

ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ, НЕГАТИВНО ВЛИЯЕТ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Королевская Л.Б., Шмагель К.В.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Пермь, Россия*

Резюме. Мононуклеарные клетки периферической крови являются ценным биологическим материалом для большинства иммунологических исследований. Криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови обеспечивает доступ к большим объемам биоматериала в любой момент времени. Исходя из того, что криоконсервация может влиять на различные параметры клеток, рядом авторов было предложено введение этапа прекультивирования размороженных клеток для восстановления их функций. Цель исследования — оценка влияния прекультивирования клеток, подвергавшихся длительной криоконсервации, на пролиферативную активность Т-лимфоцитов. В работе была использована венозная кровь, полученная от 18 относительно здоровых добровольцев, подписавших информированное согласие. Мононуклеарные лейкоциты выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла общепринятым методом. Полученные клетки подвергали контролируемому замораживанию до -80°C в течение суток, затем переносили в жидкий азот. Длительность хранения образцов составила $40 \pm 1,4$ мес. После размораживания клетки делили на две части, одну из которых сразу окрашивали 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат-N-сукцинимидиловым эфиром (CFSE), стимулировали фитогемагглютином и культивировали в полной питательной среде, содержащей интерлейкин-2, в течение 7 суток. Вторую часть клеток прекультивировали в полной питательной среде (18 часов), затем обрабатывали, как указано выше. Оценку пролиферации Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии. Установлено, что этап прекультивирования не влияет на относительное количество пролиферирующих Т-лимфоцитов. Вместе с тем в пробах с прекультивированными клетками было снижено число дочерних поколений, формируемых как CD4^{+} , так и CD8^{+} Т-лимфоцитами. Кроме того, выявлено значительное увеличение доли умирающих элементов среди вступивших в деление CD4^{+} Т-клеток. При этом в пуле CD8^{+} Т-лимфоцитов данного последствия этапа прекультивирования не было отмечено. Таким образом, прекультивирование клеток существенно увеличивает процент Т-лимфоцитов, гибнущих в процессе деления. Данный феномен был

Адрес для переписки:

Королевская Лариса Борисовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-83-34.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: bioqueen@mail.ru

Address for correspondence:

Larisa B. Korolevskaya
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-83-34.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: bioqueen@mail.ru

Образец цитирования:

Л.Б. Королевская, К.В. Шмагель «Прекультивирование клеток, подвергавшихся длительной криоконсервации, негативно влияет на пролиферативную активность Т-лимфоцитов» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 425-430.
doi: 10.46235/1028-7221-17125-POC

© Королевская Л.Б., Шмагель К.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.B. Korolevskaya, K.V. Shmagel "Precultivation of cells subjected to long-term cryopreservation negatively affects proliferative activity of T lymphocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 425-430.
doi: 10.46235/1028-7221-17125-POC

© Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17125-POC

обнаружен только среди CD4⁺T-клеток, что, по-видимому, отражает их большую чувствительность к гибели *in vitro* по сравнению с CD8⁺T-лимфоцитами.

Ключевые слова: T-лимфоциты, криоконсервация, пролиферация, прекультивирование (отдых), проточная цитометрия

PRECULTIVATION OF CELLS SUBJECTED TO LONG-TERM CRYOPRESERVATION NEGATIVELY AFFECTS PROLIFERATIVE ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES

Korolevskaya L.B., Shmagel K.V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Peripheral blood mononuclear cells are a valuable biological material for most immunological studies. Cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells provides access to large amounts of biomaterial at any time. Since cryopreservation can affect various cell parameters, several authors have proposed introducing a precultivation step for thawed cells to restore their functions. The aim of the study is to evaluate the effect of preculturing long-term cryopreserved cells on T lymphocyte proliferative capacity. Venous blood obtained from 18 relatively healthy volunteers who signed informed consent was used. Mononuclear leukocytes were isolated by centrifugation in a diacoll density gradient using a standard method. The resulting cells were subjected to controlled freezing at -80 °C for 24 hours before being transferred to liquid nitrogen. The duration of sample storage was 40±1.4 months. After thawing, the cells were divided into two parts; one part was immediately stained with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE), stimulated with phytohemagglutinin, and cultured in complete culture medium containing interleukin-2 for 7 days. The second part of the cells was precultivated in complete culture medium (18 hours) and then treated as described above. T lymphocyte proliferation was assessed by flow cytometry. It was found that the preculture stage did not affect the relative counts of proliferating T lymphocytes. However, the number of daughter generations formed by both CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes was reduced in samples with precultured cells. Additionally, a significant increase in the proportion of dying elements among dividing CD4⁺T cells was observed. This consequence of the preculture stage was not found in the pool of CD8⁺T lymphocytes. Thus, preculturing significantly increases the percentage of T lymphocytes dying during division. This phenomenon was only detected among CD4⁺T cells, which appears to reflect their greater sensitivity to *in vitro* death compared to CD8⁺T lymphocytes.

