

Размораживание и отмывка стволовых клеток пуповинной крови- спорные моменты и собственный опыт.

*Селиванов Е.А.1., Смолянинов А.Б.2,3, Иволгин Д.А.2,3, Коровина К.В.3, Хрупина А.С.2,3
1-ФГУ РосНИИГТ ФМБА РФ- Санкт-Петербург, Россия, 2-я Советская ул., 8, (812)
274-56-38, bloodscience@mail.ru*

*2- НИИ Клеточных Технологий СПбМАПО ФАЗСР- Санкт-Петербург, Россия,
199106, Большой пр. В.О., 85, (812) 777-02-06, stemcellbank@inbox.ru*

*3- Покровский Банк Стволовых Клеток- Санкт-Петербург, Россия,
199106, Большой пр. В.О., 85, (812) 777-02-06, stemcellbank@inbox.ru*

Резюме

Сегодня не существует унифицированных протоколов для замораживания, размораживания и подготовки к трансплантации стволовых клеток ПК. Мы исследовали 31 образец концентрата лейкоцитарной фракции пуповинной крови (ПК)- 11 размороженных образцов обрабатывали аппаратным методом на Sepax S100 (Biosafe, Швейцария) (группа 1), и 11 образцов обрабатывали ручным методом на центрифуге (группа 2), 9 образцов без отмывки от ДМСО составили группу сравнения (группа 3). Во всех образцах определялось количество ядерных клеток, количество и жизнеспособность CD34+/CD45+ клеток в концентрате лейкоцитарной фракции до замораживания, после размораживания и отмывки клеток от криопротектора двумя способами: на аппарате Sepax S-100 и ручным методом на центрифуге. Среднее выхода CD34/45+ в группе 1, 2 и 3 составила 92±9%, 81±7% и 94±6%, соответственно, среднее выхода ядерных клеток в группах 1, 2 и 3 составила 93±3%, 85±4% и 94±3% (p<0,05), соответственно, жизнеспособность клеток после размораживания в группах 1, 2, 3 составила 94,9±2,4%, 93,7±2,2% и 94,4±2,1%, (p<0,05), соответственно. Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что способ размораживания и последующей обработки образца ПК не влияет на показатели жизнеспособности CD34/45+ клеток, а наибольший процент потери ядерных и CD34/45+ клеток (15% и 19%, соответственно) наблюдается в группе 2, в то время как показатели клеточного концентрата, в группах 1 и 3 существенно не различались. Таким образом, при наличии соответствующего технического оснащения, отмывка концентрата стволовых клеток пуповинной крови от криопротектора с помощью автоматической системы не ведет к ухудшению качественных показателей образца ПК.

Ключевые слова: криоконсервация, пуповинная кровь, стволовые клетки, ДМСО, Sepax S-100

Human umbilical stem cells thawing and washing- controversies and Pokrovski Stem Cells bank experience.

Selivanov E.A.1, Smolyaninov A.B.2,3, Ivolgin D.A.2,3, Korovina X.V.3, Khrupina A.S.2,3

Abstract

Today there is no standardized protocols for freezing, thawing and umbilical cord blood (UCB) stem cells preparation for transplantation. We studied 31 units of cord blood- 11 thawed units were washed using Sepax S-100 (Biosafe, Switzerland) (group 1), 11 units were washed using centrifuge (group 2) and 9 unwashed units were reference group (group 3).

The study includes enumeration of nuclear cells, amount and viability of CD34/CD45+ cells in UCB units before cryopreservation, after thawing and washing with two methods mentioned above. Mean of CD34/45+ cells recovery in groups 1, 2 and 3 was $92\pm 9\%$, $81\pm 7\%$ и $94\pm 6\%$, ($p<0,05$), respectively, mean of nuclear cells recovery in groups 1, 2 and 3 was $93\pm 3\%$, $85\pm 4\%$ и $94\pm 3\%$, ($p<0,05$), respectively and viability in groups 1, 2 and 3 was $94,9\pm 2,4\%$, $93,7\pm 2,2\%$ и $94,4\pm 2,1\%$, ($p<0,05$), respectively. Our conclusion is that method of thawing and subsequent processing of UCB unit doesn't affect viability of CD34/45+ cells and the largest nuclear and CD34/45+ cells lost (15% and 19%, respectively) observed in group 2, while parameters of cell concentrate didn't differ significantly. Therefore in case of availability of appropriate technical equipment, washing UCB unit from cryoprotectant using an automated system does not lead to deterioration of quality parameters of UCB unit.

