제대혈 단핵세포의 냉동 전·후의 염색체 핵형분석의 실험적 연구

[1]한영한마음아동병원, [2]경북대학교 의과대학 소아과학교실, [3]충북대학교 의과대학 소아과학교실

구기영[1]·추미애[2]·김지윤[3]·이건수[2]

Karyotype analysis of cryopreserved mononuclear cells from cord blood

Ki Young Ku[1], Mi Ae Chu[2], Ji Yoon Kim[3] and Kun Soo Lee[2]

[1]Hanyoung Hanmaum Pediatric Clinic, Daegu, Korea
[2]Department of Pediatric, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea
[3]Department of Pediatric, Chungbuk National University School of Medicine, Cheongju, Korea

Purpose : The ability to perform chromosome analysis of cryopreserved cord blood mononuclear cells is important for future retrospective studies. We compared the karyotypes of cryopreserved cells with cells before cryopreservation.
Methods : One cord blood (CB) sample was obtained from normal healthy volunteer. Karyotype analysis was performed before cryopreservation. After mononuclear cell separation with Ficoll-Hypaque, the mononuclear cells were cryopreserved by programmed controlled-rate freezer and then transferred into the liquid nitrogen (-196℃) for 3 days. After rapid thawing, cytogenetic analysis was performed as the same method for each sample by different conditions. The samples were divided by three groups. The first group was no culture before cryopreservation, the second group was 72 hours culture before cryopreservation, but no 24 hours culture after thawing and the third group was 72 hours culture before cryopreservation and 24 hours culture after thawing.
Results : The chromosome analysis was successful in the second and third groups of CB sample.
Conclusion : The successful result from CB samples may suggest the usefulness of long-term cryopreservation for retrospective study in various clinical settings including hematologic malignancies.

Key Words : Karyotype analysis, Cryopreservation, Cord blood mononuclear cell

서 론

인체 세포유전학은 1956년에 Tijo와 Levan[1)]이 정상 인체 염색체 수가 46개라고 밝힌 이후, 염색체의 구조 및 유전을 연구하는 세포유전학은 의학의 많은 영역에서 중요한 역할을 하고 있다. 이는 선천성 기형을 포함하여 성장 및 발달과 관련된 염색체 이상이 의심되는 경우의 임상 진단(clinical diagnosis), 무월경 여성과 불임 또는 반복되는 유산을 경험하는 부부의 생식 문제(reproductive problems), 고령 산모나 고 위험 산모에서의 산전 진단(prenatal diagnosis), 여러 가지 다형성(polymorphism), 그리고 종양(neoplasia) 연구 분야에 적용되고 있다[2)]. 따라서 세포유전학의 발달은 기술적 진보와 함께 많은 새로운 정보를 줄 수 있게 되었다[3, 4)].

염색체 검사는 유사분열(mitosis)을 하는 세포를 검사하는 것으로, 분열 능력을 유지할 수 있는 살아있는 세포(viable cell)를 보존하는 것이 필요하다. 세포의 기능을 잘 유지하면서 장기간 보관할 수 있는 가장 효과적인 방법은 냉동보존(cryopreservation)으로 알려져 있다. 따라서 세포를 보존하기 위한 방법의 개발이 요구되고 있다[5)].

책임저자 : 이건수, 대구광역시 중구 동덕로 200번지
경북대학교 의과대학 소아과학교실
Tel : 053)420-5713, Fax : 053)425-6683
E-mail : kslee@knu.ac.kr

냉동과 같이 극심한 온도변화는 세포의 화학적 · 생물학적 특성에 변화를 주게 되어 세포의 사멸을 유도한다[5]. Polge 등[6]에 의해 정자를 glycerol에 냉동 보존한 것을 발표한 이래 골수 세포, 제대혈 조혈 모세포 등의 냉동 보존이 이루어졌고[7-9], 생존율을 높이기 위한 냉동방법이나 조건이 발전하고 있으며, 본 연구팀에서도 제대혈을 이용하여 냉동방법과 조건에 대한 연구들을 보고한 바가 있다[10-13].

