

ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Заикина Е.В.¹, Гончарова А.С.¹, Позднякова В.В.¹, Пандова О.В.¹, Пржедецкий Ю.В.¹, Воловик В.Г.², Карасев Т.С.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону;

²Муниципальное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону», e-mail: katherine_bio@mail.ru

Основные стратегии криоконсервации включают два основных криопротекторных механизма: образование стекловидной фазы и обратимую дегидратацию клеток. Однако используемые методы несовершенны, с чем связаны трудности сохранения фенотипических и функциональных особенностей биологического образца. Криопротекторные свойства используемого вещества должны сочетаться с низкой токсичностью и пригодностью для животных клеток, однако использование стандартных антифризных соединений приводит к потере фенотипических и функциональных характеристик биологического материала. Криобиология представляется перспективным направлением, которое позволит оптимизировать существующие и разработать новые способы криоконсервации, а также минимизировать токсические эффекты применяемых криопротекторных агентов. Возможность длительного сохранения жизнеспособности биологического материала играет важное значение в различных областях биологии, экспериментальной и клинической медицины, животноводства, а также сельского хозяйства и культивации растений. Целью настоящего научного обзора явилось обобщение данных отечественных и зарубежных исследований и формирование представления об отличительных особенностях различных способов криоконсервации, используемых в различных областях современной науки. Был проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной использованию различных способов криоконсервации органов и тканей, а также биосовместимости различных криопротекторных агентов.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротекторы, антифризные белки, 2D-криоконсервация, 3D-криоконсервация, скаффолды.

REVIEW OF MODERN METHODS OF CRYOPRESERVATION OF VARIOUS TYPES OF BIOLOGICAL MATERIAL

Zaikina E.V.¹, Goncharova A.S.¹, Pozdnyakova V.V.¹, Pandova O.V.¹, Przhedetsky Yu.V.¹, Volovik V.G.², Karasev T.S.¹

¹ Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Centre for Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don;

²Municipal Budgetary Healthcare Institution "City Hospital No. 20 of Rostov-on-Don", e-mail: katherine_bio@mail.ru

The main cryopreservation strategies include two main cryoprotective mechanisms: vitreous phase formation and reversible cell dehydration. However, the methods used are imperfect, which is why it is difficult to preserve the phenotypic and functional features of a biological sample. The cryoprotective properties of the substance used should be combined with low toxicity and suitability for animal cells, however, the use of standard antifreeze compounds leads to a loss of the phenotypic and functional characteristics of the biological material. Cryobiology seems to be a promising direction that will optimize existing and develop new methods of cryopreservation, as well as minimize the toxic effects of cryoprotective agents used. The possibility of long-term preservation of the viability of biological material plays an important role in various fields of biology, experimental and clinical medicine, animal husbandry, as well as agriculture and plant cultivation. The purpose of this scientific review was to summarize the data of domestic and foreign studies and to form an idea of the distinctive features of various cryopreservation methods used in various fields of modern science. The analysis of domestic and foreign literature devoted to the use of various methods of cryopreservation of organs and tissues, as well as the biocompatibility of various cryoprotective agents was carried out.

Keywords: cryopreservation, cryoprotectors, antifreeze proteins, 2D cryopreservation, 3D cryopreservation, scaffolds.

По мере развития биологических и медицинских наук важность выбора метода криоконсервации разных видов биологического материала становится все более актуальной. Длительное сохранение жизнеспособности образца позволяет решать ряд логистических и методологических проблем в различных областях биологии, экспериментальной и клинической медицины, животноводства, сельского хозяйства и культивации растений. Критическое значение проблема оптимизации способов криоконсервации животных тканей имеет в области трансплантологии органов и создании пациентоподобных моделей при проведении доклинических исследований [1].

Целью обзора явилось обобщение данных отечественных и зарубежных исследований и формирование представления об отличительных особенностях различных способов криоконсервации, используемых в различных областях современной науки.

