

УДК 615.361.018.5.013.8.014.41

А.Н. ГОЛЬЦЕВ*, В.В. ВОЛИНА, Л.В. СОКОЛ,
М.В. ОСТАНКОВ, К.А. ГОЛЬЦЕВ, С.С. ЧЕРНОУСОВА, О.Ю. КОЖИНА

Влияние гипотермического хранения и криоконсервирования на клетки лейкоконцентрата кордовой крови человека

UDC 615.361.018.5.013.8.014.41

A.N. GOLTSEV*, V.V. VOLINA, L.V. SOKOL,
M.V. OSTANKOV, K.A. GOLTSEV, S.S. CHERNOUSOVA, O.YU. KOZHINA
**Effect of Hypothermic Storage and Cryopreservation
on Human Cord Blood Leucoconcentrate Cells**

Изучали влияние гипотермического хранения до криоконсервирования и самого процесса криоконсервирования на сохранность, жизнеспособность и свойства мембран стволовых кроветворных клеток с высоким потенциалом пролиферативной активности и самоподдержки, а также некроветворных клеток лейкоконцентрата кордовой крови человека (ЛККЧ). Полученные результаты позволили экспериментально обосновать максимально допустимый срок (24 ч) гипотермического хранения кордовой крови до изготовления из нее ЛККЧ. Показано повышение проницаемости плазматических мембран стволовых кроветворных клеток с высоким потенциалом пролиферативной активности после их криоконсервирования, которая растет со сроком предварительного гипотермического хранения и под влиянием процесса криоконсервирования.

Ключевые слова: кордовая кровь человека, стволовые кроветворные и некроветворные клетки, гипотермическое хранение, криоконсервирование.

Вивчали вплив гіпотермічного зберігання до криоконсервування та самого процесу криоконсервування на збереженість, життєздатність та властивості мембран стовбурових кроветворних клітин з високим потенціалом проліферативної активності та самопідтримки, а також некроветворних клітин лейкоконцентрату кордової крові людини (ЛККЛ). Отримані результати дозволили експериментально обґрунтувати максимально допустимий строк (24 години) гіпотермічного зберігання кордової крові до виготовлення з неї ЛККЛ. Показано підвищення проникності плазматичних мембран стовбурових кроветворних клітин з високим потенціалом проліферативної активності після їх криоконсервування, яке зростає зі строком попереднього гіпотермічного зберігання та під впливом процесу криоконсервування.

Ключові слова: кордова кров людини, стовбурові кроветворні та некроветворні клітини, гіпотермічне зберігання, криоконсервування.

Pre-cryopreservation hypothermic storage and cryopreservation process itself effects on integrity, viability and membrane properties of hemopoietic stem cells with high proliferative activity and self-support potentials as well as of non-hemopoietic human cord blood leucoconcentrate (HCBL) cells were investigated, as well as correlation between phenotypic marker expression and functional condition of these cells was assessed. The data obtained allowed experimental substantiating the maximally acceptable term of hypothermic storage (24 hrs) of cord blood prior to production of HCBL. A rise in plasmatic membrane permeability of stem hemopoietic cells with a high proliferative activity potential after their cryopreservation was shown. The permeability also increased, as the term of preliminary hypothermic storage was prolonged.

Key words: human cord blood, stem hemopoietic and non-hemopoietic cells, hypothermic storage, cryopreservation.

Определение температурных условий и длительности хранения образцов кордовой крови человека (ККЧ) до замораживания остается существенной проблемой, так как кровь необходимо транспортировать в специализированные лаборатории для работы, связанной с выделением ядро-содержащих клеток ККЧ, их тестированием и криоконсервированием. Также не решена проблема длительности хранения образцов препаратов,

The selection of temperature conditions and storage duration of human cord blood (HCB) samples before freezing has presented a great challenge, since the blood is supposed to be transported to specialized laboratories for isolation of HCB nuclear cells, their testing and cryopreservation. The problem of storage duration for samples of HCB preparations in case of impossibility of cryopreservation right after their obtainment, was not solved either.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

изготовленных из ККЧ, при невозможности их криоконсервирования сразу после получения.