Keywords: T lymphocytes, cryopreservation, proliferation, precultivation (rest), flow cytometry

Работа выполнена в рамках государственного задания «Изучение механизмов регуляции клеток иммунной системы и разработка методов их оценки в норме и патологии» (номер гос. регистрации 124020500027-7).

Введение

Пролиферация T-лимфоцитов необходима для формирования эффективного адаптивного иммунного ответа. Использование проточной цитометрии для оценки пролиферативной активности T-клеток служит рутинным методом в клеточной биологии, иммунологии, клинической медицине. Однако доступность образцов в больших количествах в определенное время и в

определенном месте остается сложной задачей, поэтому сбор и криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) для последующего анализа являются обычной практикой. Вместе с тем негативными последствиями криоконсервации могут быть, например, снижение экспрессии поверхностных и/или внутриклеточных маркеров, а также изменение функциональной активности клеток [4, 9]. Для сглаживания эффектов криоконсервации рядом авторов был введен этап прекультивирования: отдых приготовленных после разморозки МКПК в культуральной среде в течение 14-18 часов при +37 °C [4, 8]. Считается, что процесс покоя удалит клетки, обреченные на гибель, и позволит

«отдохнувшим» клеткам восстановить функциональные способности [6, 8]. Представленные в доступной литературе данные, как правило, отражают сравнение показателей функциональной активности свежеизолированных и криоконсервированных МКПК либо оценивают последствие сроков криоконсервации (1-12 мес.) на состояние и функции различных клеток [3, 4, 5, 9]. При этом авторы не всегда вносят в протокол исследования этап «отдыха» клеток.

Целью настоящей работы была оценка влияния прекультивирования клеток, подвергавшихся длительной (более трех лет) криоконсервации, на пролиферативную активность Т-лимфоцитов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили МКПК 18 относительно здоровых доноров, среди которых преобладали мужчины (61%). Средний возраст обследованных субъектов составил $37,4 \pm 1,2$ года. Исследование было одобрено этическим комитетом «ИЭГМ УрО РАН» (IRB 00010009), каждый участник подписал информированное согласие. Забор крови проводили в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (Weihai Hongyu Medical Devices Co Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной крови раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS, Gibco, США) в градиенте плотности Диаколл (1,077, ООО «Диаэм», Россия). Выделенные клетки после двукратного отмывания в растворе DPBS помещали в термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС, Biowest, Колумбия), содержащую 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Криопробирки с клетками подвергали контролируемому замораживанию в коммерческих штативах CoolCell (Corning, США) в морозильной камере (-80°C) в течение суток, после чего переносили в криохранилище с жидким азотом (-196°C) до последующего использования. Средняя продолжительность хранения образцов составила $40 \pm 1,4$ мес.

Перед проведением исследования криопробирки с МКПК размораживали (водяная баня, $+37^{\circ}\text{C}$). К клеткам, перенесенным в 15-мл пробирки, капельно вносили десятикратный объем полной питательной среды (ППС): RPMI-1640, содержащая 25 мМ Хепеса и 2 мМ L-глутамин (Gibco, США), 10% ЭТС, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, США). После центрифугирования (400 g, 10 мин) клеточный осадок ресуспендировали в ППС. Подсчет жизнеспособных клеток проводили в камере Горяева с окраской трипановым синим.

Доля жизнеспособных клеток составила не менее 92%.

Полученные клетки делили на две части, одну из которых сразу после разморозки (проба «свеже размороженные») окрашивали 5 мкМ 5(6)-карбоксифлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидилового эфира (CFSE, BioLegend, США) и инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 8 мин. Затем для прекращения реакции клетки дважды отмывали средой RPMI-1640, содержащей 20% ЭТС. После подсчета в камере Горяева клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 /мл в ППС, содержащей 100 нг/мл интерлейкина-2 (IL-2, Gibco, США). Пролиферацию клеток индуцировали внесением фитогемагглютинаина-П (ФГА, Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Пробу культивировали в течение 7 суток ($+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2). Контролем служили нестимулированные клетки, окрашенные CFSE, и стимулированные пробы без красителя. На 3-4-е сутки культуральную среду в каждой пробе меняли на среду соответствующего состава. Вторую часть размороженных клеток помещали в пробирки с ППС и инкубировали в течение 18 часов ($+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2), чтобы дать время на восстановление (проба «прекультивированные»). После этого клетки окрашивали CFSE и культивировали с ФГА или без него, согласно вышеописанному протоколу.

