

동결 보호제(DMSO) 농도에 따른 돼지 중간엽 줄기세포의 Caspase 3과 7 발현

옥선아^{1,2}, 노규진^{2,*}

¹국립축산과학원 바이오공학과, ²국립경상대학교 수의과대학 수의산과학연구소

Activation of Caspase-3 and -7 on Porcine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (pBM-MSCs) Cryopreserved with Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Sun-A Ock^{1,2} and Gyu-Jin Rho^{2,*}

¹Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Suwon 441-706, Republic of Korea

²OBS/Theriogenology and Biotechnology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

ABSTRACT

Adult stem cell transplantation has been increased every year, because of the lack of organ donors for regenerative medicine. Therefore, development of reliable and safety cryopreservation and bio-banking method for stem cell therapy is urgently needed. The present study investigated safety of dimethyl sulfoxide (DMSO) such as common cryoprotectant on porcine bone marrow derived mesenchymal stem cells (pBM-MSCs) by evaluating the activation of Caspase-3 and -7, apoptosis related important signal pathway. pBM-MSCs used for the present study were isolated density gradient method by Ficoll-Paque Plus and cultured in A-DMEM supplemented 10% FBS at 38.5°C in 5% CO₂ incubator. pBM-MSCs were cryopreserved in A-DMEM supplemented either with 5%, 10% or 20% DMSO by cooling rate at -1°C/min in a Kryo 360 (planner 300, Middlesex, UK) and kept into LN₂. Survival rate of cells after thawing did not differ between 5% and 10% DMSO but was lowest in 20% DMSO by 0.4% trypan blue exclusion. Activation of Caspase-3 and -7 by Vybrant FAM Caspase-3 and -7 Assay Assay Kit (Molecular probes, Inc.OR, USA) was analyzed with a flow cytometer. Both of cryopreserved and control groups (fresh pBM-MSCs) were observed after the activation of Caspase-3 and -7. The activation did not differ between 5% and 10% DMSO, but was observed highest in 20% DMSO. Therefore 5% DMSO can be possibly used for cell cryopreservation instead of 10% DMSO.

(Key words : porcine, mesenchymal stem cells, apoptosis, cryopreservation, DMSO, caspase-3 and -7)

서 론

최근 줄기세포 연구는 가까운 미래에 치료될 수 없는 치명적인 질환 치료를 위한 목적으로 사용되고 있다. 줄기세포의 경우, 노화되거나 질병에 걸린 세포를 대체할 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있기 때문이다(Bhandari 등, 2011; Aldahmash 등, 2012). 줄기세포는 성체 줄기세포와 배아 줄기세포로 크게 나뉘어지고 있으며, 비교적 최근에는 다양한 체세포 유래 유도 만능 줄기세포들이 Oct4, Sox2, c-Myc, Nanog, Klf4 등의 유전자들이 바이러스 등을 이용하여 만들어지고 있다(Yamanaka, 2007). 그러나 배아 줄기세포는 배아를 파괴하여야 하는 윤리적 문제점을 피해 갈 수 없고(Roberston, 2010), 유도

만능 줄기세포(iPS)의 경우 다양한 유전자 삽입시 사용되는 바이러스의 안전성(genome-integrating viruses가 유발하는 mutagenesis와 unpredictable genetic dysfunction) (Okita 등, 2007) 보 장 결여로 non-integrating lentiviral vectors(Sarkis 등, 2008), poly-arginine 등을 이용한 protein transduction(Kim 등, 2009), microRNA(Kamata 등, 2010)를 사용한 방법 등이 시도되고 있지만 그 효율성이 저조한 실정이다(Kim 등, 2009). 따라서 현실적 대안으로 성체 줄기세포를 이용한 세포 치료 연구가 중요시 되고 있다(Tsukiyama 등, 2011).

일반적으로 성체 줄기세포는 hematopoietic-, mesenchymal-, neural-, skin-, umbilical cord- 유래로 나뉘어진다. 이중 mesenchymal stem cells(MSCs)은 비교적 분리가 수월하며, 다양한 조

* 이 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21(과제번호: PJ0090382012-2) 연구비 지원에 의해 실시되었다.