Вопросы длительности хранения образцов кордовой крови до изготовления из нее препаратов и криоконсервирования гемопоэтических клеток освещены во многих научных работах [6, 7, 13]. Результаты исследований подтверждают, что условия хранения ККЧ перед замораживанием важны для обеспечения сохранности качества клеточного материала. Однако данных о длительности хранения перед низкотемпературным замораживанием препаратов, изготовленных из ККЧ, недостаточно, следовательно, эта проблема требует детального изучения.

Цель работы – изучение влияния гипотермического хранения до криоконсервирования и самого процесса криоконсервирования на сохранность и жизнеспособность стволовых кроветворных клеток с высоким потенциалом пролиферативной активности и самоподдержки, а также некроветворных клеток ККЧ.

Материалы и методы

Объектом исследования служили образцы ККЧ, которые получали из материнского конца пуповины после отделения новорожденных, родившихся в срок у здоровых рожениц, а также лейкоконцентрат ККЧ (ЛККЧ), взвешенный в аутологичной плазме и полученный из ККЧ седиментационным методом [2].

Кровь отбирали в стерильные флаконы с добавлением антикоагулянта СРД (цитратно-фосфатно-декстрозный раствор). Перед получением ЛККЧ кордовую кровь хранили в бытовом холодильнике при 4°C.

Замораживали ККЧ и ЛККЧ в одноразовых пластиковых контейнерах по двухэтапной программе без использования традиционных криопротекторов [3]. Криоконсервированные образцы хранили в жидком азоте при температуре –196°C.

Для отогрева суспензий контейнеры погружали в водяную баню при температуре 40–41°C.

В зависимости от условий гипотермического хранения образцы ККЧ были разделены на группы:

ККЧ₁, хранившаяся при 4°C в течение 24 ч после получения из родильного дома до криоконсервирования (контроль для групп ККЧ₂ и ККЧ₃);

ККЧ₂, хранившаяся при 4°C в течение 48 ч до криоконсервирования (контроль для группы ККЧ₄);

ККЧ₃, криоконсервированная после 24 ч предварительного гипотермического хранения (контроль для группы ККЧ₄);

ККЧ₄, криоконсервированная после 48 ч предварительного гипотермического хранения.

ЛККЧ также был разделен на группы:

ЛККЧ₁ – нативный лейкоконцентрат, полученный из ККЧ₁ (контроль для группы ЛККЧ₂);

A lot of scientific works gave coverage to issues of storage duration of cord blood samples prior to production of preparations from it and to hemopoietic cell cryopreservation [6, 7, 13]. The results of researches confirm that storage conditions of HCB before freezing are important for providing quality maintenance of cell material. Nevertheless the data on storage duration before freezing HCB preparations are insufficient, consequently this matter requires further investigations.

The aim of the work is to study the effect of pre-cryopreservation hypothermic storage and cryopreservation process itself on integrity and viability of hemopoietic stem cells with high proliferative activity and self-maintenance potentials as well as of non-hemopoietic HCB cells.

Materials and methods

The subject of inquiry was HCB samples, which were obtained from maternal end of umbilical cord after separating neonates, who were born in time by healthy obstetric patients, as well as HCB leukoconcentrate (HCBL) suspended in autologous plasma and obtained by sedimentation [2].

Blood was collected in sterile flasks with CPD (citrate-phosphate-dextrose solution) anticoagulant. Cord blood was stored prior to HCBL production in a domestic fridge at 4°C.

HCB and HCBL were frozen in disposable plastic containers according to the two-stage program without traditional cryoprotectants [3]. Cryopreserved samples were stored in liquid nitrogen at –196°C.

Containers were immersed in a water bath at the temperature 40–41°C for thawing suspensions.

Depending on hypothermic storage conditions HCB samples were divided into the groups:

HCB₁ was stored at 4°C for 24 hrs after delivering from a maternity hospital prior to cryopreservation (control for the groups HCB₂ and HCB₃);

HCB₂ was stored at 4°C for 48 hrs prior to cryopreservation (control for the group HCB₄);

HCB₃ was cryopreserved after 24 hour preliminary hypothermic storage (control for the group HCB₄);

HCB₄ was cryopreserved after preliminary 48-hour hypothermic storage.