Материалы и методы исследования

Был проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной использованию различных способов криоконсервации органов и тканей, а также биосовместимости различных криопротекторных агентов. Выполнен поиск тематических статей в базе данных Google Scholar с использованием запросов: криоконсервация, виды криопротекторов, токсичность антифризных агентов, биосовместимость криопротекторов, cryopreservation in oncology, cryopreservation and it's clinical application, impact of immediate cryopreservation on xenografts creation, PDX-Derived Organoids cryopreservation, cryopreservation of human cancer, cell lines cryopreservation, general principles of preclinical study design, а также NCBI Pubmed с использованием поисковых запросов: cryopreservation for preclinical research, tissue cryopreservation, cell culture cryopreservation, organoids cryopreservation, tumor bio banking.

Результаты исследования и их обсуждение

К основным способам криоконсервации биологического материала относят методы медленного замораживания (ММЗ) и витрификации (МВ), которые отличаются скоростью охлаждения и механизмами восстановления клеточного гомеостаза [2]. Использование ММЗ предполагает постепенную остановку метаболической активности в присутствии криопротекторов (КПР) в низкой концентрации, что позволяет минимизировать цитотоксические эффекты последних. Оптимальным режимом в отношении клеток млекопитающих является охлаждение на 1 °С в минуту. Данная стратегия является особенно актуальной для сохранения жизнеспособности образцов в области вспомогательных репродуктивных технологий. Отдельные половые клетки, эмбрионы, а также первичные клеточные линии могут быть успешно консервированы, в то время как сохранение сложных образцов путем длительной заморозки является затруднительным. Основной причиной

ограничения широкого применения ММЗ является невозможность поглощения криопротектора многослойными образцами, необходимость использования дорогостоящего оборудования, а также образование кристаллов льда из остаточной воды [3; 4].

Сохранение при глубоких криогенных температурах может быть достигнуто с помощью МВ, предполагающего быстрое охлаждение биологического материала в среде, содержащей высокие концентрации криопротекторных агентов. Основным преимуществом МВ является предупреждение формирования льда, что играет ключевую роль в сохранении структурной организации тканей и фрагментов органов как при заморозке, так и при оттаивании образца [5; 6].

Описанные способы сохранения жизнеспособности клеток применяют в изохорном и изобарическом подходе криоконсервации. Гипербарический подход криосохранения образца предполагает использование низких температур в сочетании с высоким давлением, которое постепенно снижают для достижения оптимума [7; 8].

Криопротекторы и их токсические эффекты

Криопротекторы представляют собой вещества, уменьшающие содержание внутрицеллюлярной воды и увеличивающие общую концентрацию растворенных веществ, предупреждающие, таким образом, повреждение клеток кристаллами льда путем повышения вязкости и образования водородных связей [9].

Интрацеллюлярная вода представлена объемной (не менее 90%) и связанной формами. Связанная вода, осмотически не покидающая клетку, сообщается с гидрофильными поверхностями макромолекул (белков, нуклеиновых кислот или полярных концевых групп фосфолипидов). Удаление объемной воды не вызывает повреждение, опосредованное обезвоживанием, в то время как удаление связанной воды вызывает химические взаимодействия макромолекул, лишенных оболочки [10].

Вредное воздействие низких температур объясняется двумя механизмами, первый из которых предполагает механическое повреждение клеточных мембран кристаллами льда, что делает невозможным сохранение интактных клеток после оттаивания. Второй механизм обусловлен летальным увеличением концентрации растворенных веществ в оставшейся жидкой фазе [11].

Дегидратация цитоплазмы клеток становится причиной денатурации или структурной модификации белков. Формирование экстрацеллюлярных кристаллов льда в пространстве приводит к нарушению организации внеклеточного матрикса, что неизбежно сказывается на работе белков, регулирующих межклеточные взаимодействия, и становится серьезной проблемой криоконсервации многослойных образцов: тканей, фрагментов опухолей, органов.

Таким образом, подходы к оптимизации способов длительного сохранения жизнеспособности должны основываться на соблюдении баланса между обезвоживанием и образованием льда.