По окончании времени инкубации клетки собирали, окрашивали витальным красителем Zombie UV, моноклональными анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-BV-510 антителами (BioLegend, США) и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Среди стимулированных CD4^+ и CD8^+ Т-лимфоцитов определяли долю пролиферирующих клеток (CFSE^{low}), подсчитывали число дочерних генераций и процент клеток, гибнущих в процессе деления ($\text{ZombieUV}^+\text{CFSE}^{\text{low}}$).

Статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Количественные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез приняли равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Оценка пролиферативной активности Т-лимфоцитов, размороженных после длительной (более трех лет) криоконсервации и стимулирован-

ных *in vitro* в течение 7 суток, показала следующее. Доля $CD4^+CFSE^{low}$ -клеток в пробах «свежезамороженные» составила $79,5 \pm 2,3\%$, в образцах с прекультивированными клетками — $79,7 \pm 1,6\%$. Аналогичные показатели были установлены при оценке относительного количества поделившихся $CD8^+$ -лимфоцитов. Процент $CD8^+CFSE^{low}$ в пробах «свежезамороженные» и «прекультивированные» составил $78,6 \pm 4,6\%$ и $77,9 \pm 3,6\%$ соответственно. Ранее рядом исследователей при оценке пролиферативной способности клеток, культивированных сразу после разморозки, было установлено, что доля $CD4^+CFSE^{low}$ и $CD8^+CFSE^{low}$ не превышала 30% [9]. Необходимо отметить, что в указанной работе использованная авторами культуральная среда не содержала IL-2. Поскольку IL-2 является важным фактором выживания Т-лимфоцитов [1], возможно, что его отсутствие в культуральной среде могло приводить к снижению митотической активности клеток. Кроме того, на функциональность клеток могут влиять такие факторы, как состав среды для заморозки и длительность криоконсервации, этап прекультивирования клеток, индукторы и продолжительность стимуляции, а также ряд других [2, 5, 8]. Полученные нами в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что почти 80% Т-лимфоцитов, размороженных после длительной (более трех лет) криоконсервации, отвечают на стимуляцию митогеном, индуцирующим переход клетки из состояния покоя к делению. При этом внесение в протокол исследования предварительного этапа «отдых» не влияет на относительное число пролиферирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ -лимфоцитов.

Вместе с тем проведенная нами оценка количества дочерних генераций, образуемых стимулированными в течение 7 суток Т-лимфоцитами, выявила негативный эффект этапа «отдых» (рис. 1).

Прекультивирование размороженных клеток существенно уменьшало число дочерних генераций, формируемых как $CD4^+$, так и $CD8^+$ -лимфоцитами ($p < 0,001$). Исходя из того, что в пробах «прекультивированные» по сравнению с пробами «свежезамороженные» снижение количества дочерних генераций не сопровождается изменением доли $CFSE^{low}$ клеток, можно предположить следующее. В прошедших этап «отдыха» культурах клеток большее число Т-лимфоцитов вступают в деление, однако они совершают меньше митозов. Это справедливо, как для $CD4^+$, так и $CD8^+$ субпопуляций Т-лимфоцитов.

Известно, что криоконсервация и последующее размораживание запускают в клетках процессы, ведущие к гибели. Причиной этого могут быть физический стресс, вызывающий морфологические изменения, накопление в митохондри-

ях и цитозоле свободных радикалов, активация рецепторов смерти и др. [7, 9]. Проведенная нами оценка жизнеспособности делящихся Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток, показала следующее (рис. 2).

В пробах «свежезамороженные» относительное количество $CD4^+$ и $CD8^+$ -клеток, гибнущих в процессе деления, было сопоставимо. Вместе с тем прекультивирование клеток приводило к значительному увеличению доли умирающих элементов среди вступивших в деление $CD4^+$ -лимфоцитов ($p < 0,001$). При этом в пуле $CD8^+$ -клеток аналогичного последствия этапа «отдых» не было отмечено. Более того, после прекультивирования процент гибнущих элементов среди вступивших в деление $CD8^+$ -лимфоцитов был существенно ниже, чем среди $CD4^+$ -клеток ($p < 0,01$). Ранее рядом авторов было отмечено, что этап прекультивирования снижает процент гибнущих клеток среди лимфоцитов, оказывая положительное влияние на восстановление их функций [8]. Другими исследователями было показано, что дополнительный «отдых» не улучшал способность Т-лимфоцитов к продукции интерферона-гамма в ответ на стимуляцию разными антигенами по сравнению клетками, стимулированными непосредственно после разморозки [5]. В настоящей работе нами установлено, что прекультивирование размороженных после криоконсервации клеток приводит к увеличению доли гибнущих в процессе деления Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток. При данных экспериментальных условиях $CD4^+$ -клетки оказываются наиболее чувствительными к гибели по сравнению с $CD8^+$ -лимфоцитами.