* Correspondence : E-mail : jinrho@gnu.ac.kr

직(골수, 지방, 진피 등)에서 추출할 수 있는 장점을 가지고 있다(Magatti 등, 2008) 그러나 MSCs의 경우 성체에서 추출함으로써 체외에서 장기간 배양 시 세포의 특성이 변하거나 줄기 세포 능력이 감소할 수 있는 위험성이 있는 것으로 알려져 있다(Rosland 등, 2009). 따라서 이를 효율적으로 보존할 수 있는 동결 보존방법을 개발하는 것이 요구된다.

세포 동결 시 가장 일반적으로 사용되는 동결 보호제인 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 사람에서 이 동결 보호제가 첨가된 세포를 이식하였을 때 저혈압, 심장부정맥, 오심 등 각종 부작용을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다(Davis 등, 1990; Zambelli 등, 1998). 따라서 본 연구에서는 이러한 DMSO 동결 보호제의 독성을 규명하고, 이를 개선하기 위하여 apoptosis에 관여하는 주요 경로인 미토콘드리아 내에서 시토크롬 c(cytochrome c)의 방출과 동시에 세포질(cytoplasm)에 존재하는 apoptotic protease activation factor(Apaf1)와 Caspase(cysteine-aspartic acid specific proteases) 9의 결합에 의한 apoptosome의 형성에 의한 Caspase-3과 -7의 절단 활성화(Thornberry 등, 1997)에 의한 핵단백질 절단 경로를 분석함으로써 세포 사멸에 미치는 농도별 DMSO의 효과를 돼지 골수 유래 중간엽 줄기세포(porcine bone marrow derived mesenchymal stem cells(MSCs), pBM-MSCs)를 사용하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 배양액

이 실험에 사용된 모든 시약은 특별한 언급이 없는 경우, Sigma Chemical Company(St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 배양액은 Gibco(Life Technologies, Rockville, MS, USA)에서 구입하였다. 모든 배양액은 pH 7.2, 삼투압 280 mOsm/kg으로 조정하여 사용하였다.

2. 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)의 추출 및 배양

이 실험은 경상대학교 동물윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다. 돼지 골수유래 중간엽 줄기세포(pBM-MSCs)는 3주령 암컷 돼지의 대퇴부 골수로부터 외과적으로 회수되어 Faast 등(2006)의 방법에 의해 Ficoll-Paque Plus(Amersham Science, USA)를 사용하여 제조사의 분리방법에 따라 분리되어졌다. pBM-MSCs를 위한 기본 배양액으로는 Advanced Dulbecco's modified Eagle medium(ADMEM)에 10% 소 혈청, 1 mM N-pyruvate, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 사용하였고, 세포들은 모두 38.5°C 인큐베이터 속에서 5% CO₂ 농도를 유지하면서 배양되었다. 이 실험에 사용된 세포는 모두 3passages 까지만 사용되었고, 대조구로는 동결 과정을 거치지 않은 신선 pBM-MSCs를 사용하였다.

3. pBM-MSCs의 동결 및 용해

pBM-MSCs는 0.25%(w/v) trypsin-EDTA에 의해 분리되었고, 2×10^6 cell/ml 농도로 기본 배양액으로 희석되었다. 희석된 pBM-MSCs는 기본 배양액속에 40, 20, 10%의 DMSO가 포함된 배양액에 각각 1:1(v:v)로 1.5 ml cryovials 속에서 천천히 희석되었다. 1.5 ml cryovials은 동결을 위하여 미리 25°C로 조절된 controlled rate programmable freezing device chamber (Kryo 360, planer 300, Middle sex, UK) 속으로 이동되었고, 25°C에서 -80°C 구간을 -1°C/min의 냉각 속도로 동결하였다. 동결 후에는 즉시 LN₂에 넣어 실험 전까지 보관하였다.

동결된 pBM-MSCs의 용해는 37°C 항온수조 속에서 1분간 용해 후 기본 배양액으로 원심분리기를 이용하여 300 \times g에서 10분간 2번 수세 후 실험에 사용하였다.

이 실험을 위해 사용된 실험군은 아무런 처리를 하지 않은 신선 세포인 대조군과 비교군으로서는 5% DMSO, 10% DMSO, 20% DMSO의 동결 보호제를 사용하여 동결 보관된 세포군으로 나누어 실험에 공시하였다.