HCBL was divided into the groups:

HCBL₁ was native leukoconcentrate obtained from HCB₁ (control for HCBL₂);

HCBL₂ was frozen-thawed HCBL₁ right after thawing.

Numbers of nucleated cells in the control and experimental samples were counted in Goryaev's chamber by the standard method, and integrity of nuclear cell was assessed by supravital staining with trypan blue [10].

Quantity of colony forming units in culture (CFUc) was determined by numbers of clusters and colonies, formed in semiliquid agar, by the method [8, 12] with

ЛККЧ₂ – криоконсервированный ЛККЧ₁ сразу после отогрева.

В опытных и контрольных образцах препарата по общепринятой методике определяли количество ядросодержащих клеток в камере Горяева и количество сохранных клеток методом суправитального окрашивания трипановым синим [10].

Количество КОЕк (колониеобразующие единицы в культуре) определяли по числу кластеров и колоний, сформировавшихся в полужидком агаре, по методу [8, 12] в нашей модификации. Типы колоний оценивали на 8-е сутки культивирования с помощью инвертированного микроскопа на гистологических препаратах, изготовленных из агаровых блоков и окрашенных гематоксилином и эозином [5]. Сохранность ядерных гемопоэтических клеток ККЧ определяли с помощью окрашивания пропидиум йодидом, проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD, США) и программного обеспечения Win MDI [9].

Полученные результаты обрабатывали по методу Стьюдента с учетом коэффициента Фишера. Достоверность отличий оценивали с помощью t-критерия с уровнем значимости 5% [1].

Результаты и обсуждение

Установлено, что количество сохранных ядросодержащих клеток (по окрашиванию трипановым синим) во всех образцах оставалось на достаточно высоком уровне (таблица). Этот факт может быть объяснен тем, что гипотермическое хранение и криоконсервирование не приводили к повреждению мембран ядросодержащих клеток ККЧ.

Количество стволовых кроветворных клеток, коррелирующее с количеством КОЕк, также не изменялось на этапах гипотермического хранения и после криоконсервирования (таблица).

В процессе культивирования ядросодержащих клеток кордовой крови, хранившейся 24 и 48 ч при температуре 4°C до криоконсервирования, а также в отогретых образцах ККЧ₃ количество и типы образованных колоний достоверно не изменялись (таблица). После 48 ч в отогретых образцах ККЧ₄ относительное количество сохранных клеток и количество образованных колоний имели тенденцию к снижению.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что на этапах гипотермического хранения через 48 ч возникают незначительные повреждения ядросодержащих клеток, проявляющиеся в снижении их криоустойчивости. В связи с этим для последующего криоконсервирования ЛККЧ

our modification. Colony types were assessed to the 8th day of culture on an inverted microscope in histological preparations obtained from agar blocks and stained with hematoxylin and eosin [5]. HCB nuclear hemopoietic cell integrity was determined using propidium iodide staining and FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, USA), the data were processed with Win MDI software [9].

The data obtained were processed by Student's test with Fisher's correction. The difference significance was assessed by the t-test with the significance level of 5% [1].

Results and discussion

The integrity of nuclear cell in all the samples (assessed by trypan blue staining) was established to remain considerably high (Table). This can be attributed to the fact that hypothermic storage and cryopreservation caused no injuries of HCB nucleated cell membranes.

The number of hemopoietic stem cells correlating with CFUc did not change during hypothermic storage and after cryopreservation, either (Table).

During culturing of cord blood nucleated cells stored for 24 and 48 hrs at 4°C prior to cryopreservation as well as in thawed HCB₃ samples the number and types of the formed colonies did not change significantly (Table). The relative quantity of viable cells and the quantity of formed colonies tended to decline in the thawed HCB₄ samples after 48 hrs.

Количество ядросодержащих клеток, относительное количество сохранных клеток и КОЕк ЛККЧ в зависимости от сроков гипотермического хранения и последующего криоконсервирования (n = 6)

Quantity of nucleated cells, relative quantities of viable cells and CFUc in HCB_L depending on hypothermic storage terms and following cryopreservation (n = 6).