이에 본 연구에서는 제대혈검체에서 분리된 단핵세포의 냉동전과 해동후의 염색체 핵형 분석(karyotype analysis)을 통해 염색체의 변화유무를 비교하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대 상

경북대학교병원 소아과 염색체 검사실에서 실험에 대한 동의서를 획득한 후 정산 산모 태아에서의 제대혈을 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) 제대혈 채혈과 냉동 전 제대혈 단핵세포의 염색체 검사

분만 후 제대를 결찰하고 산모 측 제대를 알코올로 소독한 후 모체의 혈액이 유입되지 않도록 주의하면서 헤파린 용액이 처리된 20 mL 주사기로 제대혈을 20 mL까지 채혈하였다. 검체 도착 즉시 배양용기에 제대혈 검체 4 mL를 RPMI 1640 배양액 7.5 mL정도로 2회 세척한 후 남은 것을 백혈구 수에 따라 0.5-1.5 mL씩 준비된 배양액(RPMI 1640 7.5 mL, FBS 1.5 mL, 10^{-5} moL methotrexate 0.1 mL) 시험관 2개에 분할하여 37℃ 배양기에서 다음날까지 17-24시간 배양하였다. 배양 후 배양기에서 꺼내어 RPMI 1640으로 2회 세척 한 다음 남은 침전물에 RPMI 7.5 mL와 thymidine 용액 0.1 mL와 FBS 1.5 mL를 혼합한다. 5-6시간 배양 후 냉장 보관되어 있던 colcemid 용액 0.5 mL 첨가하고 다시 15분간 배양하였다. 배양한 시험관을 꺼내어 세포 수확을 위해 원심분리(1,400 rpm, 10분)하고 상층액은 제거한다. 37℃ 실온의 저장액(0.075 moL KCL)을 10 mL가 되도록 15분간 37℃ 배양기에서 추가로 배양하고, 다시 원심분리 후 상층액을 제거한다. 이후 혼합하여 냉장 보관하고 있던 고정액(methanol : acetic acid=3 : 1) 0.5 mL를 배양용기에 천천히 첨가하여 남은 상층액과 조심스럽게 섞어준 다음 총량이 5 mL가 되게 고정액을 가하여 30분간 냉장 보관한다. 고정액으로 3회 반복 세척을 하고, 마지막으로 원심분리 후 남은 고정액으로 세포 부유액을 만들었다. 흐르는 물에서 수 차례 세척하고 고정액으로 처리하여 차갑게 준비된 슬라이드에 Pasteur pipette으로 고정된 세포 부유액 2-3 방울을 30 cm 정도의 높이에서 낙하시켜 염색체 슬라이드를 만든 후 60℃ dry-oven에서 1시간 동안 완전히 건조시키는 공기건조법으로 표본을 작성하여, 2.5% trypsin 용액과 Wright 염색용액으로 염색하여 중기상 염색체를 관찰하였다. 핵형 분석은 최소 20개 이상의 중기세포를 관찰하였고, Paris conference와 Paris conference supplement, International System for Human Gytogenetic Nonenclature [ISCN, (2005)] 방법으로 염색체 분석을 수행하였다.

2) 냉동 전 제대혈 단핵세포의 배양

분리된 단핵세포 부유액 1 mL를 미리 37℃에서 배양용기에 준비된 배양액(RPMI 1640 7.5 mL, FBS 1.5 mL, 10^{-5} moL methotrexate 0.1 mL)에 무균 조작하여 잘 혼합한 후 37℃ 배양기에서 72시간 동안 배양하였다.

3) 제대혈 단핵세포의 냉동보관

분리된 단핵세포 부유액 또는 냉동 전 배양한 후 단핵세포 부유액을 세척한다. 부유액 0.5 mL를 RPMI 1640 배양액 0.8 mL, FBS 0.3 mL, DMSO 0.2 mL와 함께 냉동 튜브(Nunc Cryotube, 덴마크)에 섞어 넣었다.

냉동 방법은 검체를 프로그램 냉동기(Cryomed 1010, 미국)로 검체 온도가 20℃가 되기를 기다린 후 -6℃까지 1℃/분씩, -50℃까지 25℃/분씩 냉동하고, 다시 -14℃까지 15℃/분씩 온도를 상승시킨 후, -45℃까지 1℃/분씩, -90℃까지 10℃/분씩 냉동시킨다. 그 후 -196℃ 액체 질소에 보존한다.

