

УДК 612.649.011.87.014.3:547.422:57.043

Л.А. Бабийчук, О.А. Михайлова*, В.В. Рязанцев, П.М. Zubov, Р.К. Мигунова

Криоконсервирование ядросодержащих клеток кордовой крови под защитой непроникающего криопротектора ПЭО-1500

UDC 612.649.011.87.014.3:547.422:57.043

L.A. Babijchuk, O.O. Mykhailova*, V.V. Ryazantsev, P.M. Zubov, R.K. Migunova

Cryopreservation of Cord Blood Nucleated Cells Using Non-Penetrating Cryoprotectant PEO-1500

Реферат: Разработка безотмывочных методов криоконсервирования фракции ядросодержащих клеток кордовой крови, в состав которой входит популяция гемопоэтических стволовых клеток-предшественников, является актуальной задачей для их долгосрочного хранения. В работе использована технология криоконсервирования ядросодержащих клеток кордовой крови, включающая выделение популяции клеток оригинальным методом двухэтапного центрифугирования, обработку непроникающим криопротектором полиэтиленоксидом с м. м. 1500 (ПЭО-1500) и замораживание по двухэтапной программе. Установлено, что данная технология позволяет сохранить более 72% CD45⁺- и 75% CD34⁺-клеток с показателями жизнеспособности более 83 и 91% соответственно. При этом повышенное содержание активных форм кислорода (в $42,7 \pm 6,3$ %) клеток) на фоне высоких показателей количества клеток и их жизнеспособности может рассматриваться как физиологичный ответ клеток на воздействие факторов криоконсервирования.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, ядросодержащие клетки, кордовая кровь, криоконсервирование, непроникающий криопротектор, ПЭО-1500.

Реферат: Розробка безвідмивних методів криоконсервування фракції ядровмісних клітин кордової крові, до складу якої входить популяція гемопоетичних стовбурових клітин-попередників, є актуальним завданням для їх довгострокового зберігання. У роботі використовується технологія криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, яка включає виділення популяції клітин оригінальним методом двоетапного центрифугування, обробку непроникаючим криопротектором поліетиленоксидом із м. м. 1500 (ПЕО-1500) і заморожування за двоетапною програмою. Встановлено, що представлена технологія дозволяє зберегти більше 72% CD45⁺- та 75% CD34⁺-клітин із показниками життєздатності більше 83 і 91% відповідно. При цьому підвищений вміст активних форм кисню (в $42,7 \pm 6,3$ %) клітин) при високих показниках кількості клітин та їх життєздатності може розглядатися як фізіологічна відповідь клітин на вплив факторів криоконсервування.

Ключові слова: гемопоетичні стовбурові клітини, ядровмісні клітини, кордова кров, криоконсервування, непроникаючий криопротектор, ПЕО-1500.

Abstract: Development of wash-free cryopreservation methods for cord blood nucleated cell fraction, including the population of hematopoietic stem/progenitor cells, is an actual task for their long-term storage. Present investigation involved the technique of cord blood nucleated cells cryopreservation, comprising the isolation of cell population by the original two-step centrifugation method, the treatment with non-penetrating cryoprotectant polyethylene oxide with molecular weight of 1500 (PEO-1500) and freezing by the two-step program. This technique enabled to preserve more than 72% CD45⁺ and 75% CD34⁺ cells with the viability indices of correspondingly 83 and 91% and higher. Herewith, an increased content of reactive oxygen species (42.7 ± 6.3 %) on the background of high cell number and their viability may be considered as a cells' physiological response to the effect of cryopreservation factors.

Key words: hematopoietic stem/progenitor cells, nucleated cells, cord blood, cryopreservation, non-penetrating cryoprotectant, PEO-1500.

Результаты первой успешной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток-предшественников (ГСК) кордовой крови человека, которые обладают большим потенциалом пролиферации и экспансии, а также меньшей иммуногенностью, чем аналоги из взрослого костного мозга или мобилизированной периферической крови [5, 16], были предпосылкой к их использованию как источника кроветворных клеток во многих странах мира [17, 23, 24] и созданию банков для длительного

The results of the first successful transplantation of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells (HSCs), having a high proliferative and expansion potential, as well as lower immunogenicity comparing with the analogues from either adult bone marrow or mobilized peripheral blood [10, 21] were the pre-conditions for their use as the source of hematopoietic cells in many countries [11, 19, 20] and establishing the banks for long-term storage of preparations in a frozen state. The functioning of these banks is based

Отдел криоцитологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+380 57) 373-74-35, факс: (+380 57) 373-30-84,
электронная почта: mixolya@mail.ru

Поступила 03.11.2015
Принята в печать 01.12.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 24–34.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: mixolya@mail.ru

Received November, 03, 2015
Accepted December, 01, 2015

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 24–34.
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

хранения препаратов в замороженном состоянии. Работа таких банков основана на применении технологии криоконсервирования клеток, при которой максимально сохраняются их количество и биологические свойства, поэтому необходима разработка новых и усовершенствование существующих методов криоконсервирования клеток [1, 9, 14].

Процедура криоконсервирования фракции ядродержащих клеток (ЯСК), в том числе и ГСК, имеет несколько технологических этапов: выделение, обработка криопротекторными веществами и замораживание-отогрев.

Фракцию ЯСК из цельной крови чаще всего выделяют с помощью химических веществ (декстран, фиколл, желатин, гидроксипропилоккрахмал, метилцеллюлоза и др.) [16, 19], однако их применение ведет к значительной потере этих клеток. В качестве альтернативного метода получения трех фракций (эритроцитарной, лейкоцитарной и плазмы) была предложена сепарация клеток путем центрифугирования [1]. В данном исследовании использовали два способа получения концентрата ЯСК: выделение в градиенте плотности фиколл-верографина (общепринятый) и двухэтапное центрифугирование (оригинальный) [8].

Для криоконсервирования ЯСК был использован ДМСО, который обладает эффективной ограждающей способностью. Известно, что данное вещество в высоких концентрациях оказывает токсическое действие [10], для устранения которого важна отмывка суспензии клеток после размораживания, снижающая количество и жизнеспособность ЯСК, в том числе и ГСК. В связи с этим актуальна разработка безотмывочных технологий криоконсервирования, основывающихся или на снижении эффективной концентрации ДМСО в суспензии, или использовании непроникающих криопротекторов, которые не требуют отмывки после размораживания клеток [20, 26]. Ранее нами был предложен безотмывочный метод криоконсервирования ЯСК, основанный на применении непроникающего криопротектора полиэтиленоксида с м. м. 1500 (ПЭО-1500), эффективность которого была доказана при криоконсервировании цельной кордовой крови и эритроцитов донорской крови [12]. Однако механизмы действия непроникающих криопротекторов при криоконсервировании ЯСК кордовой крови до конца не изучены. В связи с этим проведение комплексного анализа состояния клеток, степени и характера их повреждения в зависимости от метода выделения и после замораживания под защитой непроникающего криопротектора ПЭО-1500 позволит выявить и предотвратить развитие критических повреждений.

on the cell cryopreservation technologies, allowing maximum preservation of cell number and biological properties, therefore the development of new and optimization of the existing methods of cell cryopreservation are indispensable [1, 2, 26].

