

УДК 611.013.85.085.23:615.014.41

В.Ю. Прокопюк\*, О.В. Фалько, І.Б. Мусатова,  
О.С. Прокопюк, О.О. Роєнко, О.О. Терехова, О.В. Чуб

## Кріоконсервування та низькотемпературне зберігання плацентарних біооб'єктів

UDC 611.013.85.085.23:615.014.41

V.Yu. Prokopyuk\*, O.V. Falko, I.B. Musatova,  
O.S. Prokopyuk, O.O. Royenko, O.O. Terekhova, O.V. Chub  
**Low Temperature Preservation and Storage  
of Placental Biological Derivatives**

**Реферат:** Розглянуто актуальні проблеми низькотемпературного зберігання плацентарних біооб'єктів: безклітинного матеріалу, клітинних суспензій, тканини плаценти, пуповини, плодових оболонок. Виділено основні напрямки досліджень у даній галузі залежно від мети, з якою зберігається біооб'єкт: діагностичної, експериментальної, клінічної, створення донорського або персонального низькотемпературного банку. На сьогоднішній день перспективною є розробка методів ліофілізації, гіпотермічного зберігання, кріоконсервування при різних температурних режимах.

**Ключові слова:** плацента, пуповина, амніотична оболонка, сироватка, клітини плаценти, кордова кров, кріоконсервування.

**Реферат:** Рассмотрены актуальные проблемы низкотемпературного хранения плацентарных биологических объектов: бесклеточного материала, клеточных суспензий, ткани плаценты, пуповины, плодных оболочек. Выделены основные направления исследований в данной области в зависимости от цели, с которой сохраняется биологический объект: диагностической, экспериментальной, клинической, создания донорского или персонального низкотемпературного банка. На сегодняшний день перспективным является разработка методов лиофилизации, гипотермического хранения, криоконсервирования при разных температурных режимах.

**Ключевые слова:** плацента, пуповина, амниотическая оболочка, сыворотка, клетки плаценты, кордовая кровь, криоконсервирование.

**Abstract:** The paper covers the actual tasks in low temperature storage of such placental biological derivatives as: cell-free material, cell suspensions, placental tissue, umbilical cord and fetal membranes. Depending on the purposes for biological specimen storage the main research directions in this field are as follows: diagnostic, experimental, clinical, establishment of donor or personal low temperature bank. Nowadays a top priority is designing the methods for freeze-drying, hypothermic storage, and cryopreservation with different temperature regimens.

**Key words:** placenta, umbilical cord, amniotic membrane, serum, placental cells, cord blood, cryopreservation.

Плацента людини є провізорним органом, який формується після 12 тижнів вагітності з трофобласта та забезпечує ріст та розвиток плода, його взаємодію з організмом матері, зміни в організмі матері під час вагітності [95, 123]. Під терміном «плацента», або «послід», розуміють ворсинчасту тканину, хоріальну, амніотичну оболонку та пуповину, які мають досить складну структуру, що змінюється протягом вагітності [95, 115, 116].

Цікавість дослідників до плаценти обумовлена тим, що вона є джерелом стовбурових клітин [73], великої кількості гормонів, цитокінів, імуномодуляторів [63, 123] та інших біологічно активних речовин [76, 98, 139]. Імунологічними особливостями плаценти є низька експресія головного

Human placenta is a provisional organ, formed after 12 weeks of pregnancy from a trophoblast, which provides growth and development of fetus, its interacting with the mother's body, changing it during pregnancy [60, 111]. Terms 'placenta' or 'afterbirth' mean a villous tissue, chorionic, amniotic membranes and umbilical cord with quite a complicated structure changing during pregnancy [60, 91, 93].

The interest of scientists to the placenta is associated with the fact, that it is a source of stem cells [18], a great number of hormones, cytokines, immune modulators [111, 122] and other biologically active substances [21, 63, 133]. Immunological peculiarities of placenta are as follows: low expression of major histocompatibility complex HLA-A, HLA-B, HLA-C and

Низькотемпературний банк біологічних об'єктів, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:  
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-42-84, факс: (+38 057) 373-30-84,  
електронна пошта: prokopyuk@mail.ru

Надійшла 25.08.2015

Принята в печать 06.10.2015

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 291–310.  
© 2015 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Low Temperature Bank of Biological Objects, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 4284, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: prokopyuk@mail.ru

Received August, 25, 2015

Accepted October, 06, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(4): 291–310.

© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

комплексу гістосумісності HLA-A, HLA-B, HLA-C та відсутність експресії HLA-DR-антигенів; її компоненти здатні до імуносупресивної дії *in vivo* та *in vitro* [54, 115]. Крім того, для отримання плаценти відсутня необхідність оперативного втручання чи донорства [116].

