

بررسی فراوانی سلول‌های بنیادی خونساز نمونه‌های پیوند خون محیطی نگهداری شده در دمای 4°C تا هشت روز پس از جمع آوری نمونه‌ها.

ماندانا محی‌الدین بناب (دانشجوی ایمونولوژی)*، دکتر کامران علی‌مقدم (فوق تخصص)*، دکتر پویا علیجانی‌پور (پزشک عمومی)*، مریم بستر (کاردان)، دکتر اردشیر قوام‌زاده (فوق تخصص)*
* مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: پیوند سلول‌های بنیادی خونساز امکان استفاده از دوزهای بالای داروهای شیمی درمانی را جهت درمان بیماریهای خونی بدخیم فراهم نموده است. بهترین روش برای نگهداری کوتاه مدت سلول‌های بنیادی خونساز جهت استفاده در پیوند اتولوگ خون محیطی نگهداری در دمای 4°C درجه سانتیگراد (یخچال) می‌باشد. ما در این مطالعه تعداد و درصد زنده بودن سلول‌های هسته‌دار و واحدهای تشکیل دهنده کلنی نمونه‌های خون محیطی مویلیزه نگهداری شده در دمای 4°C را بررسی کردیم.

مواد و روشها: نمونه‌های پیوند خون محیطی ۳۷ نفر شامل ۱۳ بیمار خونی کاندید پیوند اتولوگ و ۲۴ نفر دهنده سالم جهت پیوند آلورژن در پنج لوله استریل در دمای 4°C درجه سانتیگراد به مدت هشت روز نگهداری شدند. هر نمونه در روزهای صفر (روز اخذ نمونه)، دو، چهار، شش و هشت از لحاظ شمارش سلولی (با لام نئوبار)، درصد زنده بودن (با رنگ تریپان بلو) و تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ تحت بررسی قرار گرفت. مقادیر به دست آمده به درصد مقادیر روز صفر تبدیل و از برنامه SPSS 10.0 جهت تحلیل آماری استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین تعداد سلول‌های هسته دار در روزهای دو، چهار، شش و هشت بر حسب درصد مقادیر روز صفر به ترتیب $101/2$ ، $98/7$ ، $96/3$ و $88/9$ بود. میانگین درصد سلول‌های زنده در این روزها به ترتیب $93/8$ ، $84/7$ ، $78/1$ و $73/6$ بدست آمد. میانگین تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ به همین ترتیب $72/3$ ، $54/4$ ، $29/5$ و $10/6$ بود. هیچ ارتباط معنی‌داری بین سن، جنس، وزن و نوع دهنده اتولوگ یا آلورژن با شمارش سلولی، درصد زنده بودن و تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ یافته نشد.

نتیجه گیری و توصیه‌ها: در طول هشت روز نگهداری نمونه‌های پیوند خون محیطی تعداد سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده تا بالاتر از هفتاد درصد باقی می‌مانند، در حالی که تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ سریع‌تر افت می‌کند و بعد از روز چهارم به کمتر از پنجاه درصد می‌رسد. بنابراین، تعداد سلول‌های بنیادی خونساز خیلی سریع‌تر از تعداد کل سلول‌ها و درصد زنده بودن آنها افت می‌کند.

مقدمه

PBSC نگهداری شده در دمای 4°C را به مدت هشت روز مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

از تعداد ۳۷ دهنده که ویژگی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است، بعد از مویلیزه کردن با پنج دوز ۳۰۰ میکرو گرمی G-CSF (برخی از بیماران کاندید پیوند اتولوگ همراه با G-CSF، سیکلوفسفامید هم دریافت کرده بودند)، سلول‌های بنیادی خون محیطی توسط دستگاههای COBE یا Fresenius جمع‌آوری شد.

جدول ۱- ویژگیهای دهنده‌های سلول‌های بنیادی خون محیطی

ویژگی	تعداد	درصد	میانگین	دامنه
جنس				
زن	۱۳	۳۵/۱		
مرد	۲۴	۶۴/۹		
پیوند				
اتولوگ	۱۳	۳۵/۱		
آلوژن	۲۴	۶۴/۹		
دهنده				
سالم	۲۴			
AML	۴			
MM	۴			
Lymphoma	۵			
گروههای خونی				
A	۱۶	۴۳/۲		
B	۸	۲۱/۶		
O	۱۱	۲۹/۷		
AB	۲	۵/۴		
Rh ⁺	۳۰	۸۱/۱		
Rh ⁻	۷	۱۸/۹		
سن (سال)			۲۶/۴۳	۱۱-۶۳
وزن (کیلوگرم)			۶۲/۶۸	۳۲-۹۹