Key words: cryopreservation, cord blood, stem cells, DMSO, Sepax S-100

Введение

Пуповинная кровь (ПК) была использована для лечения более 14000 пациентов с различными заболеваниями- как злокачественными так и незлокачественными.[1] Эта особенность основана прежде всего на том что ПК содержит гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП) которые могут замещать систему крови должным образом подготовленного (кондиционированного) пациента.[2] Начало большому количеству исследований, подтверждающих что ПК может быть потенциальным источником пригодных для трансплантации СК/ГКП положила успешная трансплантация ПК, осуществленная 6 октября 1988 года.[3,4]

Криоконсервация традиционно применяемых источников гемопоэтических стволовых/прогениторных глеток (ГСК/ГПК)- костного мозга и периферической крови для терапевтического использования проводится более 30 лет, тот же метод применяется и для длительного хранения пуповинной крови. Оптимальная криоконсервация и получение жизнеспособных ГСК/ГПК (определяемая по потенциалу приживления (энграфтмента)) зависит от ряда параметров, включающих:

- (1) время перевозки и температуру хранения после сбора,
- (2) обработку перед криохраниением,
- (3) выбранный криопротектант,
- (4) скорость, температуру и протоколы замораживания и размораживания,
- (5) температуру длительного хранения [5].

Рассмотрим эти параметры более подробно, тем более что единой точки зрения на оптимум криоконсервации пока нет.

1. Время перевозки и температура хранения после сбора.

По данным Hubel A et al.[6,7] на жизнеспособность клеток пуповинной крови, оцениваемый после размораживания, не оказывало влияние хранение и транспортировка её в течение 24 часов после сбора.

В исследовании, посвященном оценке влияния места сбора, отсрочки обработки ПК, эффекту криоконсервации на прогениторные клетки ПК (Shlebak A et al.), было выявлено что:

значимых различий в общем количестве ядерных клеток (ОЯК), мононуклеарных клеток (МНК), КОЕ-ГМ или БФЕ-Э в образцах, взятых из вен пуповины или вен основания плаценты не было;

хранение ПК при комнатной температуре или при 4° С более 9 часов приводит к значимому сокращению количества прогениторных клеток;

и криоконсервация, как после программируемого замораживания так и после пассивного замораживания, незначительно сокращала количества МНК, жизнеспособность и выживание КОЕ-ГМ, а потенциал КОЕ-ГМ продуцировать вторичные колонии значимо сокращался после криоконсервации ($P = 0.04$) [8].

2. Обработка перед криохранением.

На сегодняшний день достаточных данных о влиянии способа обработки пуповинной крови на количественные и качественные показатели ГСК/КПК пуповинной крови нет, это аспект оптимизации процедуры криоконсервации нуждается в дальнейшем изучении.

3. Выбранный криопротектант.

В 1959 году в качестве криопротектора для ГСК/ГПК был предложен и получил широкое распространение в протоколах криоконсервации диметилсульфоксид (ДМСО) [9].

В настоящее время различия в протоколах использования ДМСО как криопротектора представляют собой использование его в разных концентрациях с целью максимально снизить количество токсических эффектов и осмотического стресса.

Имеющиеся в настоящее время протоколы криоконсервации используют методы, установленные для прогениторных клеток КМ и ПерК [10,11], которые зачастую разрабатывались эмпирически. Такие протоколы могут привести к потере до 50% популяции ядерных клеток: потери для пуповинной крови неприемлемые. Исследуя влияние концентрации ДМСО, скорости его добавления и удаления, было подтверждено заключение об оптимальной для ПК концентрации ДМСО-10% [10,11].