У першій половині XX століття, коли у клінічній практиці почали застосовувати тканину та екстракти плаценти [51, 53, 68, 70, 71, 77, 80, 86], плодові оболонки [57, 83], компоненти плацентарної крові [58], виникла необхідність зберігання плацентарного біоматеріалу. Для забезпечення ряду потреб, насамперед, безпечного і раціонального клінічного, лабораторного та експериментального застосування плацентарного біоматеріалу на сьогодні найчастіше використовують метод криоконсервування. Сироватку кордової крові, біоптати хоріону, післяпологову плаценту [81, 96, 130] зберігають з діагностичною метою, фрагменти плаценти, оболонки, сироватку кордової крові, клітини плаценти та кордової крові – для подальшого клінічного застосування в різних галузях медицини [11, 16, 40, 41, 59, 84], доклінічного тестування впливу на них новітніх лікарських засобів [96] та використання в експериментальній роботі [27, 38, 48, 56] (таблиця).

Про розвиток регенеративної медицини та терапії стовбуровими клітинами свідчать численні роботи з криоконсервування тканини та суспензій клітин плаценти [29, 46, 47, 62, 64, 72], кордової крові [10, 13, 35, 59], плазми та сироватки кордової крові [21, 24], пуповини та оболонки [82, 99, 120, 138]. Стівбурові клітини плаценти та кордової крові зберігають для подальшого застосування в регенеративній медицині [73, 136], персонального зберігання [67, 69, 92].

Тривалість низькотемпературного зберігання залежить від властивостей біоматеріалу та цілей дослідників. Життєздатний нативний матеріал може бути застосований лише впродовж 3–12 годин після отримання, однак для його мікробіологічного тестування потрібно не менше тижня. Для підбору препаратів за системою HLA та групою крові, а також для дослідницьких цілей або тестування лікарських засобів важливо мати достатньо велику кількість експериментального плацентарного біоматеріалу, що зберігається в низькотемпературному банку. Діагностика біопсійного матеріалу при транспортуванні в віддалену лабораторію чи одночасна постановка тестів із кількома зразками для зниження працезатрат персоналу також потребують низькотемпературного зберігання.

На даний час сироватки тварин, живильні середовища та ряд криопротекторів не відповідають вимогам GMP [72, 73, 102], тому важливим в

no expression of HLA-DR-antigens, its components are capable of *in vivo* and *in vitro* immune suppression [91, 134]. In addition, there is no need either in surgery or donation for placenta procurement [93].

In the early 20<sup>th</sup> century when the placental tissue and extracts [6, 13, 16, 22, 26, 35, 107, 118], fetal membranes [29, 107] as well as placental blood components [66] had been started to be applied in clinical practice, there was appeared the need in placental biomaterial storage. Cryopreservation is today the most frequently applied method to support a number of needs, primarily in safe and rational clinical, laboratory and experimental applications of biological objects. The cord blood serum, chorionic bioplates, postpartum placenta [27, 61, 124] are stored with a diagnostic aim, the fragments of placenta, membranes, cord blood serum, placental and cord blood cells are done for further clinical application in different medical areas [30, 42, 46, 50, 55, 135], pre-clinical testing of novel drugs effect on them [61], and application in experimental research [32, 84, 92, 109] (Table).

Numerous researches on cryopreservation of placental tissue and cell suspensions [17, 43, 102, 104, 121, 148], cord blood [8, 41, 51, 135], plasm and serum of cord blood [75, 83], umbilical cord and membranes [28, 65, 106, 131] testify to the development of regenerative medicine and stem cell therapy. Placenta- and cord blood-derived stem cells are stored for further application in regenerative medicine [18, 130] and for autobanking [5, 12, 57].

The duration of low temperature storage depends on many factors and purposes of scholars. Viable native material may be used only within 3–12 hrs after procurement, but its microbiological testing requires a week and more. In order to select the specimen according to the HLA system and blood group, as well as for either research purposes or drug testing it is important to have quite a great number of experimental placental biological material, stored at low temperature bank. Low temperature storage is also necessary either for biopsy material diagnostics performed in remote laboratory or at a simultaneous testing with several samples to reduce the staff work efforts.

Nowadays animal sera, culture media and some cryoprotectants do not meet the GMP requirements [17, 18, 69], therefore it is important to apply during cryopreservation the techniques and materials authorised in clinical practice.

To date there is an adequate experience accumulated in procurement and low temperature storage of cord blood and its components [8, 9, 49, 75, 135, 137], placental extract [46, 55], amniotic fluid [100, 125], placental cells and fragments [46, 48, 60, 104, 105], umbilical cord [28, 80], amniotic and chorionic membranes [4, 54, 115].



