

УДК 576.3.08:57.086.1

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>

Жизнеспособность ядродержащих клеток в лейкоконcentратах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования

Исаева Н.В., Минаева Н.В., Утемов С.В., Шерстнев Ф.С., Зорина Н.А., Змеева Ю.С., Бутолина М.А.

Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови (КНИИГиПК)
Россия, 610027, г. Киров, ул. Красноармейская, 72

РЕЗЮМЕ

Цель – оценить жизнеспособность ядродержащих клеток (ЯСК) в лейкоконcentратах (ЛК) на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования.

Материалы и методы. Материал исследования – 44 ЛК доноров аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и 189 аутологичных ЛК онкогематологических больных. Лейкоконcentраты доноров и больных получали методом автоматического лейкоцитафереза после мобилизации ГСК. Лейкоконcentраты больных замораживали под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) с конечной концентрацией 5% и хранили в жидком азоте. Лейкоконcentраты декриоконсервировали перед трансплантацией, 161 ЛК после декриоконсервирования сразу переливали реципиенту, 28 ЛК перед переливанием отмывали от ДМСО. Процент не пропускающих 7-аминоактиномицин D (aminocytinomycin D, 7-AAD) популяций ЯСК определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Жизнеспособность ЯСК периферической крови доноров и больных приближалась к 100%. Показано отсутствие влияния аппаратного лейкоцитафереза и процедуры смешивания с ДМСО на жизнеспособность ЯСК. Замораживание ЛК под защитой ДМСО, хранение в жидком азоте и их декриоконсервирование приводили к значимому снижению содержания жизнеспособных ЯСК ($p = 0,0025$), при этом влияние длительности хранения ЛК на жизнеспособность ЯСК не выявлено. В результате отмывания от ДМСО в жизнеспособном состоянии сохраняется существенно больше ГСК, чем без отмывания (94,4 [94,5; 95,2]% против 86,7 [67,6; 92,9]%; $p = 0,0051$); для других популяций ЯСК, кроме моноцитов, различия показателя жизнеспособности также статистически значимы.

Заключение. Жизнеспособность ЯСК в ЛК рекомендуется использовать как самостоятельную характеристику качества трансплантата. В процессе получения ЛК и их смешивания с криоконсервантом ДМСО жизнеспособность ЯСК не снижается, а в декриоконсервированных ЛК значительно падает. Декриоконсервирование ЛК с отмыванием от ДМСО позволяет достигать лучшей жизнеспособности ГСК и большинства популяций ЯСК.

Ключевые слова: лейкоконcentрат, жизнеспособность, 7-аминоактиномицин D, ядродержащие клетки, гемопоэтические стволовые клетки, диметилсульфоксид.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом КНИИГиПК (протокол № 27 от 23.09.2021).

Для цитирования: Исаева Н.В., Минаева Н.В., Утемов С.В., Шерстнев Ф.С., Зорина Н.А., Змеева Ю.С., Бутолина М.А. Жизнеспособность ядродержащих клеток в лейкоконcentратах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(2):46–52. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>.

✉ Исаева Наталья Васильевна, isaevanatalia@yandex.ru

Viability of mononuclear cells in leukocyte concentrates at the stages of their preparation, freezing, and thawing

Isaeva N.V., Minaeva N.V., Utemov S.V., Sherstnev F.S., Zorina N.A., Zmeeva Yu.S., Butolina M.A.

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
72, Krasnoarmeyskaya Str., Kirov, 610027, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the viability of mononuclear cells (MNCs) in leukocyte concentrates (LCs) at the stages of their preparation, freezing, and thawing.

Materials and methods. The study material included 44 LCs from donors of allogeneic hematopoietic stem cells (HSCs) and 189 autologous LCs from patients with oncohematological disorders. LCs were obtained from donors and patients by leukocytapheresis after mobilization of HSCs. LCs from patients were frozen with dimethyl sulfoxide (DMSO) used as a cryoprotectant at a final concentration of 5% and stored in liquid nitrogen. LCs were thawed before transplantation. A total of 161 LCs were immediately transfused to the recipient after thawing, and 28 LCs were washed from DMSO before transfusion. Flow cytometry was used to determine the percentage of MNC populations that excluded 7-aminoactinomycin D (7-AAD).