Принцип цитопротективного действия антифризных соединений был описан Mazur и коллегами (1963). Показано, что при оптимально медленном замораживании происходит выход воды из клетки путем осмоса в ответ на резкое повышение концентрации КПР во внеклеточном пространстве. Обезвоженные клетки начинают спадаться, при этом проникающие криопротекторы заменяют воду, покинувшую клетку. Таким образом, использование интрацеллюлярных КПР приводит к последующему набуханию клеток, в то время как при применении экстрацеллюлярных соединений клетки остаются спавшимися. Проникающие агенты должны быть хорошо растворимыми в воде при низких температурах, способными легко пересекать биологические мембраны и минимально токсичными [12; 13]. Принцип работы проникающих антифризов основан на увеличении внутриклеточной концентрации растворенного вещества и снижении осмотической разницы между цитозолем и внеклеточной средой. Сохранение большого объема интрацеллюлярной воды повышает вероятность формирования кристаллов льда, также приводящих к нарушению целостности клеточных мембран [14].

Альтернативой описанным способам криоконсервации является быстрое погружение биологического материала в жидкий азот, что позволяет минимизировать эффекты обезвоживания, делая внутри- и внеклеточную воду вязкой и предотвращая ее переход в твердое агрегатное состояние [15].

В условиях чрезмерно быстрого охлаждения существует опасность повреждения клеток кристаллами льда, образование которых связано с тем, что интрацеллюлярный лед образуется раньше, чем клетка успевает подвергнуться дегидратации. Слишком медленное замораживание, напротив, приводит к длительному воздействию гипертонического раствора криопротектора, вследствие чего клетки страдают от необратимого обезвоживания. Таким образом, оптимизация скорости охлаждения образца является одним из ключевых факторов сохранения целостности биологического материала, подвергшегося криоконсервации [16]. Стратегия оптимизации методов криосохранения должна быть сосредоточена на ингибировании рекристаллизации льда при оттаивании образцов, а также использовании в качестве замораживающих смесей малотоксичных и биосовместимых компонентов среды для консервации.

Антифризные соединения могут проявлять специфическую токсичность в отношении отдельных типов биологического материала или обладать общей токсичностью вследствие замещения объемной воды. Проблема общей токсичности является главным недостатком витрификационных растворов. Такое неспецифическое дегидратационное повреждение может

быть предупреждено использованием смеси криопротекторов интра- и экстрацеллюлярного типа [17]. Специфическая токсичность становится причиной денатурации белков, модификации биомолекул, повреждения клеточных мембран, дестабилизации цитоскелета, а также истощения АТФ, которое становится причиной окислительного стресса. Развитие окислительных модификаций представляется наиболее критичным для чувствительных к гипоксии сердечной и нервной тканей. Понимание молекулярных механизмов токсичности криопротекторов может стать важным шагом на пути к поиску средств снижения токсичности [18].

К основным компонентам интра- и экстрацеллюлярных криопротекторов относят раствор-носитель и собственно криопротектор. В состав носителя, поддерживающего изотоническую концентрацию, входят соли, буферные растворы, осмогены, а также ингибиторы апоптоза [19].

Проникающие антифризные агенты

С 1959 года стандартный протокол криосохранения клеток млекопитающих включает замораживание в растворе диметилсульфоксида (ДМСО), проникающего низкомолекулярного агента [20]. ДМСО предотвращает кристаллизацию воды во вне- и внутриклеточном пространстве, частично сдерживая увеличение концентрации растворенных веществ во время замораживания. Его использование ограничено в отношении образцов, которые используют при трансплантации тканей или терапии стволовыми клетками. В ряду экспериментальных работ были продемонстрированы токсические эффекты при трансплантации клеток костного мозга, которые подвергали криосохранению в растворе ДМСО. Наблюдаемые побочные эффекты КПП были связаны с увеличением продукции свободных радикалов, изменением эпигенетического профиля и гиперметилованием в клетках сердца и печени. Отмечались нарушение морфологии и снижение жизнеспособности нейрональных клеток, агрегация белков и апоптоз астроцитов [21; 22].