процесі кріоконсервування є застосування технологій та матеріалів, дозволених до використання в клінічній практиці.

На сьогодні накопичено достатній досвід отримання та низькотемпературного зберігання кордової крові та її компонентів [15, 21, 33, 35, 36, 59], екстракту плаценти [40, 41], амніотичної рідини [118, 131], клітин та фрагментів плаценти [14, 32, 40, 46, 95], пуповини [82, 109], амніотичної та хоріальної оболонки [34, 49, 66].

### Кріоконсервування безклітинного плацентарного матеріалу

Низькотемпературне зберігання плазми, сироватки кордової крові, екстрактів тканини плаценти та амніотичної рідини застосовують для діагностичних, лабораторних, експериментальних [21, 39, 43, 50, 56, 91] або клінічних потреб [6, 8, 22, 23, 37, 38, 44, 54].

Відомо, що при зниженні температури до 4°C змінюється стан окремих білків, а за більш низьких температур спостерігаються явища кріоденатурації та кріодеструкції білків, створюються їх асоціати з ліпідами, змінюється активність ферментів [25, 28, 50, 119]. Перебудови в білках при заморожуванні сприяють експонуванню внутрішньодомених гідрофобних груп на поверхню макромолекул, що призводить до утворення високомолекулярних білкових агрегатів [78, 87].

Найтипівішими кріошкодженнями безклітинних препаратів плаценти є конформаційні зміни та агрегація білків [26, 28, 40, 55, 85].

Зберігання сироватки кордової крові за температури -20°C призводить до зниження вмісту та біологічної активності деяких гормонів (пролактин, хоріонічний гонадотропін, естрадіол, фолікулостимулюючий гормон, лютеїнізуючий гормон, прогестерон), але за температури -196°C їхній вміст залишається значно вищим [24]. При подальшому зберіганні сироватки кордової крові протягом року за -20°C негативні зміни, які виникли внаслідок охолодження, прогресують, у той час як зберігання за -196°C забезпечує стабільність вмісту гормонів та білків [22, 55].

Для уникнення кріошкоджень безклітинних плацентарних біоб'єктів застосовується швидке охолодження. Кріоконсервування сироватки кордової крові зі швидкістю охолодження 1–2 град/хв до кінцевих температур -20 та -80°C призводить до агрегації білкових компонентів, у той час, як охолодження зі швидкістю 300–400 град/хв дозволяє зберегти нативний стан білків сироватки. Мінімальна швидкість охолодження, яка забезпечує збереженість нативного вмісту і стану білків безклітинних плацентарних біопрепаратів, стано-

### Плацентарні біоб'єкти, їх використання та зберігання Placenta derivatives, their applications and storage

Біоб'єкт Specimen	Мета зберігання Aim of storage	Методи Methods
Безклітинний матеріал (сироватка, екстракт, амніотична рідина) Cell-free derivatives (serum, extract, amniotic fluid)	Лабораторна діагностика (ІФА, ПЛР) Клінічне застосування* Laboratory diagnostics (ELISA, PCR) Clinical applications*	Кріоконсервування Cryopreservation (-20, -80, -196°C)
Суспензії клітин (ядровмісні клітини кордової крові, МСК, «адгезивні культури») Cell suspensions (cord blood nucleated cells, MSCs, adhesive cultures)	Експериментальні дослідження Зберігання для персонального використання Клінічне застосування* Experimental studies Personal banking Clinical applications*	Кріоконсервування Cryopreservation (-80, -196°C)
Фрагменти амніотичної та хоріальної оболонки Fragments of amniotic and chorionic membranes	Клінічне застосування* Експериментальні дослідження Clinical applications* Experimental studies	Хімічна девіталізація Ліофілізація Гіпотермічне зберігання Кріоконсервування Chemical devitalization Freeze-drying Hypothermic storage Cryopreservation
Фрагменти ворсинчастої тканини Fragments of chorionic tissue	Лабораторна діагностика (морфологічні дослідження) Експериментальні дослідження (у т.ч. тестування лікарських препаратів) Клінічне застосування* Laboratory diagnostics (morphological studies) Experimental studies (including drug testings) Clinical applications*	Гіпотермічне зберігання Кріоконсервування Hypothermic storage Cryopreservation (-80, -196°C)

**Примітка:** \* – у більшості робіт розглядаються не реально затвержені медичні протоколи, а перспективи клінічного застосування та клінічних випробувань.

**Note:** \* – the majority of publications represent the potential clinical application and trials, not the formal protocols.

### Cryopreservation of cell-free placental material

Low temperature storage of plasm, cord blood serum, extracts of placental tissues and amniotic fluid is used either for diagnostic, laboratory, experimental [32, 47, 75, 94, 97, 116] or clinical needs [14, 76, 77, 98, 99, 134, 140].