Образцы Samples	Количество ядросодержащих клеток, ×10 ⁷ /мл Number of nuclear cells, ×10 ⁷ /ml	Относительное количество сохранных клеток, % Relative quantity of safe cells, %	Количество КОЕк, % CFUc quantity, %
ККЧ ₁ HCB ₁	1,15 ± 0,31	97 ± 1	2,50 ± 0,95
ККЧ ₂ HCB ₂	1,10 ± 0,87	96 ± 1	3,0 ± 0,7
ККЧ ₃ HCB ₃	1,15 ± 0,33	83 ± 1	3,2 ± 0,6
ККЧ ₄ HCB ₄	0,68 ± 0,66 ^{1,2}	37,0 ± 1,4 ^{1,2}	2,0 ± 0,7
ЛККЧ ₁ HCB _{L1}	1,50 ± 0,38	97 ± 1	2,70 ± 0,86
ЛККЧ ₂ HCB _{L2}	1,35 ± 0,32	86,0 ± 1,6	2,50 ± 0,43

Примечание: ¹ – отличия достоверны (p < 0,05) в сравнении с ККЧ₂; ² – отличия достоверны (p < 0,05) в сравнении с ККЧ₃.

Note: * – significant differences (p < 0.05) as compared to data of HCB₂; ² – significant differences (p < 0.05) as compared to data of HCB₃.

получали из кордовой крови человека, хранившейся в условиях гипотермии не более 24 ч.

После отогрева криоконсервированного ЛККЧ₂ количество ядросодержащих и относительное количество сохранных клеток достоверно не изменялись по сравнению с их содержанием в образцах ЛККЧ₁ (таблица).

Популяция гемопоэтических клеток ККЧ является гетерогенной, в ней наряду с ГК разной степени дифференциации присутствуют и зрелые клеточные элементы. Известно, что стволовые и ранние клетки-предшественники зрелых клеточных типов имеют достаточно высокую устойчивость к условиям гипотермии по сравнению с другими клетками [4]. Показано, что процессы гипотермического хранения и последующего низкотемпературного консервирования не влияют на функциональную активность клеток, образующих в агаровых культурах кластеры и микроколонии. Клетки ЛККЧ₂ образовывали те же самые колонии, что и клетки ЛККЧ₁, находящиеся на разных стадиях дифференцирования (миелобласты, миелоциты, палочко- и сегментоядерные клетки). Однако чаще всего отмечали макроколонии миелоидно-моноцитарного типа (рис. 1).

Кроме того, встречались колонии, которые были сформированы фибробластоподобными клетками. Они имели волокнистые структуры, образующие соединительно-тканый каркас вокруг клеточных элементов колоний (рис. 2).

Количество, пролиферативная активность и направленность дифференцирования стволовых кроветворных клеток лейкоконцентрата после криоконсервирования не изменялись (таблица). На 8-е сутки культивирования деконсервированные кроветворные клетки формировали такое же количество и тот же тип колоний, как и клетки суспензии до замораживания-отогрева (эритроидные, моноцитарно-макрофагальные, миелоидные колонии, а также колонии, сформированные фибробластоподобными и недифференцированными клетками).

Результаты экспериментов свидетельствуют, что гипотермическое хранение при 4°C в течение