The cryopreservation procedure for nucleated cells (NCs) fraction, including HSCs comprises several technological stages such as isolation, treatment with cryoprotective substances and freeze-thawing.

The NCs fraction from the whole blood is usually isolated by means of certain chemicals (dextran, Ficoll, gelatin, hydroxyethyl starch, methyl cellulose *etc.*) [10, 14], but their use results in a significant loss of these cells. As an alternative method for procurement of three fractions (erythrocytes, leukocyte ring and plasma) we proposed the cell separation by centrifugation [1]. In the present investigation we used two ways for the NCs concentrate procurement such as: the isolation in Ficoll-Verografin density gradient (the standard way) and two-step centrifugation (own method) [6].

For the NCs cryopreservation we used DMSO, having an efficient protecting capacity. This substance in high concentrations is known to cause a toxic effect [13], for removal of which it is important to wash cell suspensions after freeze-thawing, thereby reducing the number and viability of NCs, including HSCs. Therefore of current interest is the design of wash-free cryopreservation techniques, based either on reducing an efficient DMSO concentration in suspension, or using non-penetrating cryoprotectants, when no washing required after cell freeze-thawing [20, 24]. Previously we proposed the wash-free method for NCs cryopreservation, based on applying the non-penetrating cryoprotectant polyethylene oxide with molecular weight of 1500 (PEO-1500), the efficiency of which was proven during cryopreservation of the whole cord blood and donor blood erythrocyte [7]. However, the mechanisms of action of non-penetrating cryoprotectants during cord blood NCs cryopreservation have not been entirely studied. A combined analysis of cell state, the extent and nature of their damage depending on isolation protocol and after freezing with non-penetrating cryoprotectant PEO-1500 will allow revealing and preventing the development of critical defects.

The research aim was to assess the efficiency of cryopreservation of nucleated cells, including hematopoietic stem ones, using non-penetrating cryoprotectant PEO-1500, depending on the whole cord blood separation technique.

Materials and methods

The human cord blood nucleated cells were the research object. The cord blood (CB) was collected



Цель работы – оценка эффективности криоконсервирования ядросодержащих клеток, в том числе и стволовых гемопоэтических, под защитой непроницающего криопротектора ПЭО-1500 в зависимости от метода сепарации цельной кордовой крови.

Материалы и методы

Объектом исследования были ядросодержащие клетки кордовой крови человека. Сбор кордовой крови (КК) производили в соответствии с требованиями комиссии по биоэтике ИПКиК НАН Украины после получения информированного согласия беременной и дородового скрининга на наличие противопоказаний к донорству. Эксфузию крови осуществляли закрытым способом из пупочной вены при естественных родах после рождения ребенка и отделения его от плаценты. Манипуляцию выполняли с помощью системы для забора крови с 25 мл антикоагулянта – глюкозо-цитратного раствора «Глюгидир» («Биофарма», Украина).

Концентраты ЯСК выделяли двумя методами. Первый – разработанный нами метод двухэтапного центрифугирования цельной крови. Для этого цельную кордовую кровь центрифугировали 10 мин при 1500g (центрифуга «ОПН-3», Дастан, Киргизия), удаляли плазму и отбирали лейкоцитарный слой. Процедуру повторяли с добавлением фосфатно-солевого буфера и центрифугировали 5–7 мин при 3000 об/мин с последующим получением концентрата ЯСК в аутоплазме (ЯСК-1) [11]. Второй – стандартный метод центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (ЯСК-2). Клетки инкубировали в растворе криопротектора ПЭО-1500 (конечная концентрация 10%) по методу «холодовой» обработки [11, 12], затем помещали в предварительно охлажденный до 0°C программный замораживатель «CryoSON» (Германия) и охлаждали со скоростью 5–5,5 град/мин до –60...–65°C, выдерживали в течение 10 мин, затем клетки переносили в жидкий азот [13]. Абсолютное количество клеток подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике. Сохранность клеток определяли как отношение количества клеток в исследуемом образце после воздействия к исходному количеству до воздействия и выражали в процентах.

Имунофенотипирование ядросодержащих клеток (CD45⁺), в том числе гемопоэтических стволовых (CD34⁺), а также оценку их жизнеспособности с помощью ДНК-маркера 7-аминоактимицина D (7AAD) выполняли методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) с помощью реагентов фирмы «Becton Dickinson».

in accordance with the requirements of the Commission in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine after obtaining an informed consent of pregnant woman and prenatal screening for contraindications to donation. Blood exfusion was carried out by the closed method from umbilical vein during natural delivery after child birth and separation from the placenta. The manipulation was done using the system for blood sampling with 25 ml of anticoagulant: glucose-citrate solution Glugicir (Biofarma, Ukraine).

The NCs concentrates were isolated by two methods. The first one was the developed by us two-step method for the whole blood centrifugation. For this purpose the whole cord blood was centrifuged for 10 min at 1500g (centrifuge OPN-3, Dastan, Kyrgyzstan), the plasma was removed, and leukocyte layer collected. The procedure was repeated with the phosphate buffered saline supplement and 5–7 min centrifugation at 3000 rpm; final NCs concentrate was procured in autoplasm (NC-1) [6]. The second method was the standard centrifugation in Ficoll-Verografin density gradient (NC-2). The cells were treated thereafter with cryoprotectant PEO-1500 (10% final concentration) by the ‘cold’ treatment method [6, 7] placed into a pre-cooled down to 0°C programmed freezer Cryoson (Germany) and cooled with 5–5.5 deg/min rate down to –60...–65°C and exposed for 10 min at this temperature, then transferred into liquid nitrogen [5]. The absolute number of cells was calculated in Goryaev’s chamber according to the standard technique. Cell survival was determined as the ratio between cell number in the studied sample after exposure and the initial amount and expressed in percents.