вить 100 град/хв [28]. Доведено, що найбільш несприятливі режими при кріоконсервуванні сироватки кордової крові та екстракту плаценти включають низькі швидкості охолодження (1–7 град/хв), за яких макромолекули до 12 кДа формують агрегати від 120 до 300 кДа, що утворюються внаслідок порушення міжмолекулярних зв'язків [25, 28].

Білки та статеві гормони при низькотемпературному консервуванні екстракту плаценти зберігаються в концентраціях, близьких до нативних, за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  не більше 10 діб, а при  $-196^{\circ}\text{C}$  – більше року [17]. Властивості екстрактів, отриманих із тканини плаценти, яка зберігалася при  $-196^{\circ}\text{C}$ , не залежать від терміну зберігання (мінімум рік). Після зберігання екстрактів при  $-196$ ,  $-80$  і  $-20^{\circ}\text{C}$  збільшується відносний вміст високомолекулярних білкових комплексів, причому за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  ці зміни найбільш істотні. Встановлено, що вже після 7-ї доби зберігання екстрактів плаценти при  $-20^{\circ}\text{C}$  підвищується вміст продуктів перекисного окислення ліпідів і окисленого гемового заліза, яке міститься в білках, представлених в екстракті плаценти гемоглобіном і міоглобіном. Показано, що гемолітична активність екстракту плаценти знижується протягом першого року зберігання при  $-196^{\circ}\text{C}$  і протягом 30 діб при зберіганні за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ . Більш тривале зберігання екстрактів при  $-20^{\circ}\text{C}$  викликає підвищення гемолітичної активності, що корелює зі збільшенням вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів [42]. Результати вивчення впливу довгострокового низькотемпературного зберігання на збереженість плацентарного фактора росту довели, що його активність та концентрація протягом 36 місяців не знижуються [106].

Амніотичну рідину зберігають із діагностичною метою, а також для виділення стовбурових клітин і як компонент культурального середовища [91, 118, 129]. G. Graca та співавт. показали, що спектрометричні характеристики амніотичної рідини змінюються протягом 4 годин за кімнатної температури, але зберігаються при заморожуванні-відігріванні [91]. Результати дослідження свідчать про збереженість в амніотичній рідині низки цитокінів при зберіганні протягом року за температури  $-80^{\circ}\text{C}$ , на відміну від зберігання за вищих температур (4 та  $20^{\circ}\text{C}$ ) [91, 131].

### **Кріоконсервування суспензій клітин плаценти та кордової крові**

Клітини плаценти, пуповини та плодових оболонок зберігаються у вигляді клітинних суспензій, які є найбільш розповсюдженим об'єктом кріоконсервування [72, 135]. Для їх збереження застосовують такі ж методи, як і для інших типів клітин.

The temperature decrease down to  $4^{\circ}\text{C}$  is known to change the state of certain proteins, and at lower temperatures the phenomena of cryodenaturation and cryodestruction of proteins, formation of their associates with lipids and changes in enzyme activity are observed [85, 86, 101, 116]. Rearrangements in proteins during freezing contribute to the exposure of intradomain hydrophobic groups on macromolecule surface, resulting in a high molecular protein aggregate formation [23, 37].

The most typical cryodamages of cell-free placental preparations are the conformational changes and protein aggregation [33, 34, 46, 85, 87].

Storage of cord blood serum at  $-20^{\circ}\text{C}$  results in a decrease in the content and biological activity of some hormones (prolactin, chorionic gonadotropin, estradiol, follicle-stimulating hormones, luteinizing hormone, progesterone), however, at  $-196^{\circ}\text{C}$  their content remains significantly higher [83]. Following storage of cord blood serum at  $-20^{\circ}\text{C}$  during a year is accompanied with a progress in negative changes resulted from cooling, meanwhile the storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  provides the hormone and protein content stability [33, 77].

To avoid the cryodamages in cell-free placental bioobjects the rapid cooling is applied. Cryopreservation of cord blood serum with 1–2 deg/min cooling rate down to final temperatures of  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  results in protein component aggregation, and *vice versa* the cooling with 300–400 deg/min rate allows preserving a native state of serum proteins. Minimum cooling rate, providing the integrity of native content and state of proteins of cell-free placental bioproducts makes 100 deg/min [85]. Low cooling rates (1–7 deg/min) were found to be the part of most unfavourable regimens for cord blood serum and placental extract cryopreservation, resulting in the appearance of aggregates of 120 to 300 kDa formed of macromolecules of up to 12 kDa, appearing as a result of disordered molecule-to-molecule bonds [85, 86].