Results. The viability of peripheral blood MNCs in donors and patients was close to 100%. It was found that leukocytapheresis and cryopreservation with DMSO did not affect the viability of MNCs. The freezing of LCs with DMSO, storage in liquid nitrogen, and thawing resulted in a significant decrease in the content of viable MNCs ($p = 0.0025$), while no effect of LC storage duration on the viability of MNCs was revealed. Following DMSO removal from LCs, significantly more HSCs remained in a viable state than without washing (94.4 [94.5; 95.2] % vs. 86.7 [67.6; 92.9] %, ($p = 0.0051$); for other MNC populations, except monocytes, the differences in the viability index were also statistically significant.

Conclusion. The viability of MNCs in LCs is recommended to be used as an independent characteristic of the transplant quality. In obtaining LCs and mixing them with the cryoprotectant DMSO, the viability of MNCs does not decrease, while in thawed LCs, it decreases significantly. Thawing of LCs with removal of DMSO allows to achieve the best viability of HSCs and most MNC populations.

Keywords: leukocyte concentrate, viability, 7-aminoactinomycin D, mononuclear cells, hematopoietic stem cells, dimethyl sulfoxide

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The protocol of the study was approved by the local Ethics Committee at Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion (Protocol No. 27 of 23.09.2021).

For citation: Isaeva N.V., Minaeva N.V., Utemov S.V., Sherstnev F.S., Zorina N.A., Zmeeva Yu.S., Butolina M.A. Viability of mononuclear cells in leukocyte concentrates at the stages of their preparation, freezing, and thawing. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(2):46–52. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является эффективным методом терапии гемобластозов и депрессий кроветворения [1, 2]. В современных условиях трансплантационный материал – лейкоконцентраты (ЛК) с достаточным содержанием гемопоэтических стволовых клеток ГСК, может быть получен методом аппаратного лейкоци-

тафереза. При необходимости длительного (более 72 ч) сохранения трансплантационного материала применяются технологии его замораживания под защитой криопротекторов [3]. В Кировском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови накоплен многолетний опыт проведения трансплантаций аутологичных и аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и заготов-

ки аллогенных ГСК для других трансплантационных центров [4].

Получение трансплантационного материала – это цепь технологических процедур, обеспечивающих стабильную функцию трансплантата и гарантирующих успех ТГСК. Способность восстанавливать гемопоэз у реципиента напрямую связана с переливаемой дозой ГСК. В соответствии с требованием Европейской исследовательской группы по трансплантации крови и костного мозга, обязательной является организация контроля качества клеточного продукта, требуется подсчет ГСК, кроме этого, необходима оценка клеточных элементов, которые потенциально способны нанести вред организму больного. В тех случаях, когда продукт подвергается любым манипуляциям, воздействующим на его состав, особую актуальность приобретает подтверждение жизнеспособности клеток продукта (<https://www.ebmt.org/8th-edition-fact-jacie-standards>, дата обращения: 13.10.2021).

В настоящее время оценку ГСК проводят в соответствии с рекомендациями Международного общества гемотерапии и трансплантационной инженерии (ISHAGE) [5]. ГСК-содержащий ЛК представляет собой достаточно гетерогенный по составу клеточный продукт [6]. Протокол ISHAGE, регламентирующий расчет ГСК, широко применяется для паспортизации клеточного продукта, однако такая оценка не несет информации о жизнеспособности клеток. Жизнеспособными принято считать ЯСК, поверхностная мембрана которых остается непроницаемой для нуклеотропных красителей. Тестирование жизнеспособности может основываться на суправитальном окрашивании клеточных образцов различными красителями. В настоящее время стало возможным применение ДНК-тропных красителей, обладающих флуоресценцией, таких как пропидиума йодида, 7-аминоактиномицина D, красителей семейства Syto [7].

Снижение числа жизнеспособных лейкоцитов в процессе хранения ЛК способно негативно отразиться на расчетном значении целевой трансплантационной дозы ГСК и на параметрах приживления трансплантата [8], при этом нарастание доли нежизнеспособных клеток в ЛК может привести к появлению в нем различных продуктов деградации клеток [9].