The immunophenotyping of nucleated cells (CD45⁺), including hematopoietic stem ones (CD34⁺), as well as the assessment of their viability with DNA marker 7-aminoactinomycin D (7AAD) were done with FACS Calibur flow cytometer (BD, USA) using the reagents from BD. The number of CB NCs with an increased content of reactive oxygen species (ROS) was measured by flow cytometry using 5 μmol dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂DA, Sigma-Aldrich, USA) [8]. Afterwards we determined the number of cells with an increased DCF fluorescence intensity, which was limited with M1 marker for each studied population towards the total cell number in the sample.

The flow cytometry data were processed with CELLQuest Pro software (BD, USA) and presented as M ± SE. Differences between the samples were assessed by Student's t-test with a significance level of 5%, the sample size of data was at least five experiments.



Количество ЯСК КК с повышенным содержанием активных форм кислорода (АФК) определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием 5 мкмоль дихлорфлуоресцеина диацетата (DCFH₂DA, «Sigma-Aldrich», США) [15]. Далее определяли количество клеток с повышенной интенсивностью флуоресценции DCF, которую ограничивали маркером М1, в каждой исследуемой популяции, и относили его к общему количеству клеток в пробе.

Данные проточной цитометрии обрабатывали с помощью программного обеспечения «CellQuest Pro» («Becton Dickinson») и представляли в виде $M \pm SE$. Различия между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента с уровнем значимости 5%, объем выборки данных составлял не менее пяти экспериментов.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки эффективности выделения ядросодержащих (CD45⁺) и гемопоэтических стволовых (CD34⁺) клеток из цельной кордовой крови, в зависимости от используемого в нашей работе метода выделения, представлены на рис. 1, А.

Показано, что метод двухэтапного центрифугирования (ЯСК-1) позволяет выделять более 90% как ЯСК, так и ГСК, а при использовании фиколла

Results and discussion

The results of the isolation efficiency assessment of nucleated (CD45⁺) and hematopoietic stem (CD34⁺) cells from the whole cord blood, depending on the isolation method used in this research, are shown in Fig. 1A.

The two-step centrifugation (NC-1) enabled to isolate more than 90% of both NCs and HSCs, if using Ficoll (NC-2) a loss of CD45⁺ cells ((45.2 ± 8.2)%) was observed (this method is used usually to isolate mononuclear cells), CD34⁺ cells amount was also decreased ((35.9 ± 5.1)%) [14]. These changes may affect the quality of the resulting preparation, since the number of nucleated cells is the standard criterion to evaluate a cell preparation quality [18].

The data on cell survival at the following stages of CB NCs cryopreservation (treatment with cryoprotectant and freeze-thawing) are shown in Fig. 1B. Supplementing of cryopreservation medium with a high-molecular PEO-1500 was established to decrease a number of cells in the corresponding concentrates. For example, cell incubation with 10% PEO-1500 reduced the CD34⁺ cell survival in the NC-1 and NC-2 concentrates by (12.1 ± 2.8)% and (8.2 ± 2.7)%, respectively. When assessing the survival of the NCs total fraction (CD45⁺) there was established the similar dependency: in the NC-1 concentrate this index decreased by

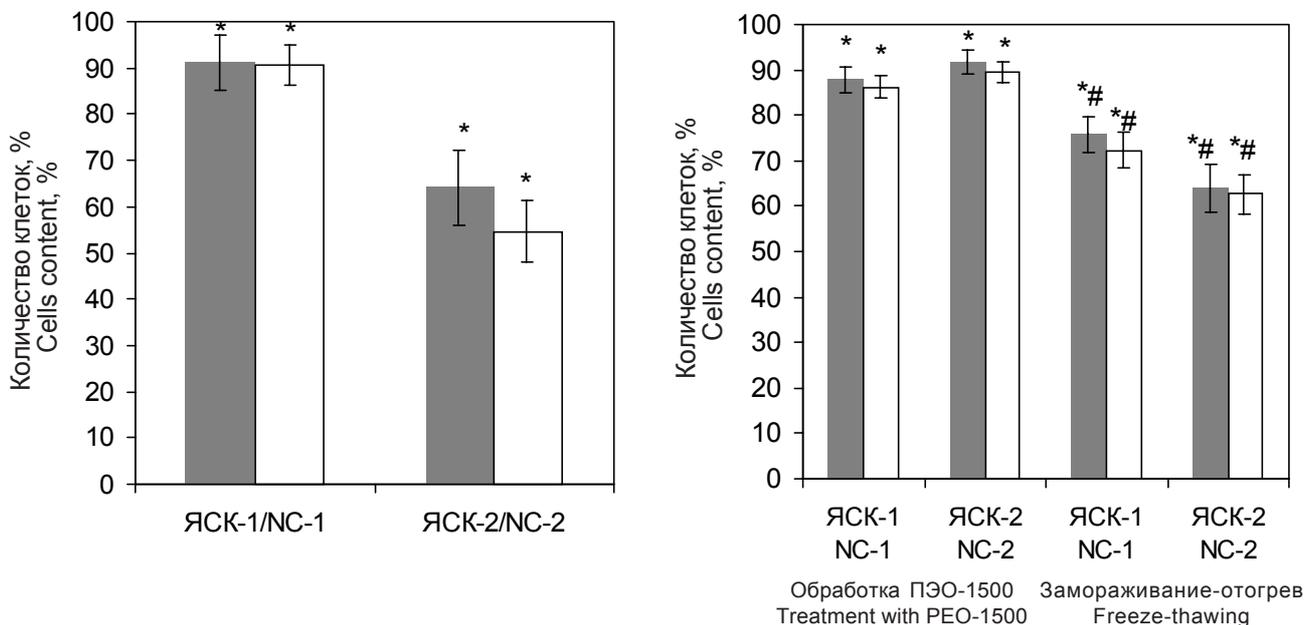


Рис. 1. Количество клеток CD34⁺ (■) и CD45⁺ (□) после выделения (А) методом двухэтапного центрифугирования (ЯСК-1) или в градиенте плотности фиколла (ЯСК-2), а так же после обработки ПЭО и замораживания-отогрева (В). Количество CD45⁺-клеток составляло $(1,38 \pm 0,39) \times 10^4$ кл/мкл и было принято за 100%. Статистически значимые различия по сравнению с: * – показателями цельной кордовой крови; # – данными после обработки ПЭО-1500, $p < 0,05$.