4) 제대혈 단핵세포의 해동

검체를 72시간 냉동 후 실온 또는 37℃ 수조 또는 보육기에서 해동하였다.

5) 해동 후 제대혈 단핵세포의 염색체 검사

해동 후 RPMI 1640 배양액으로 세척 후 colcemid를 0.5 mL 가한 다음 다시 배양기에 넣어 90분간 배양을 지속하였다. 이후 세포 수확 및 염색체 검사방법은 1)과 동일하게 진행

하였다.

6) 해동 후 제대혈 단핵세포의 재배양

해동 후 RPMI 1640 배양액으로 세척 후 세포 부유액 1 mL를 미리 37℃에서 배양용기에 준비된 배양액(RPMI 1640 7.5 mL, FBS 1.5 mL, 10^{-5} moL methotrexate 0.1 mL)에 무균 조작하여 잘 혼합한 후 37℃ 배양기에서 24시간 동안 재배양하였다.

7) 제대혈의 실험 과정

다음과 같이 3군(CB-1, CB-2, CB-3)으로 나누어 실험하였다.

(CB-1)
① 제대혈 채혈과 냉동 전 염색체 검사
② 제대혈 단핵세포의 냉동보관
③ 제대혈 단핵세포의 해동
④ 해동 후 제대혈 단핵세포의 재배양
⑤ 해동 후 제대혈 단핵세포의 염색체 검사
(CB-2)
① 제대혈 채혈과 냉동 전 염색체 검사
② 제대혈 단핵세포 분리 후 냉동 전 배양
③ 제대혈 단핵세포의 냉동보관
④ 제대혈 단핵세포의 해동
⑤ 해동 후 제대혈 단핵세포의 염색체 검사
(CB-3)
① 제대혈 채혈과 냉동 전 염색체 검사
② 제대혈 단핵세포 냉동 전 배양
③ 제대혈 단핵세포의 냉동보관
④ 제대혈 단핵세포의 해동
⑤ 해동 후 제대혈 단핵세포의 재배양
⑥ 해동 후 제대혈 단핵세포의 염색체 검사

결 과

제대혈 1례가 검사되었다. 제대혈은 3군으로 나누어 실험되었다. 냉동 전 배양과정 없던 CB-1군은 염색체 핵형 검사가 판독 불가능하였으며, 냉동 전 3일간 배양 후 냉동보관을 하였던 CB-2와 CB-3군은 냉동 전과 해동 후의 염색체 핵형이 판독 가능하였고, 서로 일치하였다(Fig. 1).

냉동 전 CB-1 와 CB-2, CB-3 각 군에서 관찰한 염색체수는 20개였으며 해동 후 CB-1군에서는 분열중기세포에서 관찰할 수 있는 염색체가 없었다. CB-2 와 CB-3군의 핵형분석 시 관찰한 세포 수는 각각 20개였다.

고 찰

과학이 발전하고 사회 경제적 인식이 개선되고 산전 진단 기술이 진보했음에도 여전히 염색체 이상 환자들은 중요한 의학적, 사회적 문제이다. 또한, 검사 기술의 발전과 함께 악성 혈액종양질환 분야에서는 조기 진단, 조기 치료, 발병위험이 높은 사람을 조기에 선별하기 위해 많은 노력이 있으며, 관련 유전자 변이나 암유전자 등 분자유전학적인 발생 기전에 대한 관심이 증대되고 있다[14]. 특히 혈액종양질환은 염색체 이상이 많이 연구된 분야로, 질환의 발생, 진단, 분류, 치료제의 반응, 예후, 잔존암, 재발, 골수 이식 시 생착 경과 관찰을 위해 세포 유전학적 검사는 중요한 역할을 담당한다[15, 16], 따라서 발전된 유전학적 검사법을 적용하기 위해 세포를 장기간 보존할 수 있는 최적의 방법 개발이 선행되어야 한다[5].