Таким образом, хотя криоконсервация клеток является рутинным методом для последующей оценки их функционального состояния, данные, представленные в доступной литературе, весьма противоречивы. Поскольку после разморозки Т-лимфоциты демонстрируют относительно высокую выживаемость и способность к пролиферации, большинство исследований, как правило, сфокусированы на сравнении и оптимизации различных методологических подходов [4, 5, 8, 9]. Так, группой авторов был отмечен позитивный эффект этапа «отдых» на восстановление ряда функций Т-лимфоцитов [8], тогда как другими исследователями этого не выявлено [5]. В настоящей работе нами проведена оценка влияния этапа «отдых» размороженных после длительной (более трех лет) криоконсервации моноклеональных клеток периферической крови на пролиферативную активность Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток. Мы показали, что среди прошедших прекультивирование клеток доля пролиферирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ -

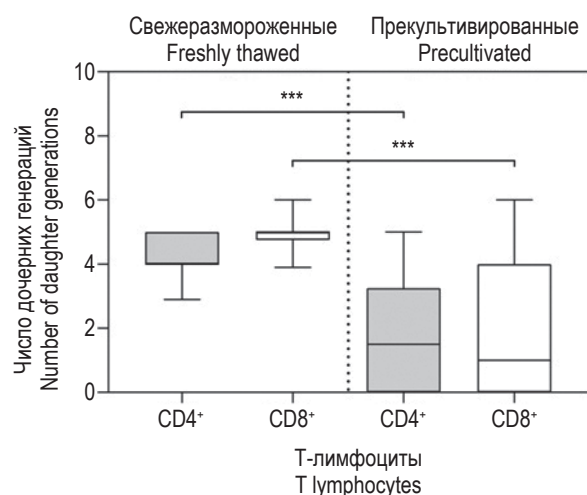


Рисунок 1. Влияние прекультивирования прошедших криоконсервацию клеток на количество дочерних поколений, формируемых стимулированными Т-лимфоцитами

Примечание. Свежезамороженные: приготовленные после разморозки клетки были окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток. Прекультивированные: приготовленные после разморозки клетки были оставлены на 18 часов в полной питательной среде, затем окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток (см. раздел «Материалы и методы»). Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90%-ные интервалы (вертикальные отрезки). *** – $p < 0,001$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Figure 1. Effect of cryopreserved cells precultivation on the number of daughter generations formed by stimulated T lymphocytes

Note. Freshly thawed: cells prepared after thawing were stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days. Precultivated: Cells prepared after thawing were left in complete culture medium for 18 hours, then stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days (see section "Materials and Methods"). Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), and 10-90% intervals (vertical segments) are shown. ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVA with post hoc comparisons using Tukey's test).

лимфоцитов была сопоставима с таковой в пробах, не подвергавшихся процедуре «отдых». Вместе с тем нами был выявлен негативный эффект прекультивирования клеток на количество дочерних поколений, формируемых стимулированными CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитами. Более того, дополнительный «отдых» клеток существенно увеличивал относительное число Т-лимфоцитов, гибнущих в процессе деления. Важно отметить, что данный феномен был обнаружен только среди CD4⁺Т-клеток, что, по-видимому, отражает

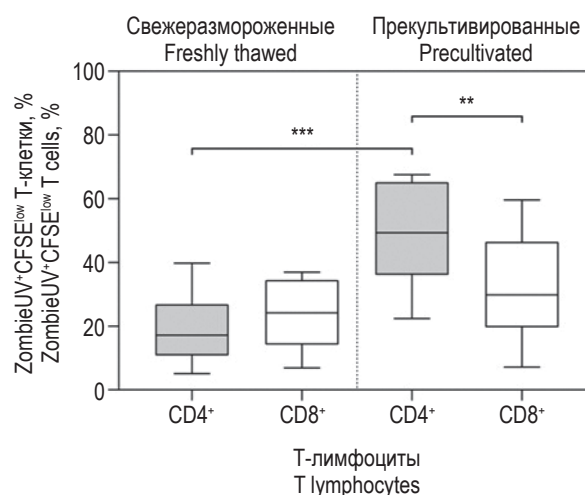


Рисунок 2. Влияние прекультивирования прошедших криоконсервацию клеток на долю гибнущих элементов среди вступивших в деление Т-лимфоцитов