AML: Acute Myelocytic Leukemia, MM: Multiple Myeloma

ده میلی‌لیتر از هر نمونه PBSC جمع‌آوری شده را در پنج لوله استریل (هر یک دو میلی‌لیتر) تقسیم کرده، چهار تا از لوله‌ها را در یخچال در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری کردیم. از لوله پنجم به عنوان نمونه مبنای (در روز صفر) و از هر

درمان بیماری‌های بدخیم خونی و تومورهای سرطانی به مقدار زیادی وابسته به شدت دوز داروهای شیمی درمانی است. سمیت بالای این داروها و تخریب مغز استخوان توسط آنها استفاده از دوزهای بالای این داروها را با محدودیت مواجه ساخته است. پیوند سلول‌های بنیادی خونساز با استفاده از منابع متنوعی نظیر مغز استخوان، خون محیطی و خون بند ناف، امکان استفاده از دوزهای بالای این داروها را فراهم آورده است (۲،۱). بنابراین آگاهی از زنده بودن و حفظ قدرت خونسازی سلول‌های بنیادی خونساز در شرایط مختلف بسیار کمک کننده، لازم و ضروری می‌باشد. در سال‌های ۱۹۷۰ مطالعات زیادی روی نگهداری گرانولوسیت‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دمای اتاق (زمانی که از این سلول‌ها به طور وسیع در درمان بیماران عفونی مبتلا به نوتروپنی استفاده می‌شد) انجام گرفت (۴،۳). نتیجه این مطالعات منجر به شناسایی قدرت فاگوسیتی و وظایف ایمنی لوکوسیت‌ها گردید. شروع پیوند اتولوگ مغز استخوان در سال ۱۹۸۰ ضرورت مطالعه سیر تغییرات سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان نگهداری شده در دماهای ۱۹۶- تا ۲۵+ درجه سانتیگراد را ایجاب کرد. در بررسی‌های انجام شده متوجه شدند که انجماد و ذوب سلول‌های مغز استخوان سبب مردن حدود ۵۰٪ سلول‌های هسته‌دار و ۲۰٪ سلول‌های کلن‌ساز (CFU) حتی با استفاده از انجماد تدریجی و DMSO می‌شود (۵،۶).

مطالعات دیگر نشان داده که نگهداری مغز استخوان تا ۷ روز در دمای چهار یا ده درجه سانتیگراد سبب افت فقط ۲۰٪ سلول‌های هسته‌دار می‌شود ولی CFC آن تا ۸۰٪ کاهش می‌یابد (۷). در سالهای اخیر با جایگزین شدن روزافزون پیوند سلول‌های بنیادی خونساز خون محیطی یا (PBSC) Peripheral Blood Stem Cell به جای مغز استخوان، مطالعات مشابه نسبتاً محدودی روی این سلول‌ها نیز انجام گرفته است.

ما در این مطالعه سیر تغییرات در صد زنده بودن، تعداد سلول‌های هسته‌دار و میزان سلول‌های GM-CFU نمونه‌های

کردیم و نتایج تستهای روزهای دو تا هشت را با مقایسه نتیجه روز صفر به در صد تبدیل نمودیم و سپس جهت تجزیه و تحلیل آماری با برنامه SPSS 10.0 وارد کامپیوتر کردیم. برای مقایسه میانگین‌ها از Paired-Samples T test استفاده کرده، اختلاف کمتر از ۰/۰۵ را معنی دار تلقی کردیم. به منظور بررسی اثر جنس، سن، وزن و نوع دهنده اتولوگ یا آلوژن روی فاکتورهای ارزیابی شده PBSC، از نتایج خام و به درصد تبدیل شده استفاده کردیم. اختلاف میانگین‌ها را در گروه‌های مختلف با independent-Samples T test و Regrsson ارزیابی کردیم.

یافته‌ها

تغییرات درصد سلول‌های هسته‌دار، زنده بودن سلول‌ها قبل و بعد از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای برای سنجش CFU و شمارش کلنی‌های ۳۷ نمونه PBSC در روزهای مختلف، در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- درصد تغییرات نتایج بیماران در روزهای صفر تا هشت