Fig. 1. Content of CD34⁺ (■) and CD45⁺ (□) cells after isolation (А) by two-step centrifugation (NC-1) or in Ficoll density gradient (NC-2), as well as after treating with PEO-1500 and freeze-thawing (В). Number of CD45⁺ cells made $(1,38 \pm 0,39) \times 10^4$ cells/ μ l and was assumed as 100%. Statistically significant differences: * – as compared to the corresponding concentrate; # – as compared to the data after treatment ($p < 0.05$).

(ЯСК-2) наблюдается потеря CD45⁺-клеток ((45,2 ± 8,2)%), поскольку с помощью данного метода выделяют преимущественно мононуклеарные клетки, а также потеря CD34⁺-клеток ((35,9 ± 5,1)%) [19]. Такие изменения могут повлиять на качество полученного препарата, поскольку количество ядросодержащих клеток является стандартным критерием оценки качества клеточного препарата [22].

Результаты анализа сохранности клеток на последующих этапах криоконсервирования ЯСК КК (обработка криопротектором и замораживание-отогрев) представлены на рис. 1, В. Установлено, что при добавлении в среду криоконсервирования высокомолекулярного ПЭО-1500 количество клеток в соответствующих концентратах снижается. Так, инкубация клеток с 10% ПЭО-1500 снижала сохранность CD34⁺-клеток в концентрате ЯСК-1 на (12,1 ± 2,8)%, а в концентрате ЯСК-2 – на (8,2 ± 2,7)%. При оценке сохранности общей фракции ЯСК (CD45⁺) установлена аналогичная зависимость: в концентрате ЯСК-1 данный показатель снижался на (13,8 ± 2,4)%, а в концентрате ЯСК-2 – на (10,6 ± 2,2)%. При этом сохранность клеток, выделенных при двухэтапном центрифугировании (ЯСК-1), снижалась преимущественно за счет гранулоцитов [3], а при использовании фиколла (ЯСК-2) – за счет мононуклеарных клеток. Кроме того, на каждом этапе криоконсервирования могут изменяться структурно-функциональные и метаболические свойства ЯСК, что может привести не только к утрате части выполняемых клетками функций, но и к их гибели. Поэтому, кроме количественного показателя, важным критерием эффективности метода криоконсервирования является жизнеспособность клеток.

Результаты оценки жизнеспособности CD34⁺- и CD45⁺-клеток в процессе криоконсервирования представлены на рис. 2. Показано более существенное снижение данного показателя как ЯСК, так и ГСК уже на этапе выделения клеток из цельной КК с помощью фиколла (ЯСК-2), в отличие от метода двухэтапного центрифугирования (ЯСК-1). При последующей обработке клеток ПЭО-1500 увеличилось относительное содержание жизнеспособных клеток, выделенных двухэтапным центрифугированием, что может быть следствием

(13.8 ± 2.4)%, and in NC-2 it did by (10.6 ± 2.2%). In this case the survival of cells, isolated by two-step centrifugation (NC-1) decreased mainly due to granulocytes [3], and in case of Ficoll (NC-2) it was due to mononuclear cells. Moreover, every stage of cryopreservation could be accompanied with changes in structure, functions and metabolic properties of NCs, that may result not only in a particular loss of functions of cells, but their death as well. Therefore, in addition to a quantitative index, cell viability as an important criterion of the cryopreservation method efficiency should be assessed.

The results of the viability assessment of CD34⁺ and CD45⁺ cells during cryopreservation are shown in Fig. 2. More significant decrease in this index for both NCs and HSCs even at the stage of cell isolation from the whole CB using Ficoll (NC-2), in contrast to the two-step centrifugation (NC-1) was demonstrated. During following cell treatment with PEO-1500 a number of viable cells, isolated by two-step centrifugation increased, that might result from the destruction of previously damaged cells during treatment with PEO-1500 (see Fig. 1, B). Of note is the fact, that during treatment with cryoprotectant of the NCs,

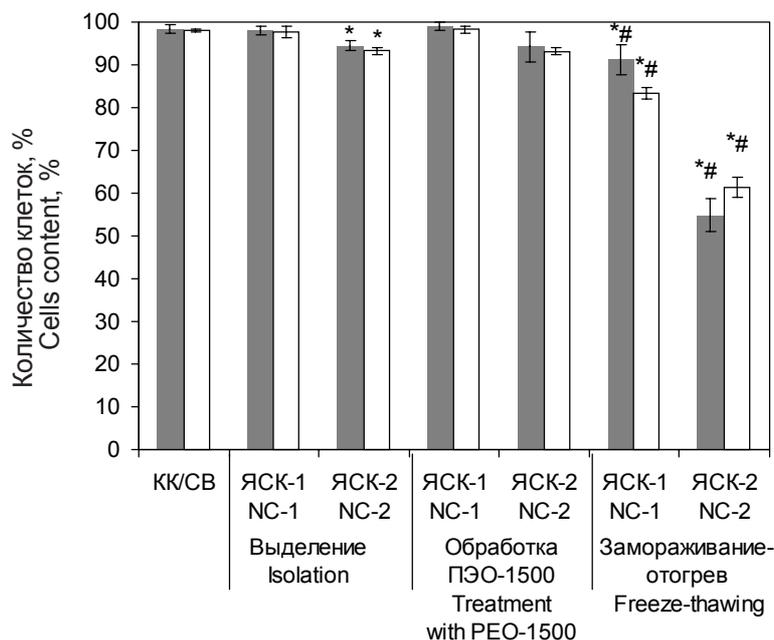


Рис. 2. Количество жизнеспособных (7AAD⁻) клеток CD34⁺ (■) и CD45⁺ (□) в процессе криоконсервирования в зависимости от метода выделения (двухэтапным центрифугированием (ЯСК-1) или в градиенте плотности фиколла (ЯСК-2)). Статистически значимые различия по сравнению с: * – показателями цельной кордовой крови; # – данными после обработки ПЭО-1500, *p* < 0,05.

Fig. 2. Content of viable (7AAD⁻) CD34⁺ (■) and CD45⁺ (□) cells during cryopreservation according to the isolation method (two-step centrifugation (NCs 1) or Ficoll density gradient (NCs 2)). Statistically significant differences: * – as compared to the indices in the whole cord blood; # – as compared to the data after treatment (*p* < 0.05).



разрушения при обработке ПЭО-1500 (см. рис. 1, В) поврежденных ранее клеток. Следует отметить, что при обработке криопротектором ЯСК, выделенных в градиенте плотности фикола, показатель жизнеспособности не увеличивается, а сохранности снижается (см. рис. 1, В). Это может свидетельствовать не только о разрушении клеток при выделении, но и о дополнительном их повреждении в результате введения в среду криопротектора.