Примечание. Свежезамороженные: приготовленные после разморозки клетки были окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток. Прекультивированные: приготовленные после разморозки клетки были оставлены на 18 часов в полной питательной среде, затем окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток (см. раздел «Материалы и методы»). Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90%-ные интервалы (вертикальные отрезки). ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Figure 2. Effect of cryopreserved cells precultivation on the proportion of dying elements among dividing T lymphocytes

Note. Freshly thawed: cells prepared after thawing were stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days. Precultivated: Cells prepared after thawing were left in complete culture medium for 18 hours, then stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days (see section "Materials and Methods"). Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), and 10-90% intervals (vertical segments) are shown. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVA with post hoc comparisons using Tukey's test).

их большую чувствительность к гибели *in vitro* по сравнению с CD8⁺Т-лимфоцитами.

Выводы

На основании вышеизложенного можно заключить, что к проведению культуральных исследований по оценке пролиферативной способности Т-лимфоцитов, подвергавшихся длительной криоконсервации, необходимо приступать незамедлительно после разморозки клеток. Это не только значительно снижает смертность продолжительно культивируемых клеток, но и позволяет

жизнеспособным делящимся лимфоцитам давать большее количество дочерних генераций.

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследование материалов и

вещества» ПФИЦ УрО РАН. Авторы выражают благодарность зав. лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ УрО РАН» д.б.н. Сайдаковой Е.В. и м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ УрО РАН» Пономаревой В.Н.

Список литературы / References

1. Benczik M., Gaffen S.L. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol. Invest.*, 2004, Vol. 33, no. 2, pp. 109-142.
2. Browne D.J., Miller C.M., Doolan D.L. Technical pitfalls when collecting, cryopreserving, thawing, and stimulating human T-cells. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1382192. doi: 10.3389/fimmu.2024.1382192.
3. Capelle C.M., Ciré S., Ammerlaan W., Konstantinou M., Balling R., Betsou F., Cosma A., Ollert M., Hefeng F.Q. Standard Peripheral blood mononuclear cell cryopreservation selectively decreases detection of nine clinically relevant T cell markers. *Immunohorizons*, 2021, Vol. 5, pp. 711-720.
4. Li B., Yang C., Jia G., Liu Y., Wang N., Yang F., Su R., Shang Y., Han Y. Comprehensive evaluation of the effects of long-term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. *BMC Immunol.*, 2022, Vol. 23, 30. doi: 10.1186/s12865-022-00505-4.
5. Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschhorn D.F., Epling C.L., Tan Q.X., Custer B., Harris J.M., Jacobson M.A., McCune J.M., Martin J.N., Hecht F.M., Deeks S.G., Norris P.J. Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. *J. Immunol. Methods*, 2007, Vol. 326, pp. 93-115.
6. Santos R., Buying A., Sabri N., Yu J., Gringeri A., Bender J., Janetzki S., Pinilla C., Judkowski V.A. Improvement of IFN γ ELISPOT performance following overnight resting of frozen PBMC samples confirmed through rigorous statistical analysis. *Cells*, 2014, Vol. 24, pp. 1-18.
7. Sarkar S., Kalia V., Montelaro R.C. Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4⁺ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing. *Cryobiology*, 2003, Vol. 47, no. 1, pp. 44-58.
8. Wang L., Hückelhoven A., Hong J., Jin N., Mani J., Chen B.A., Schmitt M., Schmitt A. Standardization of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells through a resting process for clinical immunomonitoring – Development of an algorithm. *Cytometry A*, 2016, Vol. 89, pp. 246-258.
9. Zhang J., Yin Z., Liang Z., Bai Y., Zhang T., Yang J., Li X., Xue L. Impacts of cryopreservation on phenotype and functionality of mononuclear cells in peripheral blood and ascites. *J. Transl. Intern. Med.*, 2024, Vol. 12, no. 1, pp. 51-63.

Авторы:

Королевская Л.Б. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Шмагель К.В. — д.м.н., заведующий лабораторией экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Korolevskaya L.B., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shmagel K.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 18.03.2025

Отправлена на доработку 18.03.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 18.03.2025

Revision received 18.03.2025

Accepted 25.05.2025