CFU-GM	زنده بودن		سلول‌های هسته دار		روز
	زنده بودن سلول‌ها بعد از جداسازی	زنده بودن سلول‌ها قبل از جداسازی	سلول‌ها قبل از جداسازی	سلول‌ها بعد از جداسازی	
۱۰۰	۹۵/۱۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	روز صفر
۷۲/۳۰	۹۱/۳۱	۹۳/۷۶	۱۰۱/۱۹	۱۰۱/۱۹	روز ۲
۵۴/۳۶	۸۶/۵۰	۸۴/۷۳	۹۸/۶۹	۹۸/۶۹	روز ۴
۲۹/۵۹	۷۴/۵۶	۷۸/۱۱	۹۶/۳۴	۹۶/۳۴	روز ۶
۱۰/۵۹	۷۴/۰۴	۷۳/۶۱	۸۸/۹۰	۸۸/۹۰	روز ۸

GM-CFU: Granulocyte Macrophage- Colony Forming Unit

همانطوری که در جدول ۲ دیده می‌شود، درصد سلول‌های هسته دار، زنده بودن سلول‌ها و تعداد کلنی‌ها به تدریج از روز صفر تا روز هشت کاهش می‌یابد، ولی شدت این کاهش برای میزان سلول‌های هسته دار بسیار تدریجی و کم (حدود ۱۱٪) است، ولی برای زنده بودن سلول‌ها، افت نسبتاً بیشتر (حدود ۹۰٪) و میزان افت کلنی‌ها بسیار بیشتر و در حدود ۹۰٪

یک از لوله‌های نگهداری شده در یخچال در یکی از روزهای دو، چهار، شش و هشت جهت ارزیابی از لحاظ تعداد سلول‌های هسته دار، درصد زنده بودن سلول‌ها و تعداد GM-CFU به روشهای زیر استفاده کردیم:

- شمارش تعداد سلول‌های هسته‌دار یا Total (Nucleated Cell) TNC با روش دستی با استفاده از لام نئوبار انجام شد.

- برای تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها پنجاه میکرولیتر از نمونه سلولی را با پنجاه میکرولیتر محلول تریان‌بلو ده درصد مخلوط کرده بعد از ۱۰-۵ دقیقه یک قطره از مخلوط فوق را زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار دادیم. با شمارش صد سلول از مجموع سلول‌های زنده (بی‌رنگ) و سلول‌های مرده (آبی رنگ) درصد سلول‌های زنده هر نمونه را مشخص کردیم.

- به منظور سنجش کلنی‌زایی نمونه‌ها از لحاظ GM-CFU ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای نمونه‌ها با استفاده از فایکول جدا گردید. سپس 10^5 سلول تک هسته‌ای در یک محیط کشت نیمه جامد حاوی ۲۰٪ سرم FBS، ۰/۳٪ آگار، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین، ۱۰۰ U/ml استرپتومایسین، ۵۰ GM-CSF (SCF) به همراه IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) کشت داده شدند و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با رطوبت ۹۵٪ و ۵٪ CO2 نگهداری شدند. پس از شانزده روز، تعداد کلنی‌های تشکیل شده (کلنی‌های محتوی بیش از پنجاه سلول) در پلیت‌های کوچک زیر میکروسکوپ نوری inverted شمارش شدند.

- از لوله پنجم به عنوان نمونه مبنا در روز صفر و از هر یک از لوله‌های نگهداری شده در یخچال، در یکی از روزهای دو، چهار، شش و هشت جهت ارزیابی از لحاظ تعداد سلول‌های هسته‌دار، درصد زنده بودن سلول‌ها و GM-CFU به روش زیر استفاده کردیم:

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

برای بررسی نتایج به دست آمده، دو نوع آنالیز آماری انجام دادیم؛ ابتدا تغییرات نتایج را مورد هدف قرار دادیم. بدین منظور نتایج بدست آمده در روز صفر را صد در صد تلقی

می‌باشد. این نتایج در نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است.

ما روند این افت را برای بررسی‌های انجام شده در هر دو روز متوالی با Paired-Samples T test ارزیابی کردیم تا ببینیم آیا اختلافات معنی‌دار است یا خیر. در مقایسه کاهش زنده بودن سلول‌های هر دو روز متوالی از صفر تا شش، اختلاف‌ها معنی‌دار شد، ولی میانگین روزهای شش و هشت اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در مقایسه افت کلنی‌ها در هر دو روز متوالی، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در مقایسه بین زنده بودن سلول‌ها قبل و بعد از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای جهت سنجش CFU فقط در روزهای صفر و دو اختلاف معنی‌دار شد و برای بقیه روزها اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در مقایسه تغییرات شمارش سلول‌های هسته‌دار بین روزهای متوالی، هیچ کدام اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند.