During low temperature storage of placental cryoextract, proteins and sex hormones preserved their concentrations close to initial ones if storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  was not longer than 10 days, and more than a year at  $-196^{\circ}\text{C}$  [53]. Properties of the extracts derived from placental tissue, stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ , do not depend on storage term (at least one year). After storing the extracts at  $-196$ ,  $-80$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  the relative content of high molecular protein complexes increases, moreover at  $-20^{\circ}\text{C}$  these changes are the most significant. There was established the fact that even after day 7 of placental extract storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  the content of lipid peroxidation products and oxidized heme iron, contained in proteins, represented by haemoglobin and myoglobin in placental extract, increased. Haemolytic activity of placental extract was shown to significantly





Накопичено великий досвід щодо кріоконсервування стовбурових клітин плаценти [117, 136]. У ряді випадків доцільно кріоконсервувати фрагменти тканини плаценти з наступним виділенням клітин [135, 136], при цьому стовбурові клітини зберігають свої фенотипові характеристики та здатність до диференціювання [62].

Кріоконсервування згубно діє на клітини суспензії плаценти: зменшується їх кількість внаслідок загибелі, виникають апоптотичні зміни [121]. При кріоконсервуванні культури цитотрофобласта знижується рівень секреції хоріонічного гонадотропіну людини, що автори пояснюють морфологічними пошкодженнями та затримкою диференціювання клітин [112]. Тому суспензії клітин плаценти кріоконсервують із застосуванням захисних речовин та їх сумішей. Так, найбільш доцільним визнано використання кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) з оптимальною концентрацією 2–10%, яка забезпечує максимальну збереженість клітин та мінімальний токсичний ефект. При концентраціях менше 2% показник збереженості та вітальні характеристики клітин різко знижуються, а при концентрації вище 10% значно посилюється токсичний ефект [107]. Крім того, підвищена концентрація ДМСО викликає стимуляцію диференціювання деяких клітин у напрямку кардіоміоцитів [145]. Запропоновані методи кріоконсервування клітинних суспензій без ДМСО суттєво зменшують збереженість клітин [142]. Для підвищення цього показника можлива комбінація ДМСО з гідроксиетилкрохмалем (ГЕК) [47, 117, 132]. У клінічних випробуваннях застосовуються протоколи кріоконсервування мезенхімальних стовбурових клітин плаценти з використанням ДМСО, декстрану-40, полівінілпіролідону та альбуміну при розведенні зразків фізіологічним розчином [3, 117]. Запропоновано метод кріоконсервування суспензії клітин плаценти шляхом еквілібрації з розчином «Пропандіосахароль» (розробка ІПКіК НАН України), охолодження до  $-40^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю 1–2 град/хв і наступним зануренням у рідкий азот. При цьому досягалася висока життєздатність клітин плаценти та макрофагальних елементів (до 90%) [29].

Якщо розглядати питання швидкості заморожування клітин плаценти, то відомо, що переважна більшість дослідників застосовують протоколи повільного заморожування [73]. При збільшенні швидкостей заморожування від 1 до 10, 40 та 100 град/хв значуще знижується збереженість клітин та їх функціональні показники, навіть при підвищенні концентрації кріопротектора ДМСО [94, 136]. Розроблено багатоетапні програми кріоконсервування клітин хоріона з ініціацією кристалоутворення, які підвищують збереженість клітин, їх здат-

ність зменшуватися протягом першого року зберігання при  $-196^{\circ}\text{C}$  і протягом 30 днів зберігання при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Довгочасне зберігання екстрактів при  $-20^{\circ}\text{C}$  збільшує гемолітичну активність, що корелює з підвищенням вмісту продуктів ліпідної пероксидації [95]. Аналіз впливу довготривалого зберігання при низькій температурі на збереження фактора росту плаценти продемонстрував, що його активність та концентрація не зменшилися протягом 36 місяців [74].

Амніотична рідинка зберігається для діагностичних цілей, а також для ізоляції клітин та як компонент для середовища культури [47, 100, 120]. Graca G. et al. продемонстрували спектрометричні характеристики амніотичної рідинки, що змінюються протягом 4 год при кімнатній температурі, але зберігаються під час заморожування [47]. Ці дані свідчать про збереження в амніотичній рідинці ряду цитокінів протягом року зберігання при  $-80^{\circ}\text{C}$ , на відміну від зберігання при вищих температурах (4 та  $20^{\circ}\text{C}$ ) [47, 125].

### **Cryopreservation of placental cell and cord blood suspensions**

Плацентальні, пуповинні та клітини мембрани плода зберігаються у вигляді суспензій, що є найбільш поширеним об'єктом для кріоконсервування [17, 129]. Для зберігання застосовують ті самі методи, що й для інших типів клітин. Великий досвід у кріоконсервуванні клітин плаценти накопичено [96, 130]. У деяких випадках доцільно зберігати фрагменти плацентальної тканини та ізолювати клітини далі [129, 130], у цьому випадку клітини зберігають свої фенотипові характеристики та здатність до диференціювання [121].