현재까지 세포의 기능을 잘 유지하면서 장기간 보관할 수 있는 효과적인 방법으로 냉동보존이 알려져 있다. 이렇게 세포의 특성이 손상되지 않고 유지될 수 있는 생존율 높은 보존법은 retrospective study를 위한 준비가 되며, 다른 검사실로 전달할 수 있는 좋은 방법이고, 추가 검사나 진단을 위한 검체 확보와 시간 확보를 할 수 있는 점에서 매우 중요하다[5, 17].

인체 세포의 냉동보존에 관한 연구는 1949년 Polge 등[6]에 의해 정자를 glycerol에 냉동 보존한 보고가 시초이고, 골수세포의 냉동 보존에 관한 기술은 1955년 Barnes와 loutit[7]에 처음 기술되었다. 1958년에는 냉동보존을 이용하여 자가 골수이식이 시술되었으며[8], 이후 인체 세포의 냉동 보존은 혈액면역학[18-20], 고형종양학 분야[21], 기관 또는 조직 이식분야[22], 생식내분비학[23], 분자생물학[24] 등 여러 분야에서 이용되고 있다.

세포의 냉동보존과 같이 극한의 온도변화는 세포의 화학적 및 생물학적 특성에 변화를 주게 되어 세포의 사멸을 일으켜 생존율이 감소하게 된다[5]. 세포의 냉동보존에서 생존을 유지하는데 가장 중요한 부분의 하나는 냉동과 해동 과정으로, 세포의 급속 냉동은 세포내 얼음 결정(ice crystal)을 형성하는 'thermal shock'을 일으켜 세포가 죽게 되며, 등장(isotonic) 식염수 내에서의 완만 냉동은 세포외 용액에서 얼음 결정을 형성해 외부 용액의 몰랄 삼투압 농도(osmolality)의 급격한

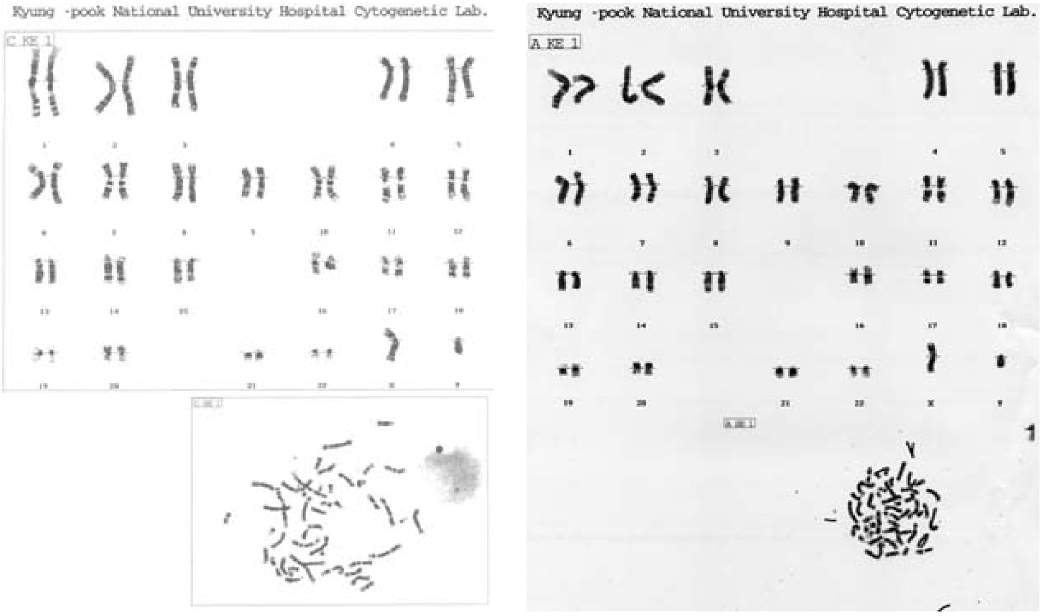

Fig. 1. Karyotype (46,XY) of cord blood cell before cryopreservation (left) and after thawing (right) in CB-3 method line.

변화를 초래해 세포가 죽게 된다.

냉동보존제는 물분자와 결합하여 외부 몰랄 삼투압의 급격한 변화에 따른 얼음 결정 형성을 느리게 하여 세포의 손상을 줄인다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)와 같은 냉동 보존제는 세포 내로 들어갈 수 있으므로 이론적으로는 세포내 얼음 결정 형성을 감소시킨다. 그러나, 이에 따른 세포에 유해한 결과를 가져올 수도 있다.