Для минимизации токсических эффектов ДМСО используют в комбинации с бычьей эмбриональной сывороткой (FBS). FBS, как компонент среды для заморозки, выступает в роли буфера осмотического давления, снижающего риск рекристаллизации. Однако очистка биологического материала от сыворотки представляет собой дорогостоящий процесс [23].

В качестве одного из наиболее безопасных интрацеллюлярных антифризов рассматривают глицерин, чьи криозащитные свойства относительно слабы. Коллигативный механизм протекторного действия глицерина сходен с таковым при использовании ДМСО и направлен на регуляцию концентрации растворенных веществ во внеклеточном пространстве при дегидратации образца [24]. Низкая токсичность глицерина определяет возможность широкого применения данного КПП в криоконсервации разнообразных типов биологического

материала. Так, в работе Карамулдаева А.К. и Тихомирова А.М. (2017) продемонстрирована эффективность использования глицерина при криосохранения спермы осетровых рыб. Показана высокая жизнестойкость половых клеток при применении глицерина по сравнению со стандартными протоколами (ДМСО) [25]. Наблюдаемая эффективность позволяет рассматривать глицерин в качестве эффективного КПР.

Этиленгликоль (ЭГ) представляет собой один из основных антифризных агентов, применяемый как при ММЗ, так и при МВ эмбрионов млекопитающих. Криопротекторные свойства ЭГ связаны с низкой молекулярной массой, высокой проникающей способностью и низкой токсичностью в отношении ооцитов, сперматозоидов и эмбрионов человека и животных. Переход к использованию ЭГ для сохранения жизнеспособности эмбрионов в протоколах МВ привел к скачку результативности проведения процедуры экстракорпорального оплодотворения в конце 90-х годов [26].

Непроникающие антифризные агенты

К группе непроникающих КПР относят сахара, способные вступать во взаимодействие с полярными группами биомолекул [27]. Рядом авторов смеси сахаров и полиолов рассматриваются в качестве естественной эвтектической системы, которая может быть альтернативным вариантом водного и липидного обмена для некоторых клеток [28]. Показано, что использование смеси трегалозы и глицерина в отношении 1:30 демонстрирует сохранение структурной организации биоматериала и низкую токсичность относительно синтетических непроникающих антифризных агентов. Применение естественных эвтектических смесей в криоконсервации позволит минимизировать токсические эффекты и снизить стоимость стандартно используемых органических растворителей в качестве КПР [27; 29].

К синтетическим экстрацеллюлярным криопротекторам относят поливинилпирролидон (ПВП), повышающий вязкость замораживающего раствора путем образования связей с молекулами воды. Точный механизм предупреждения образования кристаллов льда ПВП неизвестен, однако была продемонстрирована возможность применения ПВП в сочетании с другими КПР для замораживания ооцитов крупного рогатого скота [30].

Полиамфолиты

В последние годы активно обсуждается возможность использования ионообменных макромолекулярных антифризных агентов на основе амфолитной структуры. Эффективность применения сополимера диметиламинопропилметакриламида и акриловой кислоты, карбоксилированного поли(ϵ -лизина)-полиамфолита, а также *in situ* гидрогелей на основе декстрана способствует не только длительному сохранению жизнеспособности клеток, но и успешному восстановлению после оттаивания биоматериала. Для криосохранения клеточного

монослоя оптимально использование полиамфолитов, как компонентов сложных смесей ДМСО, сахарозы и ЭГ [31-33].