Способность ДМСО вызывать токсические эффекты известна. Исследования на животных моделях показали дозозависимое сосудосуживающее действие ДМСО [12]

Также описаны и токсические явления при использовании ДМСО у людей. Такие явления развиваются во время реинфузии криоконсервированных клеток. Наиболее частые побочные эффекты, такие как тошнота, рвота и колики в животе наблюдаются практически у 50% пациентов [13] и, как считается, возникают из-за вагусного ответа, вызываемого внутривенной инфузией холодной жидкости. Были также сообщения о сердечно-сосудистых и респираторных нарушениях, таких как гипотензия и брадикардия [14] или, гораздо реже, гипертензия и тахикардия, фатальная аритмия [15], остановка дыхания [16,17] и диффузное альвеолярное кровотечение [18]. Некоторые центры описывали случаи токсического действия на нервную систему, такие как обратимая лейкоэнцефалопатия [19], эпилептические припадки [20,21] и инсульт [22,23]. Кроме того, сообщалось также и о подъеме уровней ЛДГ [24] и гемоглобинемии [25]

Наряду с традиционно применяемым в трансплантации стволовых клеток как стандартный криопротектант 10% ДМСО было высказано предположение, что целесообразным может быть снижение его концентрации. Более низкие концентрации ДМСО, например, 5% [26,27] или 3.5% [28] являются эффективными криопротектантами. Отмывка стволовых клеток для удаления ДМСО, судя по всему, не оказывает неблагоприятного действия на гематологическое восстановление и может сократить токсические эффекты [29] и дробное применение стволовых клеток также может сократить риск побочных эффектов [30]. Несколько лет назад под эгидой EBMT проводилось исследование, в котором приняли участие 97 центров трансплантации и целью которого было оценить современную практику использования ДМСО и получить данные по его токсичности [31].

Большинство центров (n=78) использовали концентрацию 10% ДМСО и только 5 центров – 5% ДМСО. Из 95 центров токсические эффекты ДМСО наблюдались в 57 (60%), общее количество таких случаев составило 470. Всего, 95 центрами было проведено примерно 34 000 трансплантаций что дает минимальную итоговую частоту (т.е. общее количество побочных эффектов разделенное на общее количество трансплантаций) в 1.4%; примерно один на каждые 70 выполненных трансплантаций. Средняя частота токсических эффектов ДМСО на центр составила 2.1%. В то же время использование стратегий снижения количества ДМСО (концентрация менее 10% или отмывка клеток перед возвратом- 22 центра) была ассоциирована с итоговой частотой токсичности 0.3%.

Интересно, что при таких данных авторами делается вывод о том, что неизвестно, приводит ли сокращение вводимого количества ДМСО к сокращению побочных эффектов и о том, что сегодня не существует никаких нормативных документов по его использованию и большинство трансплантационных центров разрабатывают собственные протоколы для использования и применения ДМСО.

4. Скорость, температура и протоколы замораживания и размораживания.

Одним из первых получивших широкое распространение протоколов криоконсервации и размораживания пуповинной крови стал метод Нью-Йоркского Центра Крови [32], в котором образцы пуповинной крови после добавления 10% ДМСО пассивно охлаждались до -50°C и затем помещались в жидкую фракцию азота для хранения. Размораживание проводилось в водяной бане при 37 °C, затем клетки отмывались в растворе 2,5% человеческого альбумина и 5% декстрана, центрифугировались и ресуспендировались.

С развитием оборудования для замораживания и появлением т.н. замораживателей с программируемой скоростью протоколы замораживания также претерпели изменения. Появилась возможность составлять программы замораживания- примером может служить протокол Университета Миннесоты [6]. В ряде исследований была показана эффективность программного замораживания. Так, например, в исследовании Meyer T.P. et al [33] после криоконсервации на программном замораживателе, наблюдалась высокая жизнеспособность (89%) и количество CD34+ клеток (89%) и КОЕ (88%)

Одним из спорных моментов до сих пор является вопрос об отмывке клеток от ДМСО. Одно исследование показало, что размораживание и отмывка клеток приводит к значительной потере клеток (20% общего количества ЯК по сравнению с количеством до замораживания), причем на отмывку приходится половина этой потери [34], а другое- что удаление ДМСО не приводит к значимой потере количества клеток, жизнеспособности, активности КОЕ-ГМ или количестве CD34+ клеток, с оговоркой на то, что данная процедура занимает 3-4 часа работы лаборатории [35]. Есть данные о том, что удаление ДМСО центрифугированием значительно снижает количество и жизнеспособность CD34+ клеток после размораживания как пуповинной так и периферической крови [36]. С другой стороны, показатели кумулятивной частоты приживления и медианы времени восстановления количества нейтрофилов и тромбоцитов в группах с отмыванием клеток и без отмывания не различались [37].

T Hahn в своей работе предлагает вводить ПК пациентам сразу после размораживания не отмывая для упрощения процедуры и сокращения потерь клеток, особенно в случаях

находящихся на пределе клеточных доз когда есть заключение, что предстоящая потеря клеток может неблагоприятно повлиять на исход ТПК [38].

Развитие технологий, и, в частности, появление автоматических клеточных сепараторов, частично разрешило многолетнюю дискуссию о необходимости отмывки клеток от ДМСО.

В одном из исследований при использовании для отмывки клеток автоматической системы были получены следующие результаты: медиана полученных CD34+ клеток составила 93% и ОЯК -89%; кроме того, медиана жизнеспособности CD34+ клеток по оценке аннексином V и 7-аминоактиномицином D (7-AAD), была 98% и 94%, соответственно [39].

5. Температура длительного хранения.

Около 10 лет назад стали появляться работы по оценке влияния на стволовые клетки длительного хранения в замороженном виде. Так, исследование длительного криохранения стволовых клеток костного мозга и периферической крови показало что ГСК остаются пригодными для трансплантации после 14 лет криохранения [40]. В конце прошлого века оценка количества КОЕ-ГМ, БФЕ-Э и КОЕ-ГЭММ в пуповинной крови после 12 лет хранения, а также построенная линейная модель (логарифм результатов жизнеспособности клеток) показала, что ПК может храниться длительное время без существенной потери ГПК [41]. При помощи исследований пролиферативной способности и способности к самовоспроизводству КОЕ-ГМ, БФЕ-Э и КОЕ-ГЭММ, а также оценки *ex vivo* экспансии и инфузии NOD/SCID мышам CD34+ клеток, выделенных из размороженных образцов пуповинной крови было продемонстрировано отсутствие отрицательного эффекта длительного криохранения (в течение 15 лет [42]) и, по последним данным, в течение 23,5 лет [43] на количественные и качественные показатели ГСК/ГПК. Сейчас существуют уже и данные о клиническом применении пуповинной крови после длительного криохранения, в которых показано, что применение «старых», т.е. хранившихся 8 и более лет, образцов пуповинной крови не снижает итоговую выживаемость после ТПК по сравнению со «свежими» образцами [44], и, что длительность криохранения не коррелирует с худшими показателями итоговой выживаемости, бессобытийной выживаемости, трансплантат-ассоциированной смертности, рецидива или приживления [45].

В нашей работе мы суммируем опыт Покровского Банка стволовых клеток по размораживанию и отмывке клеток от ДМСО различными способами для того, чтобы

разработать оптимальные для наших условий протоколы обработки, криоконсервации и подготовки ГСК/ГПК пуповинной крови к трансплантации.

Материалы и методы

В исследование были включены 31 образец концентрата лейкоцитарной фракции пуповинной крови замороженный в период с октября 2009 года по ноябрь 2010. Перед замораживанием выделение лейкоцитарной фракции во всех образцах проводилось на аппарате Sepax S100 (Biosafe, Швейцария). Затем 11 размороженных образцов обрабатывали (отмывали от криопротектора- р-р ДМСО 10% (Pall, Великобритания)) аппаратным методом на Sepax S100, а 11 образцов обрабатывали ручным методом на центрифуге (Rubinstein et al., 1995³²), 9 образцов без отмывки от ДМСО составили группу сравнения.

Во всех образцах определялось количество ядерных клеток, абсолютное количество CD34⁺/CD45⁺ клеток и жизнеспособность в концентрате лейкоцитарной фракции до замораживания, после размораживания и отмывки клеток от криопротектора двумя способами: на аппарате Sepax S100 и ручным методом на центрифуге.

При отмывке ручным методом образцы ПК для экспериментов размораживался при 37 °С на водяной бане в течение 5 минут. Непосредственно после размораживания на водяной бане пуповинная кровь из криопакета шприцом переносилась в стерильный двойной пакет, заполненный раствором альбумина (2,5 %) на физиологическом растворе, затем пакет центрифугировался при 400g в течение 10 минут. Супернатант удалялся, а осажденные клетки ресуспендировались в растворе альбумина. Все процедуры проводились в воздушном потоке ламинарного бокса Herasafe KS 12 («Heraeus», Германия).

Во втором случае размораживание образцов проводилось аналогично на водяной бане при 37 °С, но для отмывки клеток от криопротектора использовался набор для аппаратной отмывки CS-600 (Biosafe, Швейцария). Отмывочным буфером в данном случае также являлся раствор альбумина (2,5 %) на физиологическом растворе.

После размораживания и отмывки от криопротектора концентрата лейкоцитарной взвеси проводился подсчет количества ядерных клеток при помощи гематологического анализатора «ACT diff 2» Beckman Coulter («Beckman Coulter», США), и количества и жизнеспособности CD34/45⁺ клеток на проточном цитометре Cytomix FC500 (Beckman Coulter). Определение количества клеток CD 34+/45+ осуществляли с помощью набора Stem-Kit (Beckman Coulter, США), состоящего из следующих реагентов:

- Моноклональные антитела CD45FITC/CD34PE.
- Моноклональные антитела CD45-FITC/Control.
- Флуоросферы для абсолютного подсчета клеток Stem-Count Fluorospheres.
- Краситель для определения жизнеспособности клеток 7-AAD Viability Dye.
- Лизирующий раствор NH₄Cl, 10-кратный.

Пробоподготовку проводили стандартным образом согласно рекомендации производителя. Измерение проводили на проточном цитометре Cytomix FC500 (Beckman Coulter) с использованием программы СХР.

Статистическая обработка данных осуществлялась по параметрическим методикам. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M - среднее значение, а m - стандартная ошибка среднего

Результаты

Выход лейкоцитов и CD34/45+ клеток при размораживании и отмывке от ДМСО двумя разными способами, а также уменьшение процента жизнеспособности CD34/45+ клеток показан в Таблице 1. Из полученных данных можно заключить, что способ обработки после размораживания не влияет на показатели жизнеспособности CD34/45+ клеток. Что же касается количественных показателей, то наибольший процент потери ядерных и CD34/45+ клеток (15% и 19%, соответственно) наблюдается при отмывке от ДМСО ручным методом, в то время как показатели клеточного концентрата, который не отмывался и образцов, обработанных аппаратным способом, существенно не различались.

Таблица 1 Изменение количественных и качественных показателей концентрата пуповинной крови при размораживании разными способами. ($p < 0,05$)

Способ разморозки	Жизнеспособность, %		Среднее выхода CD34/45+, %	Среднее выхода лейкоцитов, %
	До замораживания	После обработки		
Серах (n=11)	99,6 $\pm$ 1,13	94,9 $\pm$ 2,4	92 $\pm$ 9	93 $\pm$ 3
Ручной метод (n=11)	98,7 $\pm$ 1,16	93,7 $\pm$ 2,2	81 $\pm$ 7	85 $\pm$ 4
Без отмывки (n=9)	99,2 $\pm$ 1,19	94,4 $\pm$ 2,1	94 $\pm$ 6	94 $\pm$ 3

Обсуждение

Успешное приживление при трансплантации пуповинной крови в значительной степени зависит от сбора адекватного количества гемопоэтических прогениторных клеток с последующей успешной криоконсервацией этих клеток без серьезных потерь в жизнеспособности и количестве. Исходя из этого, критерии криоконсервации, разработанные для стволовых клеток периферической крови и костного мозга, неприменимы для пуповинной крови. В первую очередь, это связано с большой разницей в количестве клеток между трансплантатом костного мозга при котором потеря до 50% стволовых клеток не является критичной и пуповинной крови, где потеря даже 10% может оказаться фатальной.

Основываясь на полученных нами данных, можно сделать вывод, что, при наличии соответствующего технического оснащения, концентрат стволовых клеток пуповинной крови нужно отмывать, так как вероятность развития неблагоприятных побочных эффектов ДМСО снижается без серьезной потери количества ядерных клеток. Процент потери ядерных клеток при отмывке ручным способом довольно велик, что ставит под вопрос необходимость такой отмывки. В такой ситуации необходимо делать выбор между более высокой вероятностью успешного приживления трансплантата с возможным развитием побочных токсических эффектов ДМСО и менее высокой вероятностью приживления без побочных эффектов ДМСО- такое решение должно приниматься индивидуально.

Список использованной литературы

- 1 Broxmeyer H.E. Cord Blood Transplantation: A Mini Review Celebrating the 20th Anniversary of the First Cord Blood Transplant // The Hematologist.-2009.-№ 6(1).-P.7.
- 2 Broxmeyer H.E., Smith FO. Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation // Appelbaum F.R., Forman S.J., Negrin R.S., Blume K.G.. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation- 4th edn. - Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom, - 2009.- Section 4,- Ch. 3,- P. 559–576.
- 3 Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D., et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling // N Engl J Med.-1989.- № 321(17).- P.1174–1178.
- 4 Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc Natl Acad Sci USA.- 1989.- № 86(10).- P. 3828–3832.

- 5 Suzanne M.W., Austin E., Armitage S., Cryopreservation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells for Therapeutic Use // Day J.G., Stacey G.N.. Cryopreservation and freeze-drying protocols - 2nd edn.- Humana Press Inc. Totowa, New Jersey,- 2007.- Ch. 17,- P. 237-259
- 6 Hubel A. et al., Cryopreservation of cord blood after liquid storage // Cytotherapy.- 2003,- № 5(5).- P.370-376.
- 7 Hubel A. et al., Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood // Transfusion.- 2004.- № 44(4).- P. 518-525.
- 8 Shlebak A.A. et al., Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation // Bone Marrow Transplantation.- 1999.- № 23(2).- P.131–136
9. Lovelock, J.E., Bishop M.W.H.. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide // Nature.- 1959.- № 183(4672).- P.1394–1395.
10. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E.. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology.- 2003.- № 46(1).-P.76–87.
11. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E.. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology.- 2003.- № 46(1).-P. 61–75.
- 12 Chaloupka J.C., Vinuela F., Vinters H.V. et al. 1. Technical feasibility and histopathologic studies of ethylene vinyl copolymer (EVAL) using a swine endovascular embolization model // Am J Neuroradiol.- 1994.- № 15(6).- P.1107–1115.
Chaloupka J.C., Huddle D.C., Alderman J. et al. 2. A reexamination of the angiototoxicity of superselective injection of DMSO in the swine rete embolization model // Am J Neuroradiol.- 1999.- № 20(3).- P. 401–410.
- 13 Zambelli A., Poggi G., Da Prada G. et al.. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion // Anticancer Res.- 1998.- № 18(6B).- P. 4705–4708.
- 14 Davis J.M., Rowley S.D., Braine H.G. et al.. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion // Blood.- 1990.- № 75(3).- P. 781–786.
- 15 Zenhausem R., Tobler A., Leoncini L. et al.. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure // Ann Hematol.- 2000.- № 79(9).- P. 523–526.

- 16 Benekli M., Anderson B., Wentling D. et al.. Severe respiratory depression after dimethyl sulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis // Bone Marrow Transplant.- 2000.- № 25(12).- P.1299–1301.
- 17 Miniero R., Vai S., Giacchino M. et al.. Severe respiratory depression after autologous bone marrow infusion // Haematologica.- 1992.- № 77(1).- P. 98–99.
- 18 Corso S., Vukelja S.J., Wiener D. et al. Diffuse alveolar hemorrhage following autologous bone marrow infusion // Bone Marrow Transplant.- 1993.- № 12(3).- P. 301–303.
- 19 Higman M.A., Port J.D., Beauchamp Jr N.J. et al. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells // Bone Marrow Transplant.- 2000.- № 26(7).- P. 797–800.
- 20 Ferrucci P.F., Martinoni A., Cocorocchio E. et al. Evaluation of acute toxicities associated with autologous peripheral blood progenitor cell reinfusion in patients undergoing high-dose chemotherapy // Bone Marrow Transplant.- 2000.- № 25(2).- P.173–177.
- 21 Hequet O., Dumontet C., El Jaafari-Corbin A. et al. Epileptic seizures after autologous peripheral blood progenitor infusion in a patient treated with high-dose chemotherapy for myeloma // Bone Marrow Transplant.- 2002.- № 29(6).- P. 544.
- 22 Windrum P., Morris T.C.. Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant.- 2003.- № 31(4).- P. 315.
- 23 Hoyt R., Szer J., Grigg A.. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells // Bone Marrow Transplant.- 2000.- № 25(12).- P.1285–1287.
- 24 Gomez S., Nagler A., Naparstek E., Slavin S.. Transient elevation of serum lactic dehydrogenase following autologous bone marrow transplantation // Bone Marrow Transplant.- 1991.- № 7(6).- P. 487–488.
- 25 Burger J., Gilmore M.J., Jackson B. et al. Acute haemoglobinaemia associated with the reinfusion of bone marrow buffy coat for autologous bone marrow transplantation // Bone Marrow Transplant.- 1991.- № 7(4).- P. 322–324.
- 26 Galmes A., Besalduch J., Bargay J. et al. Long-term storage at -80 degrees C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant // Transfusion.- 1999.- № 39(1).- P. 70–73.
- 27 Bakken A.M., Bruserud O., Abrahamsen J.F.. No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5 or 10% dimethyl sulfoxide // J Hematother Stem Cell Res.- 2003.- № 12(3).- P. 351–358.

- 28 Halle P., Tournilhac O., Knopinska-Posluszny W. et al.. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations // *Transfusion.*- 2001.- № 41(5).- P. 579–580.
- 29 Syme R., Bewick M., Stewart D. et al. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity // *Biol Blood Marrow Transplant.*- 2004.- № 10(2).- P.135–141.
- 30 Martino M., Morabito F., Messina G. et al.. Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients // *Haematologica.*- 1996.- № 81(1).- P. 59–61.
- 31 Windrum P. et al.. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres // *Bone Marrow Transplantation.*- 2005.- № 36(7).- P. 601–603
- 32 Rubinstein P. et al.. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.*- 1995.- № 92(22).- P. 10119-10122.
- 33 Meyer T.P. et al.. Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood // *Cytotherapy.*- 2006.- 8(3).- P. 265-276.
- 34 Laroche V. et al.. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples // *Transfusion.*- 2005.- № 45(12).- P. 1909-1916.
- 35 Syme R. et al. The Role of Depletion of Dimethyl Sulfoxide before Autografting: On Hematologic Recovery, Side Effects, and Toxicity // *Biology of Blood and Marrow Transplantation.*- 2004.- № 10(2).- P.135-141.
- 36 Yang H., Zhao H., Acker J. P., Liu J.Z., Akabutu J., McGann L.E.. Effect of dimethyl sulfoxide on post-thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood // *Cryobiology.*- 2005.- № 51(2).- P. 165–175.
- 37 Nagamura-Inoue T. et al.. Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank // *Transfusion.*- 2003.- № 43(9).- P.1285–1295.
- 38 Hahn T. et al.. Use of nonvolume-reduced (unmanipulated after thawing) umbilical cord blood stem cells for allogeneic transplantation results in safe engraftment // *Bone Marrow Transplantation.*- 2003.- № 32(2).- P. 145–150.
- 39 [Rodríguez L.](#) et al.. Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system // [Vox Sang.](#)- 2004.- № 87(3).- P.165-72.

- 40 Spurr E.E. et al.. Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5–14 years) cryostorage // *Cryobiology*.- 2002.- № 44(3).- P. 210-217
- 41 Mugishima H. et al.. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood // *Bone Marrow Transplantation*.- 1999.- № 23(4).- P. 395–396.
- 42 [Broxmeyer](#) H.E.. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*.- 2003.- № 100(2).- P. 645-650.
- 43 Broxmeyer H.E.. Experimental basis of cord blood transplantation // *Bone Marrow Transplantation*.- 2009.- № 44(10).- P. 627–633.
- 44 Scaradavou A. et al.. "Age" of the Cord Blood (CB) Unit: Impact of Long-Term Cryopreservation and Storage on Transplant Outcome// *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*.- 2007.- № 110(11).- Abstract 2033.
- 45 Chow R. et al. The Effect of Storage Time on Clinical Outcomes of Plasma Depleted (PD) Cord Blood (CB) Transplantation // *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*.- 2008.- № 112(11).- Abstract 4128.