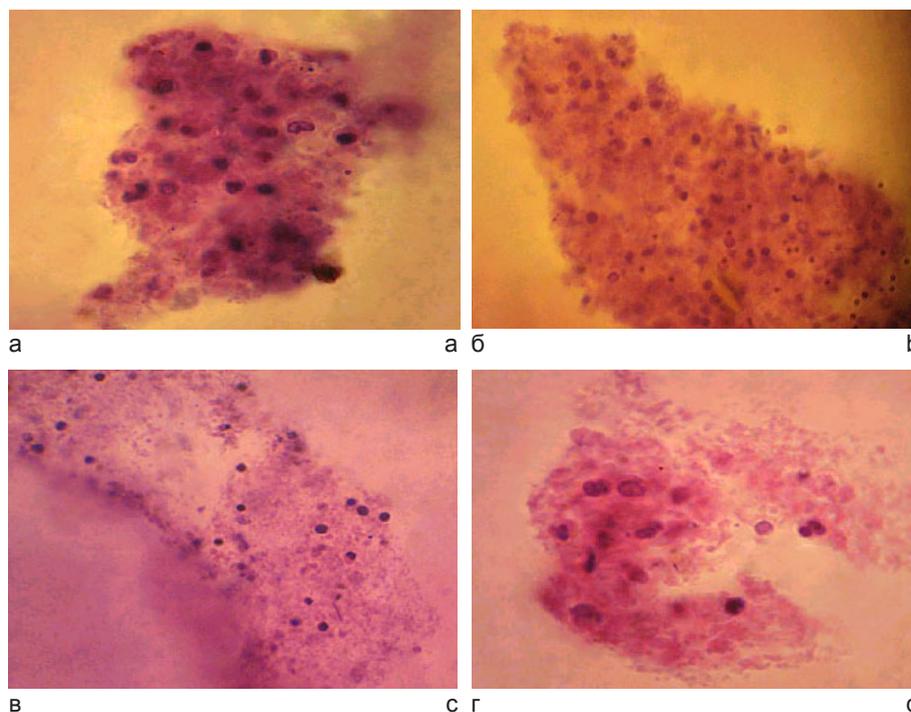


Рис. 1. Колонии миелоидно-моноцитарного типа на 8-е сутки культивирования клеток ЛККЧ: а – свежевыделенный образец; б – образец, хранившийся в условиях гипотермии в течение 24 ч; в – образец, криоконсервированный непосредственно после получения; г – образец, криоконсервированный после 24 ч предварительного гипотермического хранения. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 900$.

Fig. 1. Myeloid-monocyte colonies to the 8th day of culture of the HCBL cells: a – freshly isolated; b – stored under hypothermic conditions for 24 hrs; c – frozen-thawed immediately after isolation; d – frozen-thawed after the preliminary 24-hour hypothermic storage. Hematoxylin and eosin staining. $\times 900$.

These results show the appearance of non-lethal injuries in nuclear cells after 48-hour hypothermic storage leading to a decrease in their cryoresistance. Due to this fact HCBL for further cryopreservation was isolated from human cord blood stored under hypothermic conditions not longer than 24 hrs.

Post-thaw number of nucleated cells and the relative integrity of HCBL₂ cells were not changed significantly as compared to the data of HCBL₁ (Table).

Population of HCB hemopoietic cells is heterogeneous: along with HC of different differentiation stages HCB contains mature cells. Stem cells and early precursor cells of mature cell types are known to have rather high tolerance to hypothermic conditions in comparison with other cells [4]. Hypothermic storage and following low temperature preservation were not shown to affect the functional activity of cells forming clusters and microcolonies in agar cultures. HCBL₂ cells formed the same colonies as cells of the HCBL₁, represented by cells of different differentiation stages (myeloblasts, myelocytes, rod nucleated and segmented cells) did. However macrocolonies of myeloid-monocytic type were the most frequent (Fig. 1).

Additionally the colonies formed by fibroblast-like cells were noted. They had fibroid structures forming connective-tissue network around colony cells (Fig. 2).

24 ч не влияло на сохранность, функциональную активность и криоустойчивость стволовых кроветворных и некроветворных клеток в составе ККЧ. После 48 ч гипотермического хранения в ККЧ количество ядродержащих клеток и их сохранность имели тенденцию к снижению. Достоверное снижение количества ядродержащих и сохраняемых клеток выявляется после криоконсервирования данных образцов кордовой крови по оптимальной программе, что свидетельствует о развитии нелетальных повреждений ядродержащих клеток в условиях гипотермии, которые на этапах криоконсервирования переходят в летальные и являются причиной снижения их криоустойчивости. Как было показано на других биообъектах, причинами развития нелетальных повреждений являются длительная гипоксия, изменения физико-химических свойств клеточных мембран и их проницаемости, а также нарушение последовательности течения метаболических процессов в клетках, в результате чего происходит накопление промежуточных продуктов метаболизма [11].

Таким образом, установлено, что оптимальный срок гипотермического хранения ККЧ до начала получения из нее ЛККЧ равен 24 ч.

Использование специфического для ДНК флуоресцентного красителя пропидия йодида (PI) позволило визуализировать потерю целостности плазматических мембран клеток ЛККЧ после замораживания-отогрева. В образцах ЛККЧ₂ количество PI⁻-клеток (с неповрежденной мембраной) и PI⁺-клеток составило соответственно $50,0 \pm 10,8$ и $49,9 \pm 10,8$.