Антифризные белки

Заинтересованность физиологическими особенностями животных - экстремофилов, живущих в среде с температурой ниже точки замерзания воды, привела к выделению специфических белков, блокирующих повреждение клеток кристаллами льда. Впервые антифризные белки (АФБ) были обнаружены у арктических рыб в 1957 году. Принцип действия АФБ состоит в явлении теплового гистерезиса (ТГ), предполагающего изменение температуры замерзания воды. ТГ ингибирует рост льда, оставляя «зародышевые» кристаллы безопасными для клетки до тех пор, пока температура не станет ниже и не начнутся вторичные события нуклеации [34]. В отличие от коллигативного действия многоатомных спиртов и сахаров, цитопротекторные свойства АФБ не зависят от количества их молекул. Такая неколлигативная природа позволяет рассматривать данные агенты в качестве нетоксичной альтернативы синтетическим антифризам. К ограничениям применения относят высокую вероятность иммунного ответа при использовании АФБ в консервации органов и тканей, необходимых в области терапии и трансплантологии [35].

Наиболее распространенным АФБ является Серицин – водорастворимый белок с молекулярной массой ~30 кДа. Серицин выделяют из коконов тутового шелкопряда для замещения FBS в антифризных растворах для криосохранения стволовых клеток [36].

В работе Pollock K. и соавторов (2016) был проведен сравнительный анализ криопротекторных эффектов различных смесей КПП и осмолитов на основании оценки жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток после оттаивания. Авторами были описаны явления лучшего восстановления образцов, подвергшихся сохранению в многокомпонентных антифризных растворах, не содержащих ДМСО [37]. Наблюдаемые закономерности позволяют рассматривать переход к использованию многокомпонентных смесей КПП в качестве одного из наиболее доступных способов оптимизации протоколов криосохранения биологического материала.

Практическое применение антифризных агентов

Несмотря на то что с момента проведения первой процедуры трансплантации органов человеку, осуществленной Джозефом Мюрреем в 1954 году, было произведено множество пересадок, существующие подходы к замещению органов, утративших функциональность, удовлетворяют лишь 10% существующей мировой потребности в трансплантации [38]. Стандартные методы сохранения донорского материала неэффективны и сокращают экстракорпоральный срок службы органа. Рекомендованное хранение органов ex vivo осуществляется посредством статического холодного хранения при 4-8 °С. Однако данный

подход обеспечивает функциональное состояние лишь на несколько часов. В настоящее время период возможной консервации колеблется от 4 до 36 часов в зависимости от органа, что ограничивает возможность проведения качественной оценки соответствия антигенов лейкоцитов реципиентов и транспортировки донорского материала, соответствующего иммунологическому фенотипу пациента. С целью коррекции побочных эффектов реципиентам назначают пожизненную иммуносупрессивную терапию [39].

Ряд протоколов криосохранения предполагает погружение органов в консервирующие растворы. Примером таких КПП является раствор VS55, применяемый при МВ. Результативность такого подхода была описана при криосохранении почек лабораторных животных. По мере увеличения объема донорского материала наблюдается повышение вероятности отторжения из-за девитрификации и термомеханического стресса больших органов, вызванного формированием температурных градиентов [40], в связи с чем перспективным подходом к оптимизации процедур замораживания/оттаивания является обеспечение равномерного контролируемого оттаивания в направлении от периферии к центру органа.

Проведение исследований в области экспериментальной медицины также требует модификации способов криоконсервации с целью сохранения уникальных клеточных культур и фрагментов тканей. Низкое качество этих исследований снижает достоверность получаемых результатов. Для проведения доклинических исследований (ДКИ), являющихся обязательным этапом проверки эффективности и степени токсичности новых фармакологических субстанций и комбинаций стандартных препаратов с целью внедрения последних в клиническую практику, требуются модели, способные адекватно отражать ключевые особенности заболеваний. ДКИ могут быть разделены на два основных подтипа: проведение исследований *in vitro* и *in vivo* [41]. Сохранение жизнеспособности образцов опухолевых клеток может быть достигнуто с помощью заморозки образцов в 2D- и 3D-формате.