액체 상태에서 고체 상태로 변환되는 시간은 조혈 모세포의 생존에 중요한 시기이며 이 기간이 길면 생존력이 떨어진다. 프로그램 냉동법은 이 시간을 최소한으로 줄여 생존율을 향상시키게 고안되었다. 이상적인 감온율(cooling rate)은 1분에 1-3도씩 온도를 낮추는 것이다. 일단 냉동과정이 완료되면 기간에 따른 더 이상의 세포 손상은 없는 것으로 기대된다. 인체 골수세포의 냉동방법에서 온도가 낮게 보존하는 것이 생존력이 더 우수한 것으로 보고되고 있고, 일반적으로 온도가 낮을수록 세포의 대사나 효소의 작용이 정지되는 것으로 알려져 있다[25]. 프로그램 냉동법을 이용해 냉동시킨 다음 -140도 이하에서 보존하면 11년까지 조혈세포의 생존력이 유지되는 것으로 보고되고 있다[22].

냉동세포를 해동하는 과정에서도 냉동과정에서의 'thermal shock'과 같이 얼음결정이 녹아 세포내와 세포외의 몰랄 삼투압의 급작스런 변화를 초래하여 세포에 손상을 주는 'dilution shock'의 위험이 있다. 급속해동은 완만해동에 비해 세포의 손상이 적은 것으로 보고되고 있다[26].

따라서 냉동과 같이 극심한 온도변화는 세포의 화학적 생물학적 특성에 변화를 주게 되어 세포의 사멸을 발생시킬 수 있으므로[5], 생존율을 높이기 위한 냉동방법이나 조건이 발전하고 있으며, 본 연구팀에서도 제대혈을 이용하여 냉동방법과 조건에 대한 연구들을 보고한 바가 있다[10-13].

냉동보존의 성공 평가는 회복된 세포의 성장과 재생능력을 포함하는 기능 유지와 생존율 평가와 함께 유전적 안정성 평가가 요구될 수 있다. 일반적으로 냉동보존 자체는 유전적 안정성을 크게 저하시키지 않는다고 알려져 있으나 자세한 보고는 많지 않다. 본 연구진은 냉동보존과 관련된 유전성 안정성을 염색체 핵형 검사 결과를 확인하고, 장기간 보존에 적합성을 알아보고자 하였다.

냉동보관 후의 세포의 배양법에 대한 연구는 중요하고 많이 이루어져있으나[27, 28], 냉동된 세포의 세포유전학적 검사에 대한 보고는 적은 편이며 주로 말초혈액과 골수의 조혈모세포를 중심으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 제대혈(1례의 2군) 세포에서 냉동보존 후 염색체 핵형분석을 성공적으로 할 수 있었으며, 냉동전과 해동후의 염색체의 핵형은 서로 일치하였다(Fig. 1).

양수나 제대혈 세포의 냉동보존과 해동 후 염색체 검사에 대한 연구는 아니지만, Keinanen 등[29]이 5명의 건강인과 7명의 골수구성백혈병 환자의 골수 검체를 성장인자를 첨가 했

을 때 해동후의 세포의 유사분열 정도가 증가한다는 짧은 보고가 나온 이래, McConnell 등[19], Bosga-Bouwer 등[30], 그리고 Chauffaille 등[17]의 혈액종양 환자의 골수 또는 말초혈액의 미성숙세포의 냉동보존 후 염색체 검사에 대한 보고가 있다. 이들의 보고가 공통적으로 제시하는 바는 냉동보관 및 해동후의 염색체 검사를 위한 검체는 세포의 생존율이 낮아지며, 염색체 검사과정 중 유사분열이 일어나는 세포의 수가 적고, mitotic index 가 낮으며, 염색의 정도가 나빠진다고 한다. 이 중, 염색체 검사의 성공율은 높지 않으나 염색체 핵형의 검사 결과는 일치한다고 점은 본 연구의 제대혈의 냉동 전후의 염색체 결과가 일치하는 점과 같은 소견이다. 본 제대혈 검체에 대한 연구는 염색체 결과의 비교만 이루어졌고, 생존율, 회복률을 측정하지 않았고, 검체 수가 적어 염색체 검사의 성공률 등을 통계적으로 평가하지 못했다. 앞으로 좀더 많은 수의 검체로 세포의 생존율, 염색체의 유사분열 유도 정도, 염색체 분석을 위한 중기분열의 상태에 대한 연구가 필요하겠다.