Цель исследования – оценить жизнеспособность ЯСК в ЛК на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы крови и ЛК доноров аллогенных ГСК, а также онкогематологических больных. Образцы крови были взяты для исследования непосредственно перед началом лейкоцитафереза. Лейкоконцентраты доноров и больных заготавливали с применением антикоагулянта для автоматического лейкоцитафереза. Лейкоконцентраты больных криоконсервировали, смешивая с раствором ДМСО в конечной концентрации 5% и декстраном. Лейкоконцентраты замораживали в парах жидкого азота на высоте 30–35 см над уровнем жидкой фазы (–145...–160 °С) с последующим переносом в среду жидкого азота.

Непосредственно перед трансплантацией 161 ЛК декриоконсервировали в водной среде при температуре 39–41 °С, затем приступали к переливанию ЛК пациенту. Другую часть ГСК-содержащих ЛК ($n = 28$) после размораживания отмывали от ДМСО, добавляя к клеточной суспензии смесь альбумина и полиглобулина (в соотношении 1 : 4); после центрифугирования при 2 000 g в течение 5 мин супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в смеси альбумина и полиглобулина. Этапы подготовки трансплантационного материала представлены на рис. 1.

Этапы изучения жизнеспособности ЯСК	Трансплантационный материал	
	аллогенный (n=44)	аутологичный (n=189)
1. Мобилизация ГСК	периферическая кровь	периферическая кровь
2. Получение ЛК методом лейкоцитафереза	нативный ЛК	нативный ЛК
3. Смешивание ЛК с ДМСО	Нет	ЛК, смешанный с ДМСО
4. Замораживание ЛК, хранение ЛК в парах жидкого азота, декриоконсервирование ЛК	Нет	ЛК без отмывания от ДМСО (n=161) ЛК с отмыванием от ДМСО (n=28)

Рис. 1. Оценка жизнеспособности ядродержащих клеток (этапы, материал)

Образцы крови и ЛК разводили раствором фосфатно-солевого буфера, содержащего 0,5% бычьего сывороточного альбумина, для достижения концентрации лейкоцитов $5 \times 10^9/\text{л}$. Образцы инкубировали в темноте в течение 15 мин при температуре 20–24 °С с конъюгатами моноклональных антител к CD45 и CD34 с флуорохромами флуоресцеинизотиоционатом и фикоэритрином соответственно и с раствором 7-AAD. Образцы тестировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США). Учитывали процент 7-AAD-негативных событий в каждой популяции ЯСК.

Для статистического анализа полученных результатов использовали программы STADIA (Россия) и Microsoft Excel. Данные представлены в виде медианы интерквартильного размаха $Me (Q_{25}; Q_{75})$. Для выполнения сравнительного анализа несвязанных совокупностей использовали критерий Ван дер Вардена, связанных – критерий Вилкоксона; при множественных сравнениях значения критериев определяли с применением поправки Бонферрони. Корреляционную связь устанавливали путем расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Значение $p < 0,05$ указывало на достоверность результатов сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество 7-AAD-негативных ЯСК в крови, взятой до начала лейкоцитафереза у доноров и больных, оказалось сопоставимым (99,8 (97,5; 99,9)% и 99,7 (98,1; 99,9)% соответственно; $p = 0,1109$). Содержание жизнеспособных ЯСК в нативных ЛК у доноров составило 99,6 (98,5; 99,8)%, у больных – 98,4 (97,5; 99,8)%; полученные значения не отличались от таковых в образцах крови, из которых были заготовлены ЛК ($p = 0,1241$ – для группы доноров; $p = 0,0893$ – для группы больных).

Различие процента 7-AAD-негативных ЯСК в нативных ЛК больных и в ЛК, смешанных с ДМСО, статистически не значимо (табл. 1).