В качестве носителя для заморозки клеток часто используют бумагу и пластик, однако сохранение монокультур в двумерном формате демонстрирует низкую эффективность при трансплантации животным-реципиентам из-за отсутствия межклеточных взаимодействий и связей отдельных клеточных субпопуляций [42; 43]. Современные системы совместного культивирования позволяют воссоздавать гетерогенность биологического материала, что приводит к повышению эффективности при криоконсервации и последующей трансплантации.

В качестве одного из путей преодоления проблемы отсутствия межклеточного взаимодействия рассматривается использование скаффолдов из различных биосовместимых материалов. Данная стратегия позволяет создавать трехмерные (3D) модели с несколькими

клеточными популяциями, а также сложные системы, которые восстанавливают тканеподобную архитектуру первичных и пассортизированных культур. 3D-моделирование активно применяют на практике для культивации взрослых стволовых клеток для получения фрагментов органов. Криоконсервация отдельных фрагментов условно здоровой и опухолевой тканей также может осуществляться в составе композиционных конструкций, характеризующихся биологической инертностью и совместимостью с животными тканями. Использование каркасов позволит минимизировать необходимость использования больших концентраций КПП при применении в МВ [30; 44-46].

Заключение

Основные стратегии криоконсервации включают два основных криопротекторных механизма: образование стекловидной фазы и обратимую дегидратацию клеток. Однако используемые методы несовершенны, что связано с трудностями сохранения фенотипических и функциональных особенностей биологического образца. Существует потребность в низкотоксичных биосовместимых криозащитных агентах. Для преодоления ограничений использования антифризов широко применяют криопротекторы различной химической природы в композициях, а также различные темпы и форматы замораживания/оттаивания.

Список литературы

1. Alnemari R., Sukumar P., Deliorman M., Qasaimeh M. A. Paper-Based Cell Cryopreservation. *Advanced Biosystems*. 2020. V. 4. № 3. P. 1900203.
2. Son W.Y., Tan S.L. Comparison between slow freezing and vitrification for human embryos. *Expert review of medical devices*. 2009. V. 6. № 1. P. 1-7.
3. Нохова А.Р. Использование методов криоконсервации при сохранении нейральных и нервных клеток с целью культивирования и трансплантации // *Журнал естественнонаучных исследований*. 2019. Т. 4. № 3. С. 53-59.
4. Sugishita Y., Taylan E., Kawahara T., Shahmurzada B., Suzuki N., Oktay K. Comparison of open and a novel closed vitrification system with slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021. V. 38. № 10. P. 2723-2733.
5. Gurruchaga H., Del Burgo L.S., Hernandez R.M., Orive G., Selden C., Fuller B., Pedraz J.L. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. *Journal of controlled release*. 2018. V. 281. P. 119-138.
6. Nannou T.K., Jouhara H., Trembley J., Herrmann J. Cryopreservation: Methods, equipment and critical concerns. *Refrigeration Science and Technology*. 2016. P. 247-258.