Результаты замораживания-отогрева клеточных суспензий подтвердили преимущество предложенного нами метода: жизнеспособность ЯСК, выделенных двухэтапным центрифугированием и замороженных под защитой ПЭО-1500, составляет $(83,4 \pm 1,45)\%$, а ГСК – $(91,3 \pm 3,5)\%$. Жизнеспособность ЯСК, выделенных в градиенте плотности фикола и криоконсервированных с добавлением ПЭО-1500, снижалась до $(61,4 \pm 2,3)\%$, а ГСК, которые в норме характеризуются большей, чем ЯСК, криоустойчивостью, составляла $(54,8 \pm 3,8)\%$.

В физиологически полноценной клетке при нормальных условиях механизмы антиоксидантной защиты находятся в устойчивом равновесии с системами, продуцирующими активные формы кислорода (АФК). Поэтому АФК, образующиеся при нормальном клеточном метаболизме за счет утечки электронов в дыхательной цепи митохондрий, а также других окислительно-восстановительных реакций в органеллах и цитоплазме, не вызывают повреждения клетки. Если количество образующихся АФК превышает защитные возможности клетки, то могут наблюдаться внутриклеточные нарушения. Это происходит вследствие высокой реакционной способности АФК, которая позволяет им взаимодействовать с липидами, белками, нуклеиновыми кислотами и углеводами. В высоких концентрациях АФК индуцируют процессы перекисного окисления липидов в биологических мембранах, повреждение мембрано-связанных белков и ДНК клетки, инактивацию ферментов [6, 7]. Криоконсервирование, при котором изменяются физико-химические свойства среды, может приводить к физиологическим нарушениям в биологических объектах, зачастую сопровождающихся повышенной продукцией АФК [8]. Исследования некоторых авторов показали, что количество АФК в различных биообъектах после замораживания увеличивается [18, 27]. Учитывая данный факт, на следующем этапе оценки состояния ЯСК мы посчитали целесообразным определить содержание АФК в зависимости от технологии криоконсервирования. Для этого был применен цитофлуориметрический метод, основанный на использовании дихлорфлуоресцеин диацетата ($\text{DCFH}_2\text{-DA}$), который после попадания в клетку и отщепления

isolated with Ficoll density gradient, the viability did not increase, but survival was reduced (see Fig. 1B). This may testify not only to the cell destruction during isolation, but their additional damage due to cryoprotectant introduction into the medium as well.

The results of cell suspension freeze-thawing confirmed the advantage of the method we proposed: the viability of NCs, isolated by two-step centrifugation and frozen under PEO-1500 protection made $(83.4 \pm 1.45)\%$, and $(91.3 \pm 3.5)\%$ for HSCs. The viability of NCs isolated with Ficoll density gradient and cryopreserved with PEO-1500 supplement, decreased down to $(61.4 \pm 2.3)\%$, and that of HSCs, which normally had higher cryoresistance than NCs, was $(54.8 \pm 3.8)\%$.

In a physiologically valuable cell normally the antioxidant protection mechanisms are in a stationary balance with the systems producing reactive oxygen species (ROS). Therefore the ROS, formed under normal cellular metabolism due to the leakage of electrons in mitochondrial respiratory chain, as well as the other redox reactions in organelles and cytoplasm, cause no cell damage. If the amount of formed ROS exceeds the protective capability of a cell, the intracellular disorders may be observed. This occurs due to a high reactivity of ROS, allowing them to interact with lipids, proteins, nucleic acids and carbohydrates. Being in high concentrations, ROS induce the lipid peroxidation in biological membranes, damage the membrane-bound proteins and cell DNA, inactivate the enzymes [16, 27]. Cryopreservation changes physical and chemical properties of medium and thus may result in physiological disorders in biological objects, often accompanied by an increased ROS production [23]. It was reported, that the amount of ROS in different biological objects after freezing was increased [12, 25]. Taking this fact into account, at the next stage of the NCs state evaluation we determined the ROS content, depending on cryopreservation technique. For this purpose we used the flow cytometry, based on using dichlorofluorescein diacetate ($\text{DCFH}_2\text{-DA}$), which after entering a cell and diacyl group cleavage could leave it, and in the presence of ROS in a cell it transformed into a highly fluorescent DCF form. In contrast to other biochemical methods, assessing oxidative stress by an amount of oxidized forms of proteins and lipids, this method advantage is the possibility to determine an intracellular ROS content at the moment of their formation. The results of a typical experiment are shown in Fig. 3.

It was shown that using two-step centrifugation for cell isolation (NC-1) did not result in changes of DCF-labeled NCs number $((3.8 \pm 1.31)\%$ DCF^+ CD45^+ cells) if compared to the values found in whole cord blood $((4.73 \pm 2.45)\%$ DCF^+ CD45^+ cells), and

диацильной группы не может свободно ее покинуть, а при наличии в клетке АФК переходит в высокофлуоресцентную форму DCF. В отличие от других биохимических методов, при использовании которых окислительный стресс оценивают по окисленным формам белков и липидов, преимуществом данного метода является возможность определять внутриклеточное содержание АФК в момент их образования. Результаты типичного эксперимента представлены на рис. 3.

Показано, что при двухэтапном центрифугировании для выделения клеток (ЯСК-1) количество DCF-меченых ЯСК не изменяется ($(3,8 \pm 1,31)\%$ DCF⁺CD45⁺-клеток) по сравнению с цельной кордовой кровью ($(4,73 \pm 2,45)\%$ DCF⁺CD45⁺-клеток), а при выделении клеток в градиенте плотности фиколла (ЯСК-2) содержание АФК в клетках увеличивается ($(21,3 \pm 4,03)\%$ DCF⁺CD45⁺-клеток). Так, количество DCF-меченых ядросодержащих клеток увеличивается в среднем в пять раз по сравнению с цельной кордовой кровью.

Необходимо отметить, что популяционный состав концентратов ЯСК КК, полученных разными методами, отличается по содержанию гранулоцитарных лейкоцитов [3]. Данный тип клеток в силу особенностей строения (большое количество лизосом и пероксисом) и способности к спонтанно развивающемуся апоптозу может влиять на уровень флуоресценции DCF всех CD45⁺-клеток [25]. Известно, что наименее обогащен гранулоцитами концентрат, полученный с использованием фиколла, который позволяет получать преимущественно мононуклеарную фракцию клеток [3]. В связи с этим можно предположить, что суспензия, выделенная данным методом, должна содержать меньше клеток с повышенным содержанием АФК, чем цельная кордовая кровь. Однако увеличение количества DCF-меченых клеток может свидетельствовать об интенсификации внутриклеточной продукции АФК на фоне сочетанного повреждающего действия химических и физических факторов на мононуклеарную фракцию лейкоцитов в процессе выделения.

При последующем добавлении криопротектора увеличивалось содержание АФК в клетках, выделенных

when isolation of cells in Ficoll density gradient (NC-2) led to the increase in cell ROS content ($(21.3 \pm 4.03)\%$ DCF⁺ CD45⁺ cells). Thus, the number of DCF-labeled nucleated cells increased five times in average as compared to the control values.

Of note is the fact, that the populations in CB NCs concentrates, procured by various methods, differ by a number of granulocytic leukocytes [3]. This type of cells due to structural features (a large number of lysosomes and peroxisomes) and the capability for a spontaneously developing apoptosis may affect the DCF fluorescence level of the whole CD45⁺ cells [22]. The concentrate, procured using Ficoll density gradient contains mostly mononuclear cell fraction, *i.e.* has less granulocytes [3]. We may thereby assume the fact, that the suspension, isolated by this method should

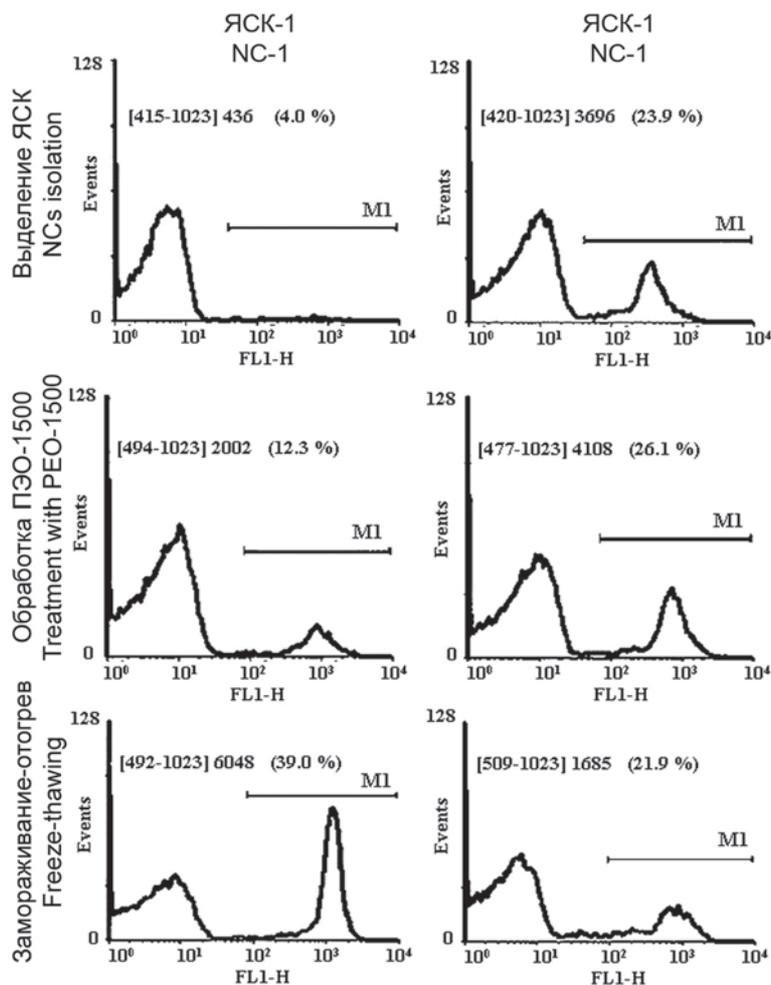


Рис. 3. Количество DCF-меченых ядросодержащих клеток кордовой крови в зависимости от метода выделения (двухэтапное центрифугирование (ЯСК-1) или в градиенте плотности фиколла (ЯСК-2)).

Fig. 3. Content of DCF⁺ cord blood nucleated cells, depending on isolation method (two-step centrifugation (NC-1) or Ficoll density gradient (NC-2)).



двухэтапным центрифугированием, однако в клетках, выделенных в градиенте плотности фиколла, данный показатель практически не изменялся.

Наиболее значительные изменения содержания АФК в клетках наблюдались после криоконсервирования. На клетки, находящиеся в стрессовых условиях, действуют дополнительные повреждающие факторы замораживания-отогрева, которые могут привести к запрограммированной гибели клеток, имеющих «сбой» в работе антиоксидантной системы. Установлено, что после криоконсервирования количество CD45⁺DCF⁺-клеток изменяется и зависит от метода их выделения. При анализе содержания АФК в клетках, выделенных двухэтапным центрифугированием и замороженных с ПЭО-1500, было показано значимое увеличение (до $42,7 \pm 6,3\%$) количества клеток с повышенным внутриклеточным содержанием АФК по сравнению с данными до замораживания-отогрева. Ранее проведенный популяционный анализ позволил нам установить, что содержание АФК в клетках повышается в основном за счет популяции гранулоцитов и моноцитов, при этом большинство лимфоцитов сохраняется в состоянии, близком к нативному [25].

Высокие показатели количества и жизнеспособности клеток могут свидетельствовать об отсутствии «сбоев» в работе их антиоксидантной системы. Поэтому можно говорить о стрессовой реакции клеток, которая сопровождается увеличением продукции АФК, что обусловлено реакцией адаптации клеток к экстремальным условиям, в которых АФК выполняют роль вторичных мессенджеров, участвуя в сигнальной трансдукции и экспрессии ряда генов [6]. В таких условиях важна мобилизация антиоксидантной системы клеток, которая препятствует накоплению токсических концентраций АФК. Подтверждением своевременного включения антиоксидантов в процесс защиты от чрезмерного накопления высокореакционных соединений в клетках, криоконсервированных после выделения двухэтапным центрифугированием, могут быть полученные ранее данные о сохранении упорядоченности липидного бислоя [2]. Так, если концентрация в клетках АФК превысит защитные возможности антиоксидантной системы, то развивающийся окислительный стресс может явиться причиной «запуска» запрограммированной гибели клеток (апоптоза) [4], начальной стадией которой будет выход фосфатидилсерина во внешний монослой плазматической мембраны [21].

Наименьшее количество DCF-меченых клеток наблюдалось в результате выделения клеток в градиенте плотности фиколла. Так, после криоконсервирования ЯСК количество клеток с высоким

contain a lower number of cells with an increased ROS content, than the whole cord blood. However, the increase in the DCF-labeled cell number may testify to the intensification of intracellular ROS production on the background of a combined damaging effect of chemical and physical factors on mononuclear fraction of leukocytes during isolation.

Further introduction of cryoprotectant increased the ROS content in the cells, isolated by the two-step centrifugation, unlike those, isolated in Ficoll density gradient, where this index remained almost unchanged.

The most significant changes in the ROS content in cells were observed after cryopreservation. The cells being under stress conditions are affected by additional damaging factors of freeze-thawing, which may initiate a programmed death in the cells with 'failures' in antioxidant system functioning. Following cryopreservation the number of CD45⁺DCF⁺ cells varied and depended on the method of their isolation. Analysis of the ROS content in the cells isolated by the two-step centrifugation and frozen-thawed with PEO-1500 demonstrated a significant increase (up to $42.7 \pm 6.3\%$) of a number of cells with an increased intracellular ROS content as compared to the data before freeze-thawing. Analysis of populations performed earlier allowed us to reveal the fact that elevated ROS content in the cells was provided mainly due to granulocyte and monocyte population, thereby most lymphocytes were in the state close to initial one [22].

High indices of cell number and viability may testify to absence of 'failures' in functioning of antioxidant system. Therefore, we may suggest the existence of cellular stress response, accompanied by an increased ROS production, that is stipulated by the adaptation reaction of the cells to extreme conditions, where the ROS act as the secondary messengers participating in signal transduction and expression of several genes [16]. Under these conditions of importance is the mobilization of cell antioxidant system, preventing ROS accumulation up to toxic concentrations. The previous findings on the lipid bilayer preservation may confirm a timely involvement of antioxidants in the defense against an excessive accumulation of highly reactive substances in the cells, cryopreserved after isolation by the two-step centrifugation [4]. In particular, if the ROS concentration in cells exceeds the protective capacity of antioxidant system, the developing oxidative stress may cause the initiation of programmed cell death (apoptosis) [9], the initial stage of which will be the phosphatidylserine release into outer monolayer of plasma membrane [17].

The lowest amount of DCF-labeled cells was observed when the cells were isolated in Ficoll density gradient. In particular, cryopreservation resulted in a decrease of number of NCs with high ROS content



содержанием АФК снижалось в среднем на 7% по сравнению с данными после обработки ПЭО-1500. При детальном исследовании состояния этих клеток установлено, что низкое содержание АФК не может свидетельствовать о полноценной работе их антиоксидантной системы, поскольку данный показатель должен рассматриваться в комплексе с сохранностью и жизнеспособностью клеток. Важно отметить, что даже этот невысокий процент DCF-меченых клеток в пробе полностью приходится на популяцию мононуклеаров, из которых и состоит концентрат ЯСК-2. Такая реакция клеток может рассматриваться как их ответ на прохождение градиента плотности смеси полисахарида (фиколл) и рентгеноконтрастного вещества (верографина) под действием центробежной силы, что в значительной степени нарушает стационарное состояние клеток.

Выводы

Проведенная комплексная оценка состояния ядродержащих клеток кордовой крови, в том числе стволовых гемопоэтических, в зависимости от метода криоконсервирования показала преимущества предложенного метода выделения ЯСК – двухэтапного центрифугирования с последующим криоконсервированием клеток под защитой непроницающего криопротектора ПЭО-1500. Данный метод позволяет сохранить в жизнеспособном состоянии $(83,4 \pm 1,45)\%$ ядродержащих и $(91,3 \pm 3,5)\%$ гемопоэтических стволовых клеток-предшественников. При этом увеличение количества клеток с повышенным содержанием АФК до $(42,7 \pm 6,3)\%$ на фоне высоких показателей их сохранности и жизнеспособности не является критичным и может рассматриваться как физиологичный ответ клеток на воздействие факторов криоконсервирования.

Литература

1. Бабийчук Л.А., Грищенко В.И., Рязанцев В.В. и др. Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека // Укр. журнал гематологии и трансфузиологии. – 2005. – № 4(д). – С. 122–123.
2. Бабийчук Л.А., Михайлова О.А., Zubov P.M. и др. Оценка стадий апоптоза и распределения фосфатидилсерина в мембране ядродержащих клеток пуповинной и донорской крови при различных технологиях криоконсервирования // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, №4. – С. 50–54.
3. Бабийчук Л.А., Михайлова О.А., Zubov P.M. и др. Оценка состояния различных популяций ядродержащих клеток кордовой и донорской крови в зависимости от метода их криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №4. – С. 385–394.

by 7% on average if compared to the indices after PEO-1500 treatment. Detailed study of state of these cells revealed that low ROS content was not proper index to confirm normal functioning of the antioxidant system, since this index should be considered together with the cell survival and viability. Of importance is to note, that even this low amount of DCF-labeled cells in the sample is fully accumulated in the population of mononuclear cells, forming the NC-2 concentrate. This cellular reaction may be considered as their response to the passage of the density gradient consisting of polysaccharide (Ficoll) and X-ray contrast radiopaque substance (Verografin) mixture under centrifugal force effect, which greatly disorders the cell state.

Conclusions

The implemented combined assessment of the state of cord blood nucleated cells, including hematopoietic stem ones, depending on the cryopreservation method demonstrated the advantages of the proposed way for NCs isolation, the two-step centrifugation, followed by cell cryopreservation under protection of non-penetrating cryoprotectant PEO-1500. This method enabled preservation in a viable state of $(83.4 \pm 1.45)\%$ nucleated and $(91.3 \pm 3.5)\%$ hematopoietic progenitor stem cells. Herewith, an increase in the number of cells with an increased ROS content up to $(42.7 \pm 6.3)\%$ together with high indices of their survival and viability is not critical and may be considered as physiological cell response to cryopreservation factors.

References

1. Ademokun I.A., Champan C., Dunn J et al. Umbilical cord blood collection and separation for haemopoietic progenitor cell banking. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(10): 1023–1028.
2. Babijchuk L.A., Grischenko V.I., Ryazantsev V.V. et al. New approaches to cryopreservation of human cord blood hematopoietic cells. *Ukrainian Journal of Hematology and Transfusiology* 2005; 4(d): 122–123.
3. Babijchuk L.A., Mikhailova O.A., Zubov P.M. et al. Assessment of different populations state of cord and donor blood nucleated cells depending on the cryopreservation method. *Problems of Cryobiology* 2011; 21(4): 385–394.
4. Babijchuk L.A., Mykhailova O.O., Zubov P.M. et al. Evaluation of apoptosis stages and posphatidyl serine distribution in membrane of nucleated cells of cord and donor blood under various cryopreservation protocols. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering* 2013; 3(4): 50–54.
5. Babijchuk L.O., Grischenko V.I., Gurina T.M. et al., inventors. Cryopreservation method for the cord blood nucleated cells including hematopoietic stem cells. Patent of Ukraine 92227. 2010 Oct11.
6. Babijchuk L.O., Grischenko V.I., Ryazantsev V.V. et al., inventors. Way of isolation of cord blood nucleated cells. Patent of Ukraine 23499. 2007 May25.
7. Babijchuk L.O., Grischenko V.I., Gurina T.M. et al. Way of cryopreservation of the whole cord blood. Patent of Ukraine 80062. 2007 Aug10.



4. Болдырев А.А. Роль свободных радикалов в функциональной активности нейронов. В кн.: Успехи функциональной нейрохирургии / Под ред. С.А. Дамбиновой, А.В. Арутюняна. – СПб: СПбГУ, 2003. – С. 301–317.
5. Гольцев А.Н., Калининченко Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика // Проблемы криобиологии. – 1998. – №2. – С. 3–21.
6. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопросы мед. химии. – 2001. – Т. 47, №6. – С. 561–581.
7. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.
8. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – С. 4–10.
9. Цуцаева А.А., Цыганенко А.Я., Желтякова И.А. и др. Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на свойства ядерных компонентов и плазмы цельной кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №1. – С. 45–55.
10. Чуйков В.А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства диметилсульфоксида // Криобиология. – 1989. – №1. – С. 3–10.
11. Пат. 23499, Украина, МПК С 12 N 5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, В.В. Рязанцев та ін.; заявл. 22.01.07; опубл. 25.05.07, Бюл. №7.
12. Пат. 80062, Україна МПК А01N1/02. Спосіб криоконсервування цільної кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявл. 27.02.06, опубл. 10.08.07, Бюл. №12.
13. Пат. 92227, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявл. 05. 12. 2008; опубл. 11.10. 2010, Бюл. №19.
14. Ademokun I.A., Champan C., Dunn J. et al. Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking // Bone Marrow Transplant. – 1997. – Vol. 19, №10. – P. 1023–1028.
15. Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation // J. Immunol. – 1983. – Vol. 130, №4. – P. 1910–1917.
16. Broxmeyer H. E., Hangoc G., Cooper S. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 4109–4113.
17. Burgio G.R., Locatelli F. Transplant of bone marrow and cord blood hematopoietic stem cells in pediatric practice, revisited according to the fundamental principles of bioethics // Bone Marrow Transplant. – 1997. – Vol. 19, №12. – P. 1163–1168.
18. Buttke T.M., Sandstrom P.A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis // Immunol. Today. – 1994. – Vol. 15, №1. – P. 7–10.
19. Denning-Kendall P., Donaldson C., Nicol A. et al. Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking // Exp. Hematol. – 1996. – Vol. 24, №12. – P. 1394–1401.
20. Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplant. – 1996. – Vol. 8, №4. – P. 725–731.
21. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // J. Immunol. – 1992. – Vol. 148. – P. 2207–2216.
22. Gluckman E. Hematopoietic stem cell transplants using umbilical-cord blood // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 344, №24. – P. 1860–1861.
23. Skulachev V.P. Phenomena of programmed death. Mitochondria, cells and organs: the role of reactive oxygen species. Soros Educational Journal 2001; 7(6): 4–10.
24. Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dymethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. Blood 1987; 70(4): 974–978.
25. Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals. Biochem Mol Med 1996; 59(2): 93–97.
26. Tsutsaeva A.A., Tsyganenko A.Y., Zhelyakova I.A. et al. Influence of hypothermic storage before and after cryopreservation on properties of nucleated components and whole cord blood plasma. Problems of Cryobiology 2006; 16(1): 45–55.
27. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshikova E.B. Oxidative stress. The biochemical and pathophysiological aspects. Moscow: Nauka/Interperiodica; 2001.
28. Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. J Immunol 1983; 130(4): 1910–1917.
29. Boldyrev A.A. The role of free radicals in functional activity of neurons. In: Dambinova S.A., Arutyunyan A.V., editors. Successes in functional neurochemistry. St. Petersburg: St. Petersburg State University; 2003. p. 301–317.
30. Broxmeyer H. E., Hangoc G., Cooper S. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4109–4113.
31. Burgio G.R., Locatelli F. Transplant of bone marrow and cord blood hematopoietic stem cells in pediatric practice, revisited according to the fundamental principles of bioethics. Bone Marrow Transplant 1997; 19(12): 1163–1168.
32. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol Today 1994; 15(1): 7–10.
33. Chuikov V.A. The mechanism of cryoprotective efficiency and pharmacological properties of dimethyl sulfoxide. Kriobiologiya 1989; 1: 3–10.
34. Denning-Kendall P., Donaldson C., Nicol A. et al. Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking. Exp Hematol 1996; 24(12): 1394–1401.
35. Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. Bone Marrow Transplant 1996; 8(4): 725–731.
36. Dubinina E.E. Role of reactive oxygen species as signaling molecules in the metabolism of tissues under conditions of oxidative stress. Voprosy Meditsinskoy Khimii 2001; 6: 561–581.
37. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 1992; 148: 2207–2216.
38. Gluckman E. Hematopoietic stem cell transplants using umbilical-cord blood. N Engl J Med 2001; 344(24): 1860–1861.
39. Gluckman E. Umbilical cord blood transplant in human. Hematol Cell Ther 1996; 38(5): 393–397.
40. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321(17): 1174–1178.
41. Goltsev A.N., Kalinichenko T.A. Human umbilical cord blood as a source of hematopoietic cells for clinical application. Part 2. Immunological characteristics. Problems of Cryobiology 1998; 2: 3–21.
42. Ryazantsev V.V., Babichuk L.A., Mykhailova O.O. et al. The generation of reactive oxygen species by cord blood nucleated cells during cryopreservation. Biotechnologia Acta 2014; 7(4): 100–106.



23. Gluckman E. Umbilical cord blood transplant in human // *Hematol. Cell Ther.* – 1997. – Vol. 38, №5. – P. 393–397.
24. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – Vol. 321, №17. – P. 1174–1178.
25. Ryazantsev V. V. Babichuk L. A., Mykhailova O. O. et al. The generation of reactive oxygen species by cord blood nucleated cells during cryopreservation // *Biotechnologia Acta.* – 2014. – Vol. 7, №4. – P. 100–106.
26. Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dymethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing // *Blood.* – 1987. – Vol. 70, №4. – P. 974–978.
27. Stoian I., Oros A., Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals // *Biochem. Mol. Med.* – 1996. – Vol. 59, №2. – P. 93–97.