Таблица 1

Содержание жизнеспособных ядродержащих клеток в лейкоконцентраатах, $Me (Q_{25}; Q_{75})$		
Этапы контроля жизнеспособности ЯСК в ЛК		Содержание 7-AAD-негативных клеток, %
Нативные ЛК, $n = 189$	I	98,4 (97,5; 99,8)
ЛК, смешанные с ДМСО, $n = 189$	II	96,1 (94,0; 98,8)
ЛК без отмывания от ДМСО, $n = 161$	III	80,6 (76,0; 89,4)
ЛК после отмывания от ДМСО, $n = 28$	IV	92,2 (85,2; 96,4)
p		I–II = 0,1124; II–III = 0,0025; II–IV = 0,0087; III–IV = 0,0054

Наблюдалось существенное снижение жизнеспособности ЯСК в ЛК после размораживания. Увеличение проницаемости мембран ЯСК для витального красителя 7-AAD зафиксировано в образцах ЛК, которые были декриоконсервированы как без дополнительной манипуляции – отмывания от ДМСО, так и с отмыванием. Относительное число 7-AAD-негативных ЯСК в ЛК, которые не были отмыты от ДМСО, оказалось статистически значимо более низким, чем в ЛК после отмывания от ДМСО.

Изучили зависимость процента жизнеспособных клеток от времени хранения ЛК больных в замороженном состоянии до декриоконсервирования и трансплантации, корреляционная связь между этими двумя параметрами не выявлена ($r = 0,11$). На рис. 2 представлено распределение декриоконсервированных ЛК больных по содержанию в них жизнеспособных ЯСК. Учитывали три диапазона жизнеспособности: 80% и менее, 90–80,1% и 95,5–90,1%. В ЛК, отмытых от ДМСО, критические уровни (от 80 до 62,2%) жизнеспособности ЯСК регистрировались в 7,1% (два из 28) случаев, в неотмытых ЛК – в 44,1% (71 из 161).



Рис. 2. Распределение декриоконсервированных лейкоконцентраатов по содержанию в них жизнеспособных ядродержащих клеток

Среди всех ЯСК содержание ГСК составило 0,6%; лимфоцитов – 44,6%, моноцитов – 31,5%, гранулоцитов – 21,9%, эритрокариоцитов – 1,4%. Наименее жизнеспособной после декриоконсервирования без отмывания от ДМСО оказалась популяция гранулоцитов (табл. 2). В лейкоконцентратах, декриоконсервированных с последующим отмыванием от ДМСО, выявляли более высокие значения жизнеспособности большинства клеточных популяций по сравнению с таковыми в ЛК, которые не отмывали. Исключение составляла только популяция моноцитов.

Таблица 2

Содержание жизнеспособных ядродержащих клеток в декриоконсервированных лейкоконцентратах, $Me (Q_{25}; Q_{75})$			
Тип ЯСК	Содержание 7-AAD-негативных клеток		<i>p</i>
	в ЛК без отмывания от ДМСО, %	в ЛК, отмываемых от ДМСО, %	
Лейкоциты	81,8 (75,1; 90,4)	89,3 (86,3; 93,7)	0,0338
– ГСК	86,7 (67,6; 92,9)	94,4 (94,5; 95,2)	0,0051
– лимфоциты	93,4 (87,9; 96,9)	95,5 (93,5; 97,7)	0,0455
– моноциты	94,9 (93,5; 96,0)	97,4 (98,1; 92,6)	0,0718
– гранулоциты	36,7 (22,8; 53,5)	58,8 (52,1; 65,6)	0,0006
Эритрокариоциты	69,0 (56,6; 82,9)	90,8 (84,9; 95,5)	0,0008

ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки жизнеспособности ЯСК в ЛК использовали суправитальное окрашивание клеток с анализом результатов автоматическим методом в лазерной проточной цитофлуориметрии. Краситель 7-AAD легко встраивается между цитозинными и гуаниновыми основаниями, определяется в красной области спектра (635–675 нм). При необходимости одновременного окрашивания клеток с флуорохром-конъюгированными моноклональными антителами к клеточным детерминантам, 7-AAD считается предпочтительным среди флуоресцирующих ДНК-красителей [10]. Процентное содержание 7-AAD-негативных ЯСК следует рекомендовать в качестве информативного параметра контроля ЛК на технологических этапах получения и хранения.

