al. Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(9):831-5. doi:10.1038/sj.bmt.1705830.
40. Akkök ÇA, Holte MR, Tangen JM, et al. Hematopoietic engraftment of dimethyl sulfoxide-depleted autologous peripheral blood progenitor cells. *Transfusion*. 2009;49(2):354-61. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01949.x.
41. Smagur A, Mitrus I, Ciomber A, et al. Comparison of the cryoprotective solutions based on human albumin vs. autologous plasma: its effect on cell recovery, clonogenic potential of peripheral blood hematopoietic progenitor cells and engraftment

- after autologous transplantation. *Vox Sanguinis*. 2015;108(4): 417-24. doi:10.1111/vox.12238.
42. Jeyaraman P, Borah P, Dayal N, et al. Adequate Engraftment With Lower Hematopoietic Stem Cell Dose. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020;20(4):260-3. doi:10.1016/j.clml.2019.12.018.
43. Fernandez-Sojo J, Cid J, Azqueta C, et al. Post thawing viable CD34+ Cells dose is a better predictor of clinical outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2022;57(8):1341-3. doi:10.1038/s41409-022-01722-6.
44. Watts MJ, Linch DC. Optimisation and quality control of cell processing for autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2016;175(5):771-83. doi:10.1111/bjh.14378.
45. Veeraputhiran M, Theus JW, Pesek G, et al. Viability and engraftment of hematopoietic progenitor cells after long-term cryopreservation: effect of diagnosis and percentage dimethyl sulfoxide concentration. *Cytotherapy*. 2010;12(6):764-6. doi:10.3109/14653241003745896.
46. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud Ø. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion*. 2002;42(12):1573-80. doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00242.x.
47. Balashova VA, Rugal' VI, Bessmeltsev SS, et al. Correlation of CD34+ Hematopoietic Stem Cells and CFU in Peripheral Blood Apheresis Products in Patients with Malignant Lymphoproliferative Diseases Before and After Cryopreservation Prior to auto-HSCT. *Clinical oncohematology*. 2018;11(4):368-77. (In Russ.) Балашова В. А., Ругаль В. И., Бессмельцев С. С. и др. Корреляция гемопоэтических стволовых клеток CD34+ и колониобразующих единиц в продуктах афереза периферической крови у пациентов со злокачественными лимфопролиферативными заболеваниями до и после криоконсервирования перед аутоТГСК. *Клиническая онкогематология*. 2018;11(4):368-77. doi:10.21320/2500-2139-2018-11-4-368-377.
48. Pal R, Mamidi MK, Das AK, et al. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Arch Toxicol*. 2011;86(4):651-61. doi:10.1007/s00204-011-0782-2.
49. Katkov II, Kim MS, Bajpai R, et al. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology*. 2006;53(2):194-205. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.05.005.
50. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*. 2006;24(11):2549-56. doi:10.1634/stemcells.2005-0427.
51. Kaushal R, Jahan S, McGregor C, et al. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation solutions for hematopoietic stem cell grafts. *Cytotherapy*. 2022;24(3):272-81. doi:10.1016/j.jcyt.2021.09.002.
52. Wu LK, Tokarew JM, Chaytor JL, et al. Carbohydrate-mediated inhibition of ice recrystallization in cryopreserved human umbilical cord blood. *Carbohydr Res*. 2011;346(1):86-93. doi:10.1016/j.carres.2010.10.016.
53. Petrenko YA, Jones DR, Petrenko AY. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium. *Cryobiology*. 2008;57(3):195-200. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.08.003.
54. Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, et al. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*. 2014;68(3):343-8. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.04.007.
55. Svalgaard JD, Haastrup EK, Reckzeh K, et al. Low-molecular-weight carbohydrate Pentaisomaltose may replace dimethyl sulfoxide as a safer cryoprotectant for cryopreservation of peripheral blood stem cells. *Transfusion*. 2016;56(5):1088-95. doi:10.1111/trf.13543.
56. Klotz U, Kroemer H. Clinical pharmacokinetic considerations in the use of plasma expanders. *Clin Pharmacokinet*. 1987;12(2): 123-35. doi:10.2165/00003088-198712020-00003.
57. Briard JG, Jahan S, Chandran P, et al. Small-Molecule Ice Recrystallization Inhibitors Improve the Post-Thaw Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *ACS Omega*. 2016; 1(5):1010-8. doi:10.1021/acsomega.6b00178.
58. Yoshida K, Ono F, Chouno T, et al. Creation of a novel lipid-trehalose derivative showing positive interaction with the cell membrane and verification of its cytoprotective effect during cryopreservation. *J Biosci Bioeng*. 2021;132(1):71-80. doi:10.1016/j.jbiosc.2021.03.010.