세포의 수를 늘리는 법으로 성장인자를 첨가하거나, 추가 배양을 시도할 수 있다. 배양기간은 McConnell 등[19]의 보고에서 해동 후 세포를 48-36시간 동안 배양한 경우가 가장 염색체를 관찰하기 좋았으며, Choi와 Lee[31]의 연구에서는 제대혈과 말초혈액을 2일과 7일간 배양을 한 후 측정한 세포 수의 증가율이 2일간 배양한 제대혈에서 119%(46-311%), 말초혈액에서는 154%(74-310%)였다. 7일간 배양한 제대혈에서는 48%(11-176%), 말초혈액에서는 51%(11-216%)로 2일간 배양했을 때 더 높은 세포수의 증가률을 보였다.

결론적으로 검체의 분포 불균형과 검체 수가 적다는 제한점이 있으나, 제대혈에서 냉동 전과 해동 후의 염색체 핵형이 일치하는 결과에서 유전적 안정성과 장기간 보관의 가능성을 조심스럽게 예측할 수 있을 것으로 사료된다.

한글요약

목 적 : 염색체 검사는 의학의 많은 영역과 혈액종양학 분야에서 중요한 역할을 하고 있다. 세포의 기능을 잘 유지하면서 장기간 보관할 수 있는 가장 효과적인 방법은 냉동보존(cryopreservation)으로 알려져 있으며, 이는 미래에 신기술을 적용할 수 있고 회귀연구를 가능하게 한다. 이에 본 연구에서는 제대혈에서 분리된 단핵세포의 냉동전과 해동후의 염색체 검사 결과를 비교하고자 한다.

방 법 : 실험에 대한 동의서를 획득한 제대혈 1례가 검사되었다. Ficoll-Hypaue로 단핵세포를 분리하였고, DMSO 등 냉동보존을 위한 전처리 후 프로그램 냉동기(Cryomed 1010, 미국)로 냉동하여 질소탱크(-196℃)에 3일간 보관하였고, 급속 냉동 후 염색체 검사를 시행하였다. 냉동전과 해동후의 염색체 핵형을 분석하였다.

결 과 : 1례의 제대혈은 3군으로 나누어, 냉동 전 배양과정 없던 CB-1군은 염색체 핵형 검사가 판독 불가능하였으며, 냉동 전 3일간 배양 후 냉동보관을 하였던 CB-2와 CB-3군은 냉동전과 해동후의 염색체 핵형이 판독 가능하였고, 서로 일치하였다.

결 론 : 검체의 분포 불균형과 검체 수가 적다는 제한점이 있으나, 제대혈에서 냉동전과 해동후의 염색체 핵형이 일치하는 결과에서 제대혈 단핵세포의 유전적 안정성과 장기간 보관의 가능성을 예측할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1) Tijo JH, Levan A. The chromosome number of man. Hereditas 1956;42:1-6.
2) Thompson JS, Thompson MW. Thompson and Thompson Genetics in Medicine. 6th ed. Philadelphia. W.B. Saunders co., 2004.
3) Therman E. Human chromosomes: structure, behavior, and effects. New York. Springer-Verlag, 1980.
4) Dewald GW, Ketterling RP. Conventional Cytogenetics and Molecular Cytogenetics in Hematologic malignancies. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, editors. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th ed. Edinburgh. Churchill Livingstone, 2005: 928-40.
5) Avis KE, Wagner CM. Introduction. In: Avis KE, Wagner CM, editors. Cryopreservation: applications in pharmaceuticals and biotechnology. Denver. Interpharm Press, 1999:1-10.
6) Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature 1949;164:666.
7) Barnes DW, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. J Natl Cancer Inst 1955;15:901-5.
8) Kurnick NB, Montano A, Gerdes JC, Feder BH. Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. Ann Intern Med 1958;49:973-86.
9) Quillen K, Berkman EM. Methods of isolation and cryopreservation of stem cells from cord blood. J Hematother