В результате проведенного исследования показано, что значение параметра жизнеспособности ЯСК крови и нативных ЛК приближается к 100%, варьирование показателя является крайне незначительным. Полученные сведения согласуются с результатами изучения жизнеспособности стволовых клеток, в котором было применено несколько ДНК-тропных красителей [7]. Число 7-AAD-негативных ЯСК в ГСК-содержащих ЛК и крови, из которой они были получены, совпадало. Следовательно, отсутствует негативное влияние аппаратного лейкоцитафереза

и смешивания с антикоагулянтом на проницаемость мембран ЯСК.

С 2003 г. при криоконсервировании трансплантационного материала применяется высокоочищенный ДМСО в концентрации 10%. Молекулярные основы действия ДМСО на клеточные мембраны продолжают активно исследоваться [11]. Известно, что разные концентрации ДМСО имеют принципиально различные механизмы воздействия на ГСК [12]. Приводимые в литературе сведения о жизнеспособности криоконсервированных ГСК, их репопулирующей способности и сроках восстановления гемопоэза [3, 13, 14] не позволяют сделать окончательные выводы об оптимальной концентрации ДМСО.

Изучили возможное воздействие концентрированного ДМСО на этапе его введения в ЛК. Число 7-AAD-негативных ЯСК в ЛК, смешанных с ДМСО в конечной концентрации 5%, и в нативных ЛК значимо не различалось. Был сделан вывод о приемлемости используемого метода введения концентрированного раствора ДМСО в клеточный продукт. Выявлено значимое снижение жизнеспособности ЯСК в размороженных ЛК как при отмывании, так и без удаления ДМСО, по сравнению с таковой в нативных ЛК, смешанных с криоконсервантом. Полученные результаты согласуются с данными литературы [15]. Взаимосвязь между временем хранения (от 7 до 120 сут) и числом 7-AAD-негативных ЯСК, вышедших из холодового анабиоза, не была подтверждена, для проницаемости плазматических мембран ЯСК, вероятно, наиболее критичны процедуры замораживания и декриоконсервирования.

Известно, что ДМСО может оказывать токсическое действие на организм человека при его использовании в качестве криопротектора [16]. Для уменьшения токсического влияния ДМСО на организм реципиента изучают такие подходы, как снижение гематокрита клеточного продукта [17], отмывание ГСК-содержащих клеточных продуктов [18], использование ингибиторов рекристаллизации льда [8]. Нежизнеспособные ЯСК могут иметь фрагментированную мембрану или представлять собой «голые ядра» [9]. Установлено, что в ЛК, отмываемых от ДМСО, присутствует больше жизнеспособных ЯСК, чем в неотмываемых. В результате отмывания в ЛК происходит частичная замена ресуспендирующего ДМСО-содержащего раствора на смесь альбумина и полиглюкина, сокращается время контакта ЯСК с внеклеточным ДМСО [18].

Лейкоконцентрат является продуктом, который лишь несколько обогащен стволовыми клетками по сравнению с периферической кровью [7]. Процентное содержание ГСК в ЛК составило в среднем 0,6%, наибольшая доля среди всех ЯСК была пред-

ставлена клеточными элементами, которые не обладают репопулирующими свойствами. Вместе с тем число CD45-позитивных клеток напрямую влияет на расчетную трансплантационную дозу ГСК [19]. При декриоконсервировании ЛК без отмывания наибольшему разрушению подвергаются гранулоциты, что согласуется с сообщениями зарубежных ученых [20]. Учитывая высокую чувствительность мембран гранулоцитарных компонентов, их существенную долю в ЛК, популяция гранулоцитов вносит наибольший вклад в понижение жизнеспособности всех ЯСК после размораживания. При отмывании от ДМСО наблюдали более высокую жизнеспособность большинства выделенных видов ЯСК, только для моноцитов не показано значимого улучшения сохранности мембран. Предположительно, отмывание блокирует увеличение проницаемости плазматических мембран ЯСК. Кроме этого, нельзя исключать, что в ходе отмывания ЛК происходит селективное удаление нежизнеспособных ЯСК.