7. Candas F., Gorur R., Haholu A., Yildizhan A., Yucel O., Ay H., Isitmangil T. Is tracheal transplantation possible with cryopreserved tracheal allograft and hyperbaric oxygen therapy? An experimental study. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2016. V. 101. № 3. P. 1139-1144.
8. Rukhliada N., Matukhin V., Novitskaya N., Taitis A., Janchuk N., Grjaznov A. Method of hyperbaric cryopreservation of ovarian tissue in xenon. *Global Reproduction*. 2020. № 2. P. 5-9.
9. Kostaman T., Yusuf T.L., Fachrudin M., Setiadi M.A. Effectiveness of DMSO concentration on recovery rate and viability of primordial germ cell of Gaok chicken. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 2018. V. 22. № 1. P. 30-37.
10. Pegg D.E. Principles of cryopreservation. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2015. P. 3-19.
11. Whaley D., Damyar K., Witek R.P., Mendoza A., Alexander M., Lakey J.R. Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*. 2021. V. 30. P. 0963689721999617.
12. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of general physiology*. 1963. V. 47. № 2. P. 347-369.
13. Pegg D.E. Principles of cryopreservation. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2007. P. 39-57.
14. Bhattacharya S. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. 2018. P. 7-19.
15. Silber S.J., DeRosa M., Goldsmith S., Fan Y., Castleman L., Melnick J. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018. V. 35. № 12. P. 2205-2213.
16. Stodolsky D.S. The growth and decline of cryonics. *Cogent Social Sciences*. 2016. V. 2. № 1. P. 1167576.
17. Crisol M., Wu K., Laouar L., Elliott J.A., Jomha N.M. Antioxidant additives reduce reactive oxygen species production in articular cartilage during exposure to cryoprotective agents. *Cryobiology*. 2020. V. 96. P. 114-121.
18. Iaffaldano N., Di Iorio M., Miranda M., Zaniboni L., Manchisi A., Cerolini S. Cryopreserving turkey semen in straws and nitrogen vapour using DMSO or DMA: Effects of cryoprotectant concentration, freezing rate and thawing rate on post-thaw semen quality. *British Poultry Science*. 2016. V. 57. № 2. P. 264-270.
19. Kučera L. et al. A mixture of innate cryoprotectants is key for freeze tolerance and cryopreservation of a drosophilid fly larva. *Journal of Experimental Biology*. 2022. V. 225. № 8. P. jeb243934.

20. Awan M., Buriak I., Fleck R., Fuller B., Goltsev A., Kerby J., Stacey G.N. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine*. 2020. V. 15. № 3. P. 1463-1491.
21. Mueller L.P., Theurich S., Christopheit M., Grothe W., Muetherig A., Weber T., Behre G. Neurotoxicity upon infusion of dimethylsulfoxide-cryopreserved peripheral blood stem cells in patients with and without pre-existing cerebral disease. *European journal of haematology*. 2007. V. 78. № 6. P. 527-531.
22. Naaldijk Y., Staude M., Fedorova V., Stolzing A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC biotechnology*. 2012. V. 12. № 1. P. 1-10.
23. Murray K.A., Tomás R.M.F., Gibson M.I. Low DMSO cryopreservation of stem cells enabled by macromolecular cryoprotectants. *ACS applied bio materials*. 2020. V. 3. № 9. P. 5627-5632.
24. Смолянинов А.Б., Кованько Г.Н., Багаутдинов Ш.М., Хурцилава О.Г. Криоконсервация и криохраниение стволовых клеток в банках пуповинной крови и костного мозга // *Вестник Международной академии холода*. 2009. № 2. С. 38-43.
25. Карамулдаева А.К., Тихомиров А.М. Применение глицерина для криоконсервации спермы белорыбицы // *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство*. 2017. № 2. С. 117-121.
26. Aye M., Di Giorgio C., De Mo M., Botta A., Perrin J., Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and chemical toxicology*. 2010. V. 48. № 7. P. 1905-1912.
27. Drake A.C., Lee Y., Burgess E.M., Karlsson J.O., Eroglu A., Higgins A.Z. Effect of water content on the glass transition temperature of mixtures of sugars, polymers, and penetrating cryoprotectants in physiological buffer. *PloS one*. 2018. V. 13. № 1. P. e0190713.
28. Craveiro R., Castro V.I., Viciosa M.T., Dionísio M., Reis R.L., Duarte A.R.C., Paiva A. Influence of natural deep eutectic systems in water thermal behavior and their applications in cryopreservation. *Journal of Molecular Liquids*. 2021. V. 329. P. 115533.
29. Castro V.I., Craveiro R., Silva J.M., Reis R.L., Paiva A., Duarte A.R.C. Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. *Cryobiology*. 2018. V. 83. P. 15-26.
30. Wang Y., Okitsu O., Zhao X.M., Sun Y., Di W., Chian R. C. The effect of minimal concentration of ethylene glycol (EG) combined with polyvinylpyrrolidone (PVP) on mouse oocyte survival and subsequent embryonic development following vitrification. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014. V. 31. № 1. P. 55-63.