Большой разброс показателей сохранности клеток ЛККЧ в образцах можно объяснить неоднородностью исходного материала (ККЧ) и чувствительностью криоконсервированного материала к физико-химическим факторам и условиям получения данных на цитофлуориметре.

Выводы

Полученные результаты позволили экспериментально обосновать максимально допустимый срок (24 ч) гипотермического хранения кордовой крови до получения из нее ЛККЧ.

Было показано уменьшение сохранности плазматических мембран стволовых кроветворных

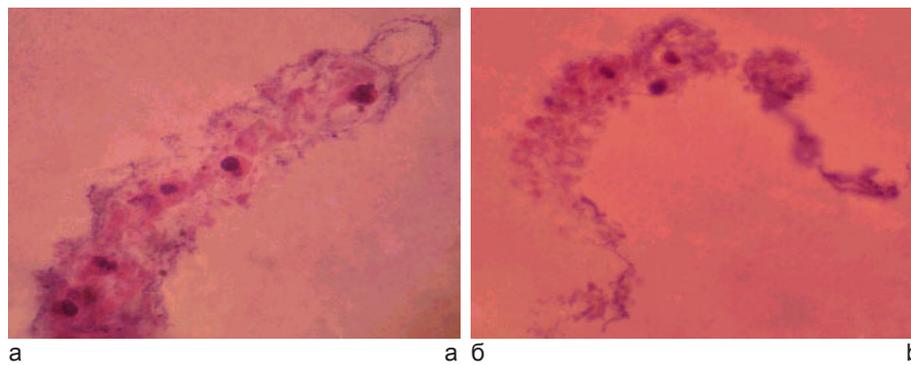


Рис. 2. Колонии фибробластоподобных клеток на 8-е сутки культивирования клеток ЛККЧ: а – ЛККЧ₁; б – ЛККЧ₂. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

Fig. 2. Colonies of fibroblast-like cells to the 8th culture day in HCBL: a – HCBL₁; b – HCBL₂. Hematoxylin and eosin staining, $\times 400$.

The number, proliferative activity as well as direction of differentiation in leukoconcentrate hemopoietic stem cells was not changed after freeze-thawing (Table). On the 8th day of culture the post-thaw hemopoietic cells formed the same quantity and the same types of colonies as cells not subjected to freeze-thawing (erythroid, monocytic-macrophage, myeloid colonies as well as colonies formed by fibroblast-like and non-differentiated cells).

The results testify the fact that 24-hour hypothermic storage at 4°C did not influence the safety, functional activity and cryotolerance of hemopoietic and non-hemopoietic stem cells in HCB. After 48-hour hypothermic storage the number of nucleated cells and cell integrity tended to decline in HCB. A significant decrease in the quantity of nucleated cells and their integrity was observed after cryopreservation according to the optimal program of these cord blood samples, that attests to non-lethal injuries development in nuclear cells under hypothermic conditions, turning into lethal ones during freeze-thawing and are responsible for a decline in the cell cryoresistance. As it was shown in other bioobjects, prolonged hypoxia, physico-chemical changes in cell membrane properties and their permeability as well as distortions of metabolic processes succession in cells accounted for development of non-lethal injuries in cells, which led to accumulation of intermediate metabolic products [11].

Thus it was found that the optimal term of HCB hypothermic storage prior to HCBL isolation is 24 hrs.

The usage of the DNA-specific fluorescent dye propidium iodide (PI) allowed to reveal the loss of plasmatic membrane integrity in HCBL cells after freeze-thawing. In HCBL₂ samples the number of PI⁻ cells (with non-affected membrane) and PI⁺ cells made 50.0 ± 10.8 and 49.9 ± 10.8 , correspondingly.

A great variability of HCBL cell safety indices in the samples can be attributed to heterogeneity of the original material (HCB) and to sensitivity of the cryo-

клеток с высоким потенциалом пролиферативной активности после их криоконсервирования. Этот показатель зависел также от сроков предварительного гипотермического хранения.