Возможность нагрузки трансплантационного материала продуктами деградации клеток представляет собой еще один аспект негативного влияния разрушения клеточных мембран ЯСК на организм реципиента. Известно об опасности обогащения такими веществами компонентов крови при хранении [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Жизнеспособность ЯСК в ЛК рекомендуется использовать как самостоятельную характеристику качества трансплантата. В процессе получения ЛК и их смешивания с криоконсервантом ДМСО жизнеспособность ЯСК не снижается, а в декриоконсервированных ЛК значительно падает. Декриоконсервирование ЛК с отмыванием от ДМСО позволяет достигать лучшей жизнеспособности ГСК и большинства популяций ЯСК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Donnenberg V.S., Ulrich H., Tárnok A. Cytometry in Stem Cell Research and Therapy. *Cytometry A*. 2013; 83(1): 1–4. DOI: 10.1002/cyto.a.22243.
- Passweg J.R., Baldomero H., Bader P., Bonini C., Cesaro S., Dreger P., Duarte R.F., Dufour C., Kuball J., Farge-Bancel D., Gennery A., Kröger N., Lanza F., Nagler A., Sureda A. and Mohty M. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually. *Bone Marrow Transplantation*. 2016; 51: 786–792. DOI:10.1038/bmt.2016.2.
- Galmes A., Gutierrez A., Sampol A., Canaro M., Morey M., Iglesias J., Matamoros N., Duran M. A., Novo A., Bea M. D., Galan P., Balansat J., Martínez J., Bargay J., Besalduch J. Long-term hematological reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethyl sulfoxide at – 80 degrees C in a mechanical freezer. *Haematologica*. 2007; 92: 986 – 989. DOI: 10.3324/haematol.11060.
- Логинова М.А., Малышева Н.А., Минаева Н.В., Парамонов И.В. Оценка эффективности деятельности регистра потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток. *Гематология и трансфузиология*. 2020; 3 (65): 291–298. [Loginova M. A., Malysheva N. A., Minaeva N. V., Paramonov I. V. Evaluation of the efficiency of the activity of the register of potential donors of hematopoietic stem cells. *Gematologiya i transfuziologiya – Russian journal of hematology and transfusiology*. 2020; 3 (65): 291–298. (in Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-3-291-298.
- Barnett D., Granger V., Kraan J., Whitby L., Reilly J.T., Papa S., Gratama J.W. Reduction of intra- and interlaboratory variation in CD34- stem cell enumeration using stable test material, standard protocols and targeted training. *Br J Haematol*. 2000; 108 (3):784 – 792. DOI: 10.1046/j.1365-214.
- Saraceni F., Shem-Tov N., Olivieri A., Nagler A. Mobilized peripheral blood grafts include more than hematopoietic stem cells: the immunological perspective. *Bone Marrow Transplantation*. 2015; 50(7): 886–891. DOI: 10.1038/bmt.2014.330.
- López M.C., Lawrence D. A. Proficiency testing experience for viable CD34+ stem cell analysis. *Transfusion*. 2008; 48(6): 1115–1121. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01652.x.
- Briard J.G., Jahan S., Chandran P., Allan D., Pineault N., Ben R.N. Small-Molecule Ice Recrystallization Inhibitors Improve the Post-Thaw Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *ACS Omega*. 2016; 1(5): 1010–1018. DOI: 10.1021/acsomega.6b00178.
- Wagner T., Guber S.E., Stubenrauch M.-L., Lanzer G. Low propidium iodide intensity in flow cytometric white blood cell counting as a marker of cell destruction? *Transfusion*. 2005; 45 (2): 228–233. DOI: 10.1111/j.1537-2995.
- Трусов Г.А., Чапленко А.А., Семенова И.С., Мельникова Е.В., Олефир Ю.В. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(1): 16–24. [Trusov G.A., Chaplenko A.A., Semenova I.S., Melnikova E.V., Olefir Yu.V. Use of Flow Cytometry for Quality Evaluation of Biomedical Cell Products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment - BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(1): 16–24. (in Russ.). DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24.
- Fernández M. L., Reigada R. Effects of Dimethyl Sulfoxide on Lipid Membrane Electroporation. *The Journal of Physical Chemistry B* 2014, 118 (31), 9306–9312. DOI: 10.1021/jp503502s.
- Smagur A., Mitrus I, Giebel S, Sados-Wojciechowska M., Najda J., Kruzal T., Czerw T., Gliwinska J., Prokop M., Glowala-Kosinska M, Chwieduk A., Holowiecki J. Smugar, I. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox Sang*. 2013; 104 (3): 240–247. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2012.01657.x.
- Curcoy A.I., Alcorta I., Estella J., Rives S., Toll T., Tuset E. Cryopreservation of HPCs with high cell concentration in