31. López-Salas N., Vicent-Luna J.M., Imberti S., Posada E., Roldán M.J., Anta J.A., Del Monte F. Looking at the “water-in-deep-eutectic-solvent” system: a dilution range for high performance eutectics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019. V. 7. № 21. P. 17565-17573.
32. Jain M., Rajan R., Hyon S.H., Matsumura K. Hydrogelation of dextran-based polyampholytes with cryoprotective properties via click chemistry. *Biomaterials science*. 2014. V. 2. № 3. P. 308-317.
33. Iglesias T., Dusinska M., El Yamani N., Irache J.M., Azqueta A., de Cerain A.L. In vitro evaluation of the genotoxicity of poly (anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. V. 523. № 1. P. 418-426.
34. Kim H.J., Lee J.H., Hur Y.B., Lee C.W., Park S.H., Koo B.W. Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine drugs*. 2017. V. 15. № 2. P. 27.
35. Liu X., Pan Y., Liu F., He Y., Zhu Q., Liu Z., Tan S. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials*. 2021. V. 2021. P. 9990709
36. Slichter S.J., Jones M., Ransom J., Gettinger I., Jones M.K., Christoffel T., Bolgiano D. Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. *Transfusion Medicine Reviews*. 2014. V. 28. № 4. P. 212-225
37. Pollock K., Yu G., Moller-Trane R., Koran M., Dosa P.I., McKenna D.H., Hubel A. Combinations of osmolytes, including monosaccharides, disaccharides, and sugar alcohols act in concert during cryopreservation to improve mesenchymal stromal cell survival. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2016. V. 22. № 11. P. 999-1008.
38. Tas R.P., Sampaio-Pinto V., Wennekes T., van Laake L.W., Voets I. K. From the freezer to the clinic: Antifreeze proteins in the preservation of cells, tissues, and organs. *EMBO reports*. 2021. V. 22. № 3. P. e52162.
39. Engels E.A., Haber G., Hart A., Lynch C.F., Li J., Pawlish K.S., Pfeiffer R.M. Solid organ transplantation and survival among individuals with a history of cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2021. V. 30. № 7. P. 1312-1319.
40. Chiu-Lam A., Staples E., Pepine C.J., Rinaldi C. Perfusion, cryopreservation, and nanowarming of whole hearts using colloiddally stable magnetic cryopreservation agent solutions. *Science advances*. 2021. V. 7. № 2. P. eabe3005.
41. Huang W., du Sert N.P., Vollert J., Rice A.S. General principles of preclinical study design // *Handbook of experimental pharmacology*. 2020. V. 257. P. 55.
42. Prinelli A., Silva-Almeida C., Parks S., Pasotti A., Telopoulou A., Dunlop S., Töpfer E. In-Plate Cryopreservation of 2D and 3D Cell Models: Innovative Tools for Biomedical Research and

Preclinical Drug Discovery. SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery. 2021.V. 26. № 1. P. 32-43.

43. Chetverikova E.P. DNA damage by reactive oxygen species in cryopreservation and the antioxidant properties of cryoprotectors. Biophysics. 2012. V. 57. № 2. P. 263-269.

44. Ivanics T., Bergquist J.R., Liu G., Kim M.P., Kang Y., Katz M.H., Truty M.J. Patient-derived xenograft cryopreservation and reanimation outcomes are dependent on cryoprotectant type. Laboratory Investigation. 2018. V. 98. № 7. P. 947-956.

45. Mattar M., McCarthy C.R., Kulick A.R., Qeriqi B., Guzman S., De Stanchina E. Establishing and maintaining an extensive library of patient-derived xenograft models. Frontiers in oncology. 2018. V. 8. P. 19.

46. Hernandez M.C., Yang L., Leiting J.L., Sugihara T., Bergquist J.R., Ivanics T., Truty M.J. Successful secondary engraftment of pancreatic ductal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma patient-derived xenografts after previous failed primary engraftment. Translational oncology. 2019. V. 12. № 1. P. 69-75.