ما اثر جنس، سن، وزن و نوع دهنده پیوند اتولوگ یا آلوژن را روی تعداد سلول‌های هسته‌دار و تعداد سلول‌های بنیادی کلنی‌زا (CFU) روز صفر بررسی کردیم. متوسط سلول‌های هسته‌دار جمع‌آوری شده از دهنده‌های آلوژن (سال) $10^3 / \mu l \times 118/28$ و از دهنده‌های اتولوگ (بیماری در فاز خاموشی) $10^3 / \mu l \times 68/5$ بود که اختلاف آنها با $p=0/023$ معنی‌دار می‌باشد. متوسط تعداد کلنی‌های CFU-GM به ازای هر 10^5 سلول تک هسته‌ای از دهنده‌های آلوژن $123/57$ کلنی و از دهنده‌های اتولوگ $148/38$ کلنی بود که اختلاف آن معنی‌دار نبود. میانگین سلول‌های هسته‌دار جمع‌آوری شده و تعداد کلنی‌های رشد کرده بین دو جنس مرد و زن اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. با استفاده از تست Regression ارتباطی بین سن و وزن و تعداد سلول‌های هسته‌دار و سلول‌های بنیادی (CFU-GM) یافته نشد.

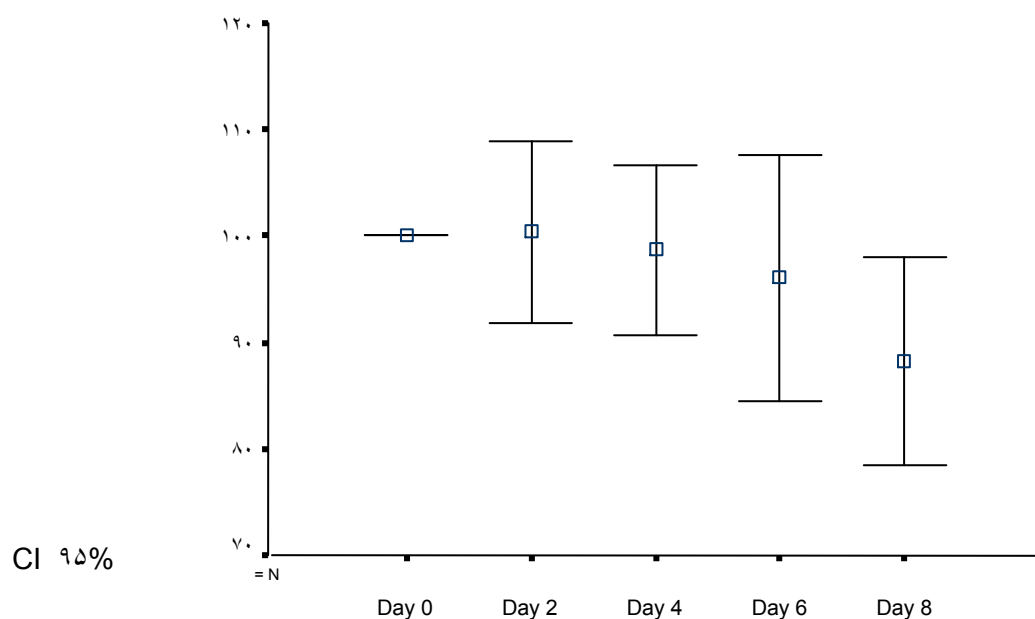
بحث

جدول ۳- مقایسه میانگین نتایج بدست آمده در هر دو روز متوالی

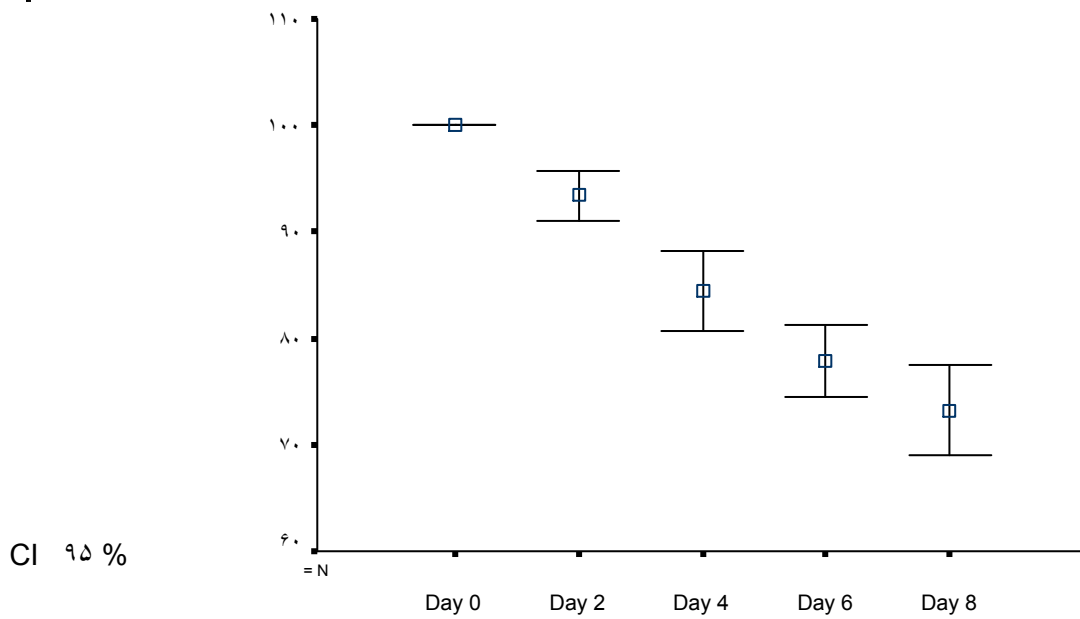
نتایج بدست آمده از مطالعه ما نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های هسته‌دار درصد زنده بودن آنها تا روز هشت بیش از ۷۰٪ حفظ می‌شود ولی سلول‌های بنیادی کلنی‌زا (GM-CFU) که یکی از رده‌های اصلی خونسازی هستند، بعد از چهار روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ ، به ۵۴/۳٪ مقدار روز صفر می‌رسد، که در مقایسه با نتایج مطالعات قبلی تقریباً در حد وسط قرار می‌گیرد؛ Pettengell و همکاران میزان GM-CFU نمونه‌های خون محیطی نگهداری شده در دمای $4^{\circ}C$ را در پایان روز سوم ۷۲٪ گزارش کرده‌اند (۸) و در مطالعه Burnett و همکاران که بر روی مغز استخوان انجام شده بود GM-CFU پس از سه روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ به ۶۱٪ رسیده بود^(۹). Delforge و همکاران با افت شدیدتر میزان GM-CFU در نمونه‌های خون محیطی نگهداری شده در دمای $4^{\circ}C$ مواجه شدند. در مطالعه آنها میزان GM-CFU پس از چهار روز به ۳٪ کاهش پیدا کرده بود، در حالی که کاهش GM-CFU در نمونه‌های مغز استخوان خیلی کندتر بوده و طی همین مدت به ۹۵٪ روز صفر رسیده بود (۱۰). در بررسی Hechler و همکاران هشت روز پس از نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ در صد زنده بودن سلول‌های نمونه‌های خون محیطی به ۶۹/۵٪ رسید که این یافته با نتیجه ۷۳/۶۱٪ مطالعه ما قابل مقایسه است. در مطالعه آنها تعداد کلنی‌های GM-CFU در روز شش ۴۷٪ بود که از ۲۹/۵۹٪ مطالعه ما بالاتر است (۱۱). جالب اینجاست که در مطالعه Jestice و همکاران کلنی‌های GM-CFU در نمونه‌های خون محیطی نگهداری شده در دمای $4^{\circ}C$ تا ۴۸ ساعت سیر صعودی داشته و سپس کاهش پیدا کرده است، به طوری که پس از پنج روز به ۳۲٪ روز صفر رسیده است. به این ترتیب آنها نتیجه گرفتند که سلول‌های پیش‌ساز متعهد (Committed Progenitors) در دمای $4^{\circ}C$ هم به تقسیم ادامه می‌دهند (۱۲). این یافته Jestice و همکاران را ما در مطالعه خود در تعداد سلول‌های هسته‌دار مشاهده می‌کنیم که بعد از ۴۸ ساعت مختصری افزایش نسبت به روز صفر داشته‌اند.

P value	گروههای مقایسه شده	
۰/۰۰۰	صفر با دو	در صد زنده بودن قبل از جداسازی روز
۰/۰۰۰	دو با چهار	
۰/۰۰۱	چهار با شش	
۰/۰۸۷	شش با هشت	
۰/۰۳۸	صفر با دو	در صد زنده بودن بعد از جداسازی روز
۰/۰۱۸	دو با چهار	
۰/۰۰۰	چهار با شش	
۰/۶۷۸	شش با هشت	
۰/۰۰۰	صفر با دو	در صد تعداد کلنی‌های CFU-GM روز
۰/۰۰۰	دو با چهار	
۰/۰۰۲	چهار با شش	
۰/۰۴۳	شش با هشت	
۰/۷۶۳	صفر با دو	در صد تعداد سلول‌های هسته دار روز
۰/۵۵۳	دو با چهار	
۰/۵۳۹	چهار با شش	
۰/۰۸۸	شش با هشت	
۰/۰۰۰	صفر	در صد زنده بودن سلول‌ها قبل و بعد از جداسازی روز
۰/۰۳۲	دو	
۰/۲۶۶	چهار	
۰/۱۷۱	شش	
۰/۳۳۳	هشت	