- 5-percent DMSO for transplantation to children. *Transfusion*. 2002; 42: 962. DOI: 10.1046/j.1525-1438.2002.00198.x.
14. Abrahamsen J.F., Rusten L., Bakken A. M., Bruserud O. Better preservation of early hematopoietic progenitor cells when human peripheral blood progenitor cells are cryopreserved with 5 percent dimethylsulfoxide instead of 10 percent dimethylsulfoxide. *Transfusion*. 2004; 44: 785 – 789. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.03336.x.
15. Akkok CA, Liseth K, Hervig T, Rynningen A, Bruserud O., Ersvaer E. Use of different DMSO concentrations for cryopreservation of autologous peripheral blood stem cell grafts does not have any major impact on levels of leukocyte- and platelet-derived soluble mediators. *Cytotherapy*. 2009; 11: 749 – 760. DOI: 10.1080/14653240902980443.
16. Kollerup M.B, Hilscher M., Zetner D., Rosenberg J. Adverse reactions of dimethyl sulfoxide in humans: a systematic review. *F1000Research*. 2018; 7: 1-18. DOI: 10.12688/f1000research.16642.2.
17. Tonev I., Simeonov S., Mitkov I., Ilieva M., Petrov Y., Ganeva P., Arnaudov G., Spassov B., Mincheff M. Viability of hematopoietic stem cells following storage at – 80 °C with 5 % dimethylsulfoxide and hematologic recovery in transplanted myeloma patients. *HemaSphere*. 2019; 3: 343-344. DOI: 10.1097/01.hs9.0000561400.99877.49.4.
18. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49(4): 469–476. DOI: 10.1038/bmt.2013.152.
19. Gutensohn KI, Jessen M, Ketels A, Gramatzki M, Humpe A. Flow cytometric analyses of CD34+ cells with inclusion of internal positive controls. *Transfusion*. 2012; 2 (52): 284-290. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03259.x.
20. Bai L, Xia W, Wong K, Reid C, Ward C, Greenwood M. Infused neutrophil dose and haematopoietic recovery in patients undergoing autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49(5): 725. DOI: 10.1038/bmt.2014.14.

Вклад авторов

Исаева Н.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, написание статьи. Минаева Н.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Шерстнев Ф.С., Утемов С.В., Змеева Ю.С., Бутолина М.А. – сбор, обработка и анализ данных. Зорина Н.А. – отбор и ведение доноров и больных.

Информация об авторах

Исаева Наталья Васильевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной и молекулярной иммунологии, КНИИГиПК, г. Киров, isaevanatalia@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9766-5137>

Минаева Наталья Викторовна – канд. мед. наук, зам. директора по лечебной работе, КНИИГиПК, г. Киров, mnvgem@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-8479-3217>

Утемов Сергей Вячеславович – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточных технологий, КНИИГиПК, г. Киров, utemov@niigpk.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2045-2034>

Шерстнев Филипп Сергеевич – канд. мед. наук, зав. отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток, КНИИГиПК, г. Киров, sherstnyov_phil@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1751-8522>

Зорина Наталья Александровна – канд. мед. наук, зав. отделением химиотерапии и трансплантации костного мозга, КНИИГиПК, г. Киров, zorina@niigpk.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1948-209X>

Змеева Юлия Сергеевна – мл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной и молекулярной иммунологии, КНИИГиПК, г. Киров, zmeevajs@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2034-425X>

Бутолина Мария Александровна – лаборант-исследователь, лаборатория клеточных технологий, КНИИГиПК, г. Киров, butolina.maria@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5408-6028>

(✉) **Исаева Наталья Васильевна**, isaevanatalia@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.10.2021;
одобрена после рецензирования 16.05.2022;
принята к публикации 08.12.2022