Кріоконсервування негативно впливає на плацентальні суспензії клітин: їх кількість зменшується через апоптоз та апоптотичні зміни [108]. Кріоконсервування культури цитотрофобласта призвело до зменшення рівня секретії хоріонічного гонадотропіну, що пояснюється структурними пошкодженнями та затримкою клітинної диференціації [88]. Тому кріоконсервування плацентальних суспензій клітин вимагає захисних речовин та їх сумішей. Зокрема, застосування диметилсульфоксиду (ДМСО) як кріопротектора є найбільш доцільним; його оптимальна концентрація становить 2–10%, що забезпечує максимальну виживаність клітин та мінімальну токсичність. При концентраціях нижче 2% виживаність та життєві характеристики клітин різко зменшуються, а при концентраціях вище 10% токсичний ефект посилюється значно [78]. Крім того, підвищення концентрації ДМСО стимулює диференціювання клітин у напрямку кардіоміоцитів [145]. Запропоновані методи кріоконсервування клітин плаценти без ДМСО суттєво зменшують виживаність клітин [141]. Підвищення показника виживаності клітин можливо, якщо комбінувати ДМСО з гідроксиетил крохмалем (ГЕК) [96, 102, 126]. Клінічні випробування застосовують ці методи



ність до проліферації та диференціювання [141]. Дискусійним залишається питання стосовно доцільності застосування при кріоконсервуванні клітин плаценти програмних заморожувачів та систем повільного охолодження, у яких використовуються контейнери з ізопропанолом або полімери, а також програм із застосуванням вітрифікації. Однак не визначено, чи виправданий досягнутий ефект підвищення складності та вартості кріоконсервування [144]. Розроблені методи вітрифікації дозволяють підвищити збереженість клітин та спростити процедуру кріоконсервування, але їхня реалізація обмежена токсичним ефектом, спричиненим великими концентраціями вітрифікаційних сумішей, та неможливістю роботи з необхідною для клінічного застосування кількістю клітин [111]. Показано, що плацентарні клітини при гіпотермічних умовах (4°C) зберігаються до 1–2 діб, а в субнормотермічних умовах (20°C) – до 3–4 діб [117].

Для кріоконсервування клітин суспензії плаценти оптимальною визнається концентрація  $0,5\text{--}1 \times 10^6$  кл/мл. Контейнер для кріоконсервування має бути кріостійким та герметичним, що забезпечується сплавленням матеріалу чи застосуванням вторинної упаковки. Н.М. Кхуш та співавт [100] встановили, що до 9,6 % контейнерів зазнають ушкоджень при довгостроковому зберіганні, а до 42% препаратів мають бактеріальну забрудненість.

При розморожуванні клітин плаценти найчастіше застосовується водяна баня з температурою від 37 до 42°C [29, 132]. Досліджувалась можливість розморожування клітин із застосуванням інших програм: при температурах 4, 20°C зі швидкістю 10–100 град/хв [100]. Продемонстровано, що життєздатність клітин знижується при розморожуванні за температури 4°C.

Особливу увагу приділяють необхідності асептичного розморожування біломатеріалу відповідно до вимог GMP [72, 132]. Після розморожування якість клітин оцінюють методами вітального забарвлення, флуоресценції, цитометрії, визначення експресії окремих генів. Аналіз збереженості клітин після розморожування через різні проміжки часу виявив неоднакові результати. Показано, що слід оцінювати збереженість клітин через 24–48 годин, оскільки показники їх життєздатності через цей проміжок часу відновлюються [136].

Суспензії клітин плаценти зберігаються за температур  $-80, -196^\circ\text{C}$ , зразки транспортуються в рідкому азоті чи на сухому льоді [121, 127]. При банкуванні клітин та їх перевезенні для використання в клінічній практиці важливим є також дотримання таких принципів GMP: контроль якості, застосування валідованого обладнання та реаген-

for cryopreservation of placental mesenchymal stem cells using DMSO, dextran-40, polyvinylpyrrolidone and albumin, the samples were diluted with physiological saline [7, 96]. There was proposed the cryopreservation method for placental cell suspension involving equilibration with Propandiosaharol solution (developed by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine), cooling down to  $-40^\circ\text{C}$  with 1–2 deg/min rate and following immersion into liquid nitrogen. In this case a high viability of placental cells and macrophage elements was achieved (90%) [43].