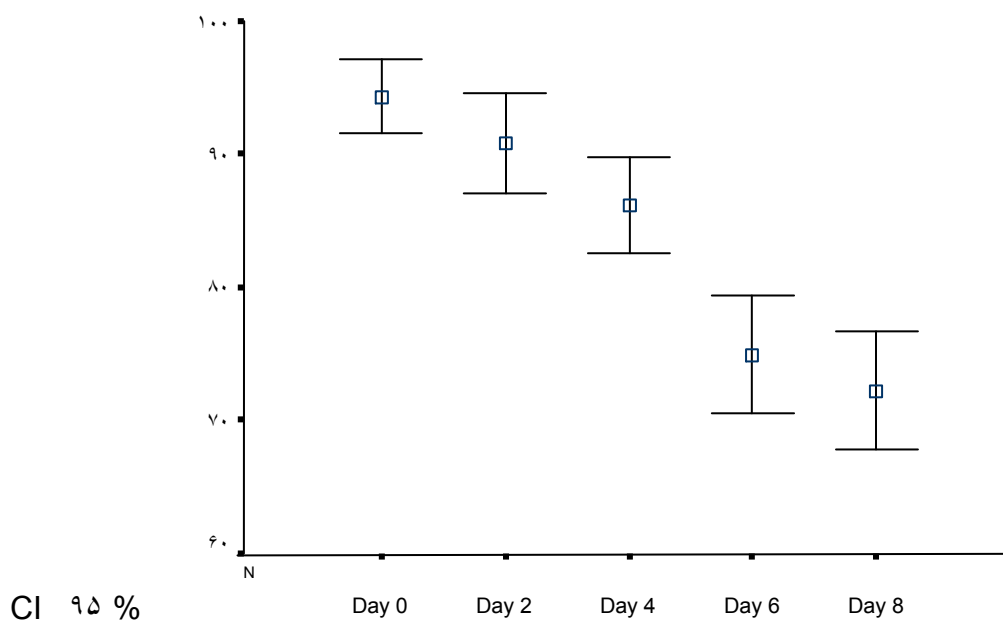
GM-CFU: Granulocyte Macrophage- Colony Forming Unit



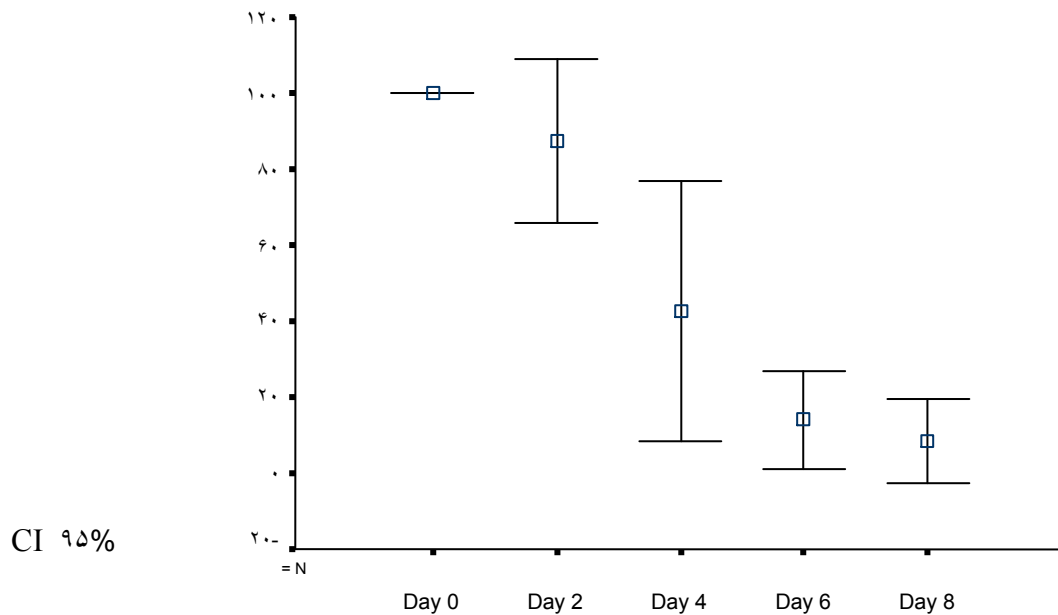
نمودار ۱- سیر تغییرات تعداد سلول‌های هسته‌دار نمونه‌های خون محیطی موبیلیزه نگهداری شده در دمای 4°C تا هشت روز بر حسب درصد روز صفر