1996;5:153-5.
10) Lee KS, Sohn CL. Cryopreservation of mononuclear cells from human cord blood. The Korean Journal of Hematopoietic Stem Cell Transplantation 1996;1:63-73.
11) Lee KS, Sohn CL. Long-term Cryopreservation of Cord Blood Mononuclear Cells for Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Korean J Pediatr Hematol Oncol 1997;4:167-80.
12) Lee KS, Kim KH, Kim MJ, Choi EJ. A Comparative Study on Mononuclear Cell Separation and Cryopreservation of Human Cord Blood. Korean J Pediatr Hematol Oncol 1998;5:148-62.
13) Lee KS, Kim MJ, Choi EJ, Choi SM. A comparative study on recovery rates of nucleated cell separation methods in human cord blood. The Korean Journal of Hematopoietic Stem Cell Transplantation 1998;3:263-77.
14) Worth LL. Molecular and Cellular Biology of Cancer. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. Philadelphia. Saunders, 2004:1681-4.
15) Kim DH, Lee NY, Baek JH, Kim JG, Sohn SK, Suh JS, et al. Prognostic scoring model based on multi-drug resistance status and cytogenetics in adult patients with acute myeloid leukemia. Leukemia & lymphoma 2006;47:461-7.
16) Kim DH, Sohn SK, Kim JG, Lee NY, Sung WJ, Baek JH, et al. Parameters for predicting allogeneic PBSCT outcome of acute myeloid leukemia: cytogenetics at presentation versus disease status at transplantation. Ann Hematol 2005;84:25-32.
17) Chauffaille ML, Pinheiro RF, Stefano JT, Kerbauy J. Karyotype of cryopreserved bone marrow cells. Braz J Med Biol Res 2003;36:845-50.
18) Meryman HT. Cryopreservation of blood and marrow cells: basic biological and biophysical considerations. In: Petz LD, Swisher SN, editors. Clinical practice of blood transfusion. New York. Churchill Livingstone 1981:313-31.
19) McConnell TS, Cordova LM, Baczek NA, Foucar K, Dewald GW. Chromosome analysis of cryopreserved cells. Cancer Genet Cytogenet 1990;45:179-91.
20) Li YS, Wang HS, Luke B, Cheng G, Aye MT. Cytogenetic studies using frozen blood samples. Cancer Genet Cytogenet 1992;59:99-100.
21) Herrmann ME, Gipson C, Ansari MR, Lewis FR, Jr., Talpos GB. Cytogenetic analysis of thyroid tumors after cryopreservation. Cancer Genet Cytogenet 1995;85:20-5.
22) Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. Clin Haematol 1986;15:19-48.
23) Keel BA, Webster BW, Roberts DK. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. J Reprod Fertil 1987;81:213-20.
24) Graham DE. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. Anal Biochem 1978;85:609-13.
25) O'Grady LF, Lewis JP. The long-term preservation of bone marrow. Transfusion 1972;12:312-6.
26) Leibo SP, Farrant J, Mazur P, Hanna MG, Jr., Smith LH. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. Cryobiology 1970;6:315-32.
27) Capelli E, Stefanini M, Giulotto E, Nuzzo F. Validation of a DNA-repair synthesis assay on pools of fresh and frozen-thawed lymphocytes. Mutat Res 1982;104:187-91.
28) Karpovitch XL, Rosenkovitch E, Ben-Basset H, Izak G. Structure and functional alterations in lymphocytes induced by cryopreservation. Cryobiology 1980;17:12-7.
29) Keinanen M, Bloomfield CD, Machnicki J, Griffin JD, de la Chapelle A. Human bone marrow cytogenetics: growth factors stimulate metaphases for specific lineages. Leukemia 1989;3:405-12.
30) Bosga-Bouwer AG, Hendriks D, Vellenga E, Zorgdrager H, van den Berg E. Cytogenetic analysis of cryopreserved bone marrow cells. Cancer Genet Cytogenet 2001;124:165-8.
31) Choi EJ, Lee KS. Mixed Mononuclear Cell Culture of Cord Blood and Adult Peripheral Blood. Korean J Pediatr Hematol Oncol 2002;9:211-9.