Литература

1. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш. школа, 1980.– 293 с.
2. Цуцаева А.О., Грищенко В.І., Кудокоцева О.В., Прокопчук О.С. Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування гемопоетичних клітин кордової крові людини: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 16 с.
3. Патент №31847А, МПК А01N1/02. Україна. Спосіб криоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаева, В.І. Грищенко, О.В. Кудокоцева та інш. Заявлено 05.11.1998; Опубл. 15.12.2000. Бюл. №7.– С. 1–10.
4. Berz D., McCormack E.M., Winer E.S. et al. Cryopreservation of hemopoietic stem cells // J. Hematol.– 2007.– Vol. 82, N6.– P. 463–472.
5. Bol S., Engh G., Visser J. A technique for staining haemopoietic colonies in agar cultures // Exp. Hemat.– 1977.– Vol. 97, N5.– P. 551–553.
6. Campos L., Roubi N., Gyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hemopoietic cells // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N6.– P. 511–515.
7. Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplantation.– 1996.– Vol. 42, N18.– P. 725–731.
8. Knudtson S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood // Blood.– 1974.– Vol. 43, N3.– P. 357–361.
9. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases // Exp. Cell Res.– 2002.– Vol. 277, N1.– P. 1–14.
10. Malinin T.I., Perry V.P. A review of tissue and organ viability assay // Cryobiology.– 1967.– Vol. 4, N3.– P. 104.
11. Meyer T.P., Hofmann B., Zaisserer J. et al. Analysis and cryopreservation of hemopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood // Cytotherapy.– 2006.– Vol. 8, N3.– P. 265–276.
12. Nakanata T. Hemopoetic colony-forming cells umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoetic progenitors // J. Clin. Invest.– 1982.– Vol. 7, N6.– P. 1324–1328.
13. Rubinstein P., Roserfiels R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood.– 1993.– Vol. 81, N7.– P. 1679–1690.

Поступила 16.02.2010
Рецензент Н.Г. Землянских

preserved material to physico-chemical factors and conditions of the data collection with cytofluorimeter.

Conclusions

The data obtained allowed experimental substantiating the maximally acceptable term (24 hrs) of hypothermic storage of cord blood prior to production of HCBL.

A decrease in plasmatic membrane integrity of hemopoietic stem cells with high proliferative activity potential was noted after their cryopreservation. This index was affected by the term of preliminary hypothermic storage.

References

1. Lakin G.F. Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1980.– 293 p.
2. Tsutsayeva A.O., Grischenko V.I., Kudokotseva O.V., Prokopyuk O.C. Procurement, cryopreservation and clinical application of human cord blood hemopoietic cells: Methodical recommendations.– Kharkiv, 2000.– 16 p.
3. Patent of Ukraine N31847A, IPC A01N1/02. Method for cryopreservation of cord blood hemopoietic cells / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva, A.V. et al.– Filed in: 11.05.98. Published in: 12.15.2000. Bul. N7.– P.1–10.
4. Berz D., McCormack E.M., Winer E.S. et al. Cryopreservation of hemopoietic stem cells // J. Hematol.– 2007.– Vol. 82, N6.– P. 463–472.
5. Bol S., Engh G., Visser J. A technique for staining haemopoietic colonies in agar cultures // Exp. Hemat.– 1977.– Vol. 97, N5.– P. 551–553.
6. Campos L., Roubi N., Gyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hemopoietic cells // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N6.– P. 511–515.
7. Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplantation.– 1996.– Vol. 42, N18.– P. 725–731.
8. Knudtson S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood // Blood.– 1974.– Vol. 43, N3.– P. 357–361.
9. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases // Exp. Cell Res.– 2002.– Vol. 277, N1.– P. 1–14.
10. Malinin T.I., Perry V.P. A review of tissue and organ viability assay // Cryobiology.– 1967.– Vol. 4, N3.– P. 104.
11. Meyer T.P., Hofmann B., Zaisserer J. et al. Analysis and cryopreservation of hemopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood // Cytotherapy.– 2006.– Vol. 8, N3.– P. 265–276.
12. Nakanata T. Hemopoetic colony-forming cells umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoetic progenitors // J. Clin. Invest.– 1982.– Vol. 7, N6.– P. 1324–1328.
13. Rubinstein P., Roserfiels R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood.– 1993.– Vol. 81, N7.– P. 1679–1690.

Accepted in 16.02.2010