4. 0.4% Trypan Blue 염색약을 이용한 세포 생존율 조사

동결 용해된 pBM-MSCs는 용해 직후 0.4% Trypan Blue 염색약과 세포용액을 1:1(v:v)로 희석하여 광학현미경 아래에서 hemocytometer를 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 이때 세포가 파랗게 염색된 것은 죽은 세포로 판정하였고, 전체 세포수에서 염색되지 않은 세포수를 계산하여 퍼센트로 환산하였다. 이 실험은 4번 반복되었다.

5. Caspase-3과 -7 발현량에 따른 Apoptosis

세포 사멸율을 조사하기 위하여 Vybrant FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit(Molecular probes, Inc.OR, USA)를 사용하여 제조사 설명서에 의해 분석이 이루어졌다. 먼저 단일세포로 된 pBM-MSCs는 1×10^6 cell/ml 세포 농도로 조정되었고, 각각 300 ul의 세포 부유액과 10 ul의 30 \times fluorescent inhibitor of capases (FLICA)를 잘 혼합하였다. 혼합된 세포는 1시간 동안 38.5°C의 5% CO₂ 인큐베이터 속에서 20분 간격으로 2번 잘 혼합해 주면서 빛을 피하여 배양 후, 2 ml의 wash buffer를 첨가하여 수세 후 다시 1 ml의 wash buffer를 첨가하여 수세하였다. 최종적으로 400 ul의 wash buffer를 첨가하여 잘 혼합하고 유세포 분석기(BD bioscience, Heidelberg, Germany)를 사용하여 single color 분석을 수행하였다. 이때 excitation와 emission은 488과 530 nm를 선택하여 분석하였다. 이 실험은 3번 반복되었고, 각 군의 negative control은 염색되지 않은 pBM-MSCs를 사용하였다.

6. 통계학적 분석

이 실험 결과는 모두 PSAW statistic 18 program을 사용하여 one way ANOVA를 이용하여 Fig. 2는 LSD로, Fig. 3은 Bon-

ferroni로 multiple comparison을 수행하였다. 유의성 $p < 0.05$ 일 때 유의성을 가지는 것으로 판정하였다. 결과들은 모두 $mean \pm standard deviation(SD)$ 로 표시하였다.

결 과

1. 돼지 골수로부터 중간엽 줄기세포의 분리 및 세포 형태

Fig. 1과 같이 Ficoll-Paque Plus를 이용하여 골수로부터 분리된 세포는 평판 배양법에 의해 adherent condition 조건 아래에서 성공적으로 배양되었다. 그리고 fibroblast like cell과 같은 형태로 spindle-shaped cells의 형태를 보임을 관찰할 수 있었고, 또한 성체 줄기세포와 배아 줄기세포에서 보이는 colony formation이 관찰되었다.

2. pBM-MSCs의 동결 후 생존율

동결 전후 pBM-MSCs의 0.4% Trypan Blue exclusion test 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여 5% DMSO 군의 생존율은 유의성이 없었다($90.4 \pm 1.8\%$ vs. $86.2 \pm 7.4\%$). 그러나 10% DMSO 군의 경우 유의적으로 낮은 생존율을 보였지만, 5%와 10% DMSO 군 간에는 유의적 차이가 없었다($86.2 \pm 7.4\%$ vs. $81.9 \pm 4.4\%$). 20% DMSO 군($72.0 \pm 2.3\%$)의 경우 다른 군들과 비교하여 유의적으로 극히 낮은 생존율을 보였다.

3. Caspase-3과 -7 발현

비교적 초기 Apoptosis를 검정을 위한 Caspase-3과 -7의 발현을 검정하기 위하여 fluorescence inhibitor를 이용한 유세포 분석 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3A에서 대조군(Fig. 3Aa)와 비교하여 비교군인 5%, 10%, 20% DMSO 군은 negative control과 비교적 오른쪽으로 더 많이 이동한 것을 관찰할 수 있고, 특히 20% DMSO 군이 많이 이동한 것을 관찰할 수 있



Fig. 1. pBM-MSCs isolated from porcine bone marrow at p0 (100 \times).

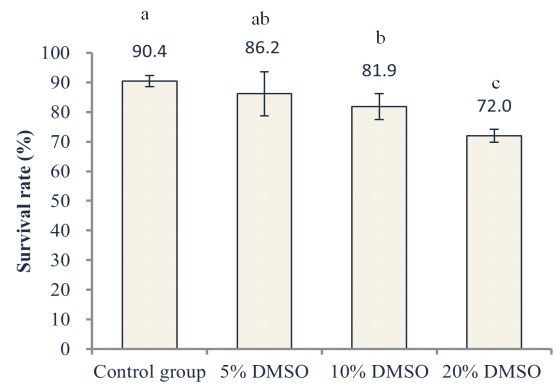


Fig. 2. Survival rates after thawing of pBM-MSCs frozen with DMSO at p3. Control group mean untreated fresh pBM-MSCs. $a-c$ $p < 0.05$. 4 replicates.

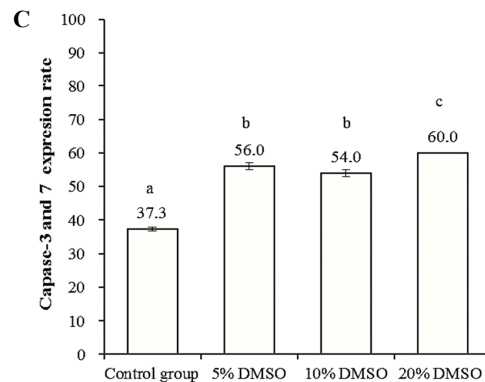
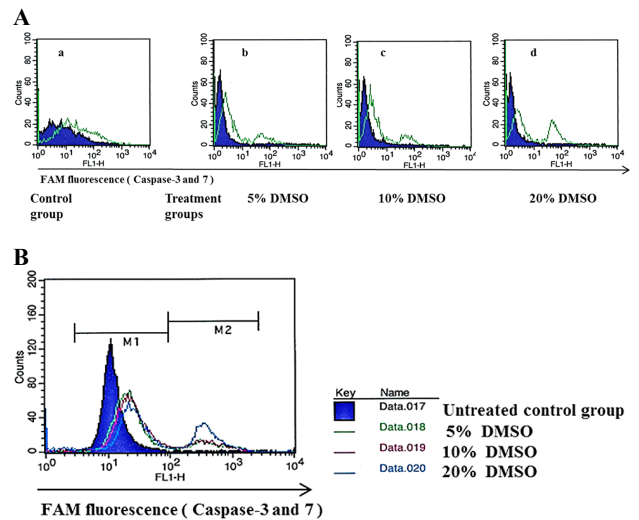


Fig. 3. Caspase-3 and -7 expressions in pBM-MSCs. (Aa) control group (un-treated fresh pBM-MSCs), (Ab-d) treatment groups (pBM-MSCs frozen with DMSO), (B) merge of treatment groups and (C) caspase-3 and -7 expression rates ($a-c$ $p < 0.05$). Filled histogram and open histogram represents negative and positive controls, respectively. 3 replicates.

었다. Fig. 3B는 동결 해동된 5%, 10%, 20% DMSO 군 간에 직접적인 비교를 위하여 세 군의 결과를 합친 것으로 20% DMSO 군이 많이 이동한 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과들은 비율로 환산하여 Fig. 3C에 나타내었다. 대조군($37.3 \pm 0.6\%$)과 비교하여 5%와 10%, DMSO 군($56.0 \pm 0.1\%$, $54.0 \pm 0.1\%$)은 유의적으로 높게 활성화된 Caspase-3과 -7이 발현되는 것을 확인할 수 있었지만 5%와 10% DMSO 군간에는 유의성이 존재하지 않았다. 그리고 아무런 처리를 하지 않은 세포에서도 일정수준의 Caspase-3과 -7의 발현이 존재함을 확인할 수 있었다. 20% DMSO 군($60.0 \pm 0.0\%$)의 경우 유의적으로 가장 높은 Caspase-3과 -7의 발현이 관찰됨을 확인할 수 있었다.

고찰

이 연구는 성체줄기세포를 이용한 세포 치료를 위해서 선결 조건인 안전한 동결보존 방법의 개발과 동시에 세포동결 보호제인 DMSO와 동결 자체가 세포사 중 apoptosis에 미치는 독성 효과를 규명하는 것이었다. 이 연구는 특히 apoptosis 경로 중 외부 자극에 의한 미토콘드리아 내막에 존재하는 사이토크롬 C의 방출과 최종적으로 단백질 분해효소인 Caspase-3과 -7의 활성화에 의한 발현을 조사함으로써 apoptosis의 형태적 발현 정도가 아닌 실제적인 효소 발현 경로를 조사하였다. 그 결과 정상세포에도 이 효소는 일정 수준이 발현됨으로써 비정상적인 세포를 제거하는 역할을 한다는 것을 규명하였고, 동시에 동결과 동결 보호제의 독성이 이 단백질 분해 효소의 과발현으로 세포 사멸에 치명적인 효과를 나타낼 수 있음을 규명하였다.

중간엽 줄기세포의 중요 특징 중 하나는 adherence culture condition 아래 평판 배양 시 fibroblast like stem cell의 형태와 spindle shaped cells(Vishnubalaji 등, 2012)의 형태를 띠는 것이다. 또 다른 특징 중 하나는 세포가 세포밀도 구배 의존적으로 배양을 하지 않고, 세포의 outgrowth에 의한 colonies의 형성이 다(Ock 등, 2010). 선행 보고들과 같이 이 연구에서 사용된 pBM-MSCs의 경우도 같은 특성을 보임으로써 성공적으로 추출 배양되었음을 확인할 수 있었다.

세포의 동결보존 시 사용되는 동결 보호제는 세포 내의 수분을 고삼투압 용매를 사용하여 세포내에서 제거함으로써 세포 내 얼음 형성에 의한 세포질 내에 미세소기관들과 세포 내 골격에 치명적인 손상을 입는 것을 방지해 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Carvalho 등, 2008). 그러나 동결 보호제는 그 자체의 독성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 사람의 경우 DMSO와 같은 동결 보호제로 동결된 세포를 이식시 부정맥, 심장 이상 등 증상이 나타날 수 있으며, 특히 줄기세포의 경우 소아에 많이 이식되는 경우들이 있는데, 특히 그 증상이 심각하게 나타날 수 있는 것으로 보고되고 있다(Zambelli 등, 1998). 이러한 문제점을 해결하고자 최소한의 동결 보호제를

사용하는 것이 이 실험의 목적이었고, 우리의 결과에서는 관례적으로 사용되는 10% DMSO를 절반으로 줄였을 때도 같은 효과를 볼 수 있다는 것을 Fig. 2를 통하여 규명하였고, 이 결과는 앞서 보고된 세포에서 감소된 10% 이하의 DMSO 사용 시도 성공적으로 보존이 가능하다는 결과와 일치되며(Carvalho 등, 2008), 비록 동일 조직은 아니지만 지방 유래 MSCs에서도 같은 효과를 보고하였다(Zeisberger 등, 2011).

줄기세포 이식 치료를 위해서는 동결 후 세포의 생존율이 매우 중요한 요소 중 하나이고 이것을 평가하기 위해 주로 apoptosis를 비교함으로써 세포의 운명을 판정하는 기준으로 삼고 있다. 따라서 이 연구는 apoptosis에 발생하는 경로 중 비교적 초기에 나타나는 상위 신호에 의해 분열로 인한 핵단백질 분해효소들(Caspase-3과 -7)의 활성을 조사하기 위해 caspases의 fluorescent inhibitor를 붙임으로써 간접적으로 측정하는 방식에 의해 분석하였다(Bedner 등, 2000). 그리고 이 분석 방법은 일반적으로 많이 사용되는 후기 apoptosis에 나타나는 DNA의 절단을 관찰하는 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) 염색이나 세포 내막에 존재하는 phosphatidyl serine(PS)의 외부 노출을 Annexin V staining을 통해 확인하는 방법보다 직접적으로 세포의 운명을 확인할 수 있는 방법이라 할 수 있다(Bedner 등, 2000). 이 분석법에 의한 결과에서 정상세포도 일정수준의 Caspase-3과 -7이 발현됨을 확인할 수 있었고, 그 원인은 세포에서 스스로 문제가 있는 세포를 제거하는 기능과 Apoptosis 외 다른 경로에 의해 일부 발현될 수 있다는 보고와 일치하는 것으로 생각된다(Smolewski 등, 2002). pBM-MSCs에서 이 효소의 발현을 직접 비교한 연구가 없어 비교할 수 없지만 동결 시 동결 독성과 동결 보호제의 독성으로 이 효소의 활성이 유발됨을 실험 결과를 통해 확인할 수 있었다. 특히 20% DMSO의 경우 더 많은 독성을 유발하였고, 5%와 10% DMSO 간에는 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 그러나 비록 이 효소가 과 발현이 모든 세포를 apoptosis로 진행시키는 것은 아니며, 적절한 억제 유전자의 발현 신호가 오게 되면 apoptosis는 감소될 수도 있다.

이상의 결과들로부터 관례적인 10% 농도보다 감소된 5% DMSO를 이용한 동결 보호제의 사용도 10% DMSO를 사용한 동결과 같은 효과를 볼 수 있음을 생존율 조사와 Caspase-3과 -7의 활성 경로의 확인을 통하여 확인할 수 있었다. 최종적으로 이러한 연구 결과는 세포의 동결보존 연구와 상업적인 줄기세포 보존 기술 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Aldahmash A, Zaher W, Al-Nbaheen and Kassem M. 2012. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration. Ann. Saudi.

- Med. 32:68-77.
- Bedner E, Smolewski P, Amstad P and Darzynkiewicz Z. 2000. Activation of caspases measured *in situ* by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 259: 308-313.
- Bhandari DR, Seo KW, Sun B, Seo MS, Kim HS, Seo YJ, Marcin J, Forraz N, Roy HL, Larry D, Colin M and Kang KS. 2011. The simplest method for *in vitro* β -cell production from human adult stem cells. *Differentiation* 82: 144-152.
- Davis J, Rowley SD and Santos GW. 1990. Toxicity of autologous bone marrow graft infusion. *Prog. Clin. Biol. Res.* 333:531-540.
- Faast R, Harrison SJ, Beebe LF, McIlpatrick SM, Ashman R and Nottle MB. 2006. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. *Cloning Stem Cells* 8:166-173.
- Kamata M, Liang M, Liu S, Nagaoka Y and Chen IS. 2010. Live cell monitoring of hiPSC generation and differentiation using differential expression of endogenous microRNAs. *PLoS One.* 5:e11834.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R and Kim KS. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cel.* 54:472-476.
- Magatti M, De Munari S, Vertua E, Gibelli L, Wengler GS and Parolini O. 2008. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells* 26:182-192.
- Ock SA, Jeon BG and Rho GJ. 2010. Comparative characterization of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow extract and skin tissues. *Tissue Eng. Part C Methods.* 161:481-491.
- Ogawa T, Ono S, Ichikawa T, Arimitsu S, Onoda K, Tokunaga K, Sugiu K, Tomizawa K, Matsui H, and Date I. 2007. Novel protein transduction method by using 11R: an effective new drug delivery system for the treatment of cerebrovascular diseases. *Stroke* 38:1354-1361.
- Robertson JA. 2010. Embryo stem cell research: ten years of controversy. *J. Law. Med. Ethics* 38:191-203.
- Rösland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R and Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 69:5331-5339.
- Sarkis C, Philippe S, Mallet J and Serguera C. 2008. Non-integrating lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 8:430-437.
- Smolewski P, Grabarek J, Halicka H and Darzynkiewicz Z. 2002. Assay of caspase activation *in situ* combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J. Immunol. Methods* 265:111-121.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT and Nicholson DW. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:17907-17911.
- Tsukiyama T, Asano R, Kawaguchi T, Kim N, Yamada M, Minami N, Ohinata Y and Imai H. 2011. Simple and efficient method for generation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible factors and an EOS reporter system. *Genes Cells* 16:815-825.
- Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A and Ramesh T. 2012. Skin-derived multipotent stromal cells - an archival for mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* In press.
- Yamanaka S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 1:39-49. Review.
- Zambelli A, Poggi G, Da Prada G, Pedrazzoli P, Cuomo A, Miotti D, Perotti C, Preti P and Robustelli della Cuna G. 1998. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res.* 18:4705-4708.
- Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, Ponsaerts P, Wouters G, Doerr D, Katsen-Globa A, Ehrbar M, Hescheler J, Hoerstrup SP, Zisch AH, Kolbus A and Zimmermann H. 2011. Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. *Cell Transplant.* 20: 1241-1257.