نمودار ۲- سیر تغییرات درصد زنده ماندن سلولها قبل از جداسازی سلولهای تک هسته‌ای نمونه‌های خون محیطی موبیلیزه نگهداری شده در دمای 4°C تا هشت روز



نمودار ۳- سیر تغییرات درصد زنده ماندن سلولها بعد از جداسازی سلولهای تک هسته‌ای نمونه‌های خون محیطی موبیلیزه نگهداری شده در دمای 4°C تا هشت روز



نمودار ۴- سیر تغییرات تعداد CFU-GM نمونه‌های خون محیطی موبیلیزه نگهداری شده در دمای 4°C تا هشت روز بر حسب درصد روز صفر

از طرفی سیر تغییرات GM-CFU با چگونگی تغییر pH محیط، افت گلوکز و افزایش لاکتات در ارتباط است (۱۲). اگر بتوانیم با حذف یا اضافه کردن مواد فارماکولوژیک نظیر ماده ضد انعقاد ACD (که موجب افزایش گلوکز می‌شود) و یا خود گلوکز (۱۲) تغییرات محیط را کاهش دهیم، می‌توانیم محیط مناسبتری برای حفظ سلول‌های بنیادی کلنی‌زا به وجود آوریم. بررسی ما نشان داد که تعداد سلول‌های هسته‌دار، درصد زنده بودن و میزان GM-CFU تا روز هشت به تدریج افت می‌کنند و سرعت افت GM-CFU بیشتر است به طوری که در روز هشت فقط ۱۰/۶٪ این سلول‌ها باقی مانده‌اند. البته در این مطالعه هیچ گونه دستکاری (از قبیل اضافه یا حذف مواد سلول‌ها) در طول نگهداری در دمای 4°C بر روی نمونه‌ها صورت نگرفته است.

فرآیند انجماد علاوه بر پرهزینه بودن موجب افت ۱۰-۳۰٪ در تعداد GM-CFU (به خاطر تحمیل استرس به سلول‌ها طی انجماد و ذوب شدن مجدد) می‌شود (۱۷، ۱۶، ۸). علاوه بر

مورد جالب دیگری که از Pretti و همکارانش گزارش شده، پیوند موفق یک نمونه مغز استخوان است که پس از ۹ روز نگهداری در دمای 4°C انجام گرفته است (۱۳). اگر چه این نتایج متفاوت را می‌توان تا حدودی به اختلاف مواد و روش‌های مورد استفاده مربوط دانست، تناقض برخی از نتایج را نمی‌توان نادیده گرفت. شاید عوامل دیگری که هنوز مورد توجه قرار نگرفته‌اند در تعیین سیر تغییرات GM-CFU و دیگر رده‌های سلول‌های بنیادی دخالت دارند.

از آنجا که کاهش تعداد سلول‌های هسته دار در طول نگهداری در دمای 4°C عمدتاً به خاطر از بین رفتن سلول‌های میلوپیدی بالغ است (۱۴، ۱۵)، اگر این سلول‌ها را پیش از نگهداری در دمای 4°C از نمونه‌های خون محیطی جدا کنیم، شاید بتوانیم با جلوگیری از رها شدن محتویات سلول‌های در حال مرگ به داخل سوسپانسیون سلولی تغییری در افت سریع سلول‌های کلنی‌زا ایجاد کنیم.

ما در نظر داریم مطالعه خود را با دستکاری (purging) نمونه‌های سلولی چه به صورت حذف برخی سلول‌ها برای جلوگیری از عوارض جانبی آنها و چه با اضافه کردن بعضی فاکتورها برای تحریک تکثیر سلول‌های بنیادی ادامه دهیم. علاوه بر این قصد داریم که سیر تغییرات فاکتورهای بیوشیمی محیط سلولی pH، گلوکز و لاکتات و همچنین رده‌های بنیادی تر سلول‌های بنیادی را به روش‌های ارزیابی مورد استفاده، اضافه کنیم.

تشکر و قدردانی

با تشکر از خانمها ملیحه مرادخانی و نازنین گرایلی به خاطر همکاری صمیمانه در جمع آوری نمونه‌های PBSC.

این DMSO (Di Methyl Sulfoxide)، ماده نگهدارنده مورد استفاده در انجماد، یک ماده سمی است و می‌تواند موجب بروز عوارض در بیمار شود. به همین دلیل باید با شستشوی نمونه‌ها تا حد امکان DMSO را از سوسپانسیون سلولی خارج کنیم که خود این فرایند به زمان، نیروی انسانی و هزینه مضاعفی نیازمند است، ولی مهمترین مزیت انجماد که امکان نگهداری بلند مدت (تا چندین سال) می‌باشد را نباید از یاد برد. با توجه به اینکه یک مورد پیوند موفق مغز استخوان پس از نه روز نگهداری در دمای 4°C گزارش شده، می‌توان تصور کرد که امکان نگهداری کوتاه مدت سلول‌ها در 4°C به مدت بیش از زمان استاندارد فعلی (چهار روز) که نسبت به انجماد از هزینه کمتر و سهولت بیشتری برخوردار است، وجود دارد.

منابع

1. Shea Tc, Mason Jr, Storniolo Am et al. Sequential Cycles Of High-Dose Carboplatin Administered With Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor And Repeated Infusions Of Autologous Peripheral Blood Progenitor Cells: A Novel And Effective Method For Delivering Multiple Courses Of Dose-Intensive Therapy. *J Clin Oncol* 1992, 10; 464-473.
2. Tepler I, Cannistra Sa, Freie 3rd et al. Use Of Peripheral Blood Cells Abrogates The Myelotoxicity Of Repetitive Outpatient High-Dose Carboplatin And Cyclophosphamide Chemotherapy. *J Clin Oncol* 1993, 11: 1583-1591.
3. Glasser L, Fiederlein Rl, Huestis Dw. Liquid Preservation Of Human Neutrophils Stored In Synthetic Media At 22°C: Controlled Observations On Storage Variables. *Blood* 1985, 66: 267-272.
4. Lane Ta. Granulocyte Storage. *Transfus Med Rev* 1990, 4: 23-24.
5. Linch Dc, Knott Lj, Patterson Kg, Cowan Da, Harper Pg. Bone Marrow Processing And Cryopreservation. *J Clin Pathol* 1982, 35: 186-190.
6. Stiff Pj, Koester Ar, Weidner Mk, Dvorak K, Fisher Ri. Autologous Bone Marrow Transplantation Using Unfractionated Cells Cryopreserved In Dimethylsulfoxide And Hydroxyethyl Starch Without Controlled- Rate Freezing. *Blood* 1987, 70: 974-978.
7. Mangalik A, Robinson Wa, Drebing C, Hartmann D, Joshi Jh. Liquid storage of bone marrow. *Exp Hematol* 1979, 7 (suppl.5): 76-94.
8. Pettengel r, et al Viability of haematopoietic progenitors from whole blood, bone marrow and leukapheresis product: Effects of storage media, temperature and time. *Bone marrow transplant* 1994 Nov; 14(5): 703-9.
9. Burnett Ak, Tansey P, Hills C, et al. Hematological Reconstitution Following High Dose And Supra lethal Chemo-Radiotherapy Using Stored, Non-Cryopreserved Autologous Bone Marrow. *British Journal Of Hematology* 1983; 54:309-16.
10. Delforge A, Ronge-Collrd E, Stryckmans P, Spiro T, Malarme Ma. Granulocyte-Macrophage Progenitor Cell Preservation At 4 Degrees Centigrade. *British Journal of Hematology* 1983; 53:49-54.
11. Hechler G, Weide R, Heymanns J, Koppler H, Havemann K. Storage Of Non-Cryopreserved Peripheral Blood Stem Cells For Transplantation. *Annals Of Hematology* 1996 May; 72(5): 303-6.
12. Jestice Hk, Scott Ma, Tolliday Bh And Marcus Re. Liquid Storage Of Peripheral Blood Progenitor Cells For Transplantation; Bone Marrow Transplantation, 1994,14: 991-4.
13. Preti Ra, Razis E, Ciavarella D et al. Clinical And Laboratory Comparison Study of Refrigerated And Cryopreserved Bone Marrow For Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1994, 13: 253-260.
14. Mangalik A, Robinson Wa, Drebing C. et al. Liquid Storage Of Bone Marrow. *Experimental Hematology*, 1979, 7: 76-94.
15. Lasky Lc, Mc Callough J, Zanjani Ed. Liquid Storage Of Unseparated Human Bone Marrow, Evaluataion Of Hematopoietic Progenitors By Clonal Assay. *Transfusion* 1976, 26: 331-4.
16. Douay L, Gorin Nc, David R et al. Study Of Granulocyte-Macrophage (CFUc) Preservation After Slow Freezing Of Bone Marrow In The Gas Phase Of Liquid Nitrogen. *Experimental Hematology* 1982, 10: 360-66.
17. Gray Jl, Robinson Wa. In Vitro Colony Formation By Human Bone Marrow Cells After Freezing. *Laboratory Clinical Medicine* 1973.81: 317-22.