If considering the question of cooling rate for placenta cells, it is known that the most researchers use the protocols of slow freezing [18]. With increasing freezing rates from 1 to 10, 40 and 100 deg/min the cell integrity and their functional indices significantly decrease, even when rising the DMSO concentration [59, 130]. There were designed the multi-stage programs for chorionic cell cryopreservation with crystal formation initiation, enhancing the survival of cells, their ability to proliferate and differentiate [139]. The question about the expediency of using for placental cell cryopreservation the programmed freezers and slow cooling systems based on either isopropanol or polymer coolants, as well as the programs with vitrification, has still remained under discussion. However, it has not been determined yet whether the achieved effect is justified by increasing the complexity and expenditures for cryopreservation [143]. The developed vitrification methods enable to improve the cell survival and simplify the cryopreservation procedure, but their implementation is limited by toxic effect caused by high concentrations of vitrification mixtures and the impossibility of working with the needed amount of cells for clinical application [82]. Placental cells survive hypothermic (4°C) conditions up to 1–2 days, and subnormothermic (20°C) ones up to 3–4 days [96].

The concentration of  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  cells/ml is recognised to be the optimal one for cryopreservation of placental cell suspension. Container for cryopreservation should be cryoresistant and sealable, that could be provided either by material fusion or use of secondary packaging. Kхuш Н.М. *et al.* [67] found that up to 9.6% of containers underwent damages during long-term storage and up to 42% of specimens were bacterially contaminated.

Water bath with the temperature from 37 to 42°C is most frequently used for placental cell thawing [43, 126]. The possibilities of cell thawing using other programs, *e. g.* at 4 and 20°C with the warming rates of 10–100 deg/min were studied [67]. Cell viability was found to decrease significantly following thawing at 4°C.



тів, контроль персоналу та процесів виробництва [72].

Упродовж останніх 30 років кордова кров (КК) людини залишається об'єктом багатьох досліджень, вважається доступним, безпечним і прийнятним з точки зору етики джерелом гемопоетичних клітин [9, 13, 45, 74, 75, 90, 92, 93, 103, 125, 146]. На сьогодні стовбурові клітини КК застосовуються в лікуванні близько 100 тяжких захворювань [18, 52, 128, 140, 147]. Дослідники і практичні лікарі вбачають перспективність подальшого застосування КК, тому для її зберігання в багатьох країнах світу створюють банки [61, 67, 69].

Основним методом зберігання КК є кріоконсервування [2, 33, 35, 60]. Більшість банків пуповинної крові світу працюють згідно з «Міжнародними стандартами зі збору, обробки, дослідження, зберігання, відбору та видачі пуповинної крові» [96], що передбачає зберігання не цільної КК, а її лейкоцитарного шару, в якому містяться різні популяції стовбурових клітин. Тому перед закладенням КК для довготривалого зберігання проводять її фракціонування [1, 35].

На етапі заморожування клітин КК використовують ДМСО, поліетиленоксид або ДМСО в комбінації з ГЕК, декстраном, людським альбуміном та ін., а також різноманітні програми заморожування [20, 29, 36, 59, 84].

Показано, що втрати гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) КК у процесі кріоконсервування відбуваються на етапі заморожування-відігрівання і характеризуються порушенням цілісності мембран та фрагментацією ядерної ДНК клітин [4, 5].

А.М. Гольцев і співавт. [12] виявили кореляцію між експресією фенотипових маркерів ГСК пуповинної крові та їх функціональним станом, що, на думку авторів, є наслідком зміни топографії розподілу маркерних білків і білкових комплексів у мембранах ГСК.

Як свідчать результати досліджень Н.С. Карпової та співавт. [19], кріоконсервування призводить не тільки до пошкодження білкових структур клітинної мембрани, ферментів і ДНК, а й може бути потенційним механізмом ушкодження термінальної тіломірної ДНК та вкорочення тіломір, внаслідок чого знижуються проліферативні властивості деконсервованих клітин. Зміна довжини тіломір та пошкодження тіломірних білків можуть також впливати на експресію генів, що негативно відбивається на функції клітин.

### **Кріоконсервування фрагментів плаценти**

Низькотемпературне зберігання фрагментів плаценти проводиться з діагностичною метою при хоріонбіопсії та дослідженні післяпологової плаценти

A special attention is paid to a need of aseptic thawing considering the GMP requirements [17, 126]. Post-thaw quality of cells could be assessed by the methods of vital staining, fluorescence, cytometry, determination of certain genes expression. Analysis of cell survival after freeze-thawing following various time periods showed unequal results. It was demonstrated that the cell survival should be assessed in 24–48 hrs, since within this time period the indices of their viability recovered [130].

Suspensions of placental cells are stored at  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ , the samples are transported either in liquid nitrogen or on dry ice [108, 117]. During cell banking and transportation applicable in clinical practice of importance is also to follow such GMP principles as quality control, use of validated equipment and reagents, control for the personnel and manufacturing processes [17].

Within the recent 30 years, the human cord blood (CB) has remained the subject of many studies, considered as an easily available, safe and ethical source of hematopoietic cells [19, 20, 40, 44, 51, 57, 58, 70, 103, 113, 144]. Today the CB stem cells are used in therapy of about 100 severe diseases [31, 119, 123, 138, 146]. Researchers and medical practitioners perceive the prospects for further application of CB, therefore the banks for its storage are established in many countries [5, 12, 24].

The basic method for CB storage is cryopreservation [2, 8, 135, 137]. Most world cord blood banks are functioning according to the International Standards for Cord Blood Collection, Processing, Testing, Banking, Selection and Release for Administration [61], that foresees the storage of not whole CB, but its leukocyte layer, containing different populations of stem cells. Therefore, before placing the CB for a long-term storage it is fractionated [1, 8].

At the stage of CB cell freezing one uses DMSO, polyethylene oxide or DMSO combined with HES, dextran, human albumin *etc.*, as well as different freezing programs [9, 30, 71, 85, 135].

The loss of CB hematopoietic stem cells (HSCs) during cryopreservation was reported to occur at freeze-thawing stage, and was characterised by disorders in membrane integrity and cell nuclear DNA fragmentation [10, 11].

Goltsev A.M. *et al.* [45] revealed the correlation between the expression of phenotypic markers of cord blood HSCs and their functional state. The authors believe it results from a change in topography of distribution of marker proteins and protein complexes in HSCs membranes.

The findings of Karpova N.S. *et al.* [64] testify to the fact, that cryopreservation leads not only to the damage of protein structures of cell membrane,





[81], а також для тестування лікарських засобів [95] і виділення клітин, які використовуються в експериментальній роботі або клінічній практиці [31, 32, 40, 62]. Фрагменти плаценти найчастіше зберігають в умовах гіпотермії (4°C) і за температури зрідженого азоту (-196°C) [41, 79, 89, 95].

При вивченні впливу гіпотермії на морфофункціональний стан фрагментів плаценти виявлена можливість зберігання нативних фрагментів протягом 24 годин, а деконсервованих – протягом 12 годин, оскільки за цей час клітини зазнають мінімальних ушкоджень [40]. А. Garrod та співавт. [89] показали, що для проведення деяких видів досліджень можливе короточасне (48 годин) гіпотермічне зберігання плаценти. N. Cirelli та співавт. [79] виявили в плацентарних експлантах після гіпотермічного зберігання швидкі апоптотичні та морфологічні зміни, які з'являються протягом 3–6 годин після їх культивування. F. Colleoni та співавт. [81] відзначають, що в результаті криоконсервування суттєво підвищується респіраторна активність мітохондрій у порівнянні зі зразками, доставленими в лабораторію «на льоді».

Для заморожування фрагментів плаценти найчастіше застосовують повільні швидкості чи комбіновані програми. Так, В.І. Грищенком та співавт. [30] було запропоновано спосіб криоконсервування тканин фетоплацентарного комплексу, в тому числі плаценти: біоматеріал охолоджували від кімнатної температури до 0°C, потім заморожували до -10°C зі швидкістю 5–6 град/хв та після 1–2 годин витримки за вказаної температури занурювали у рідкий азот. При цьому збереженість біооб'єктів становила близько 85%, показники активності лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази мало відрізнялися від контрольних. За результатами методів вітального забарвлення, визначення вмісту гормонів та морфологічними ознаками при криоконсервуванні тканини плаценти за двохетапною програмою під захистом ДМСО встановлено досить високу збереженість фрагментів плаценти [64]. В. Huppertz та співавт. [95], порівнявши результати заморожування експлантів плаценти шляхом занурення у рідкий азот із програмованим заморожуванням, висловили сумніви щодо необхідності застосування програмних заморожувачів, оскільки їх використання ускладнює процес криоконсервування. О.С. Прокопюк та співавт. [46, 47] вважають необхідним застосування ініціації кристалоутворення, яка підвищує збереженість фрагментів плацентарної тканини.

Високої збереженості трофобласта досягали при вітрифікації хоріальних структур під захистом гліцеролу та пропандіолу [97].

enzymes and DNA, but may be a potential mechanism of damage of terminal telomere DNA and telomere shortening, resulting in reduced proliferative properties of frozen-thawed cells. Change in telomere length and a damage of telomere proteins may also influence the gene expression, negatively affecting cell functions.

### **Cryopreservation of placental fragments**

Low temperature storage of placental fragments is performed with diagnostic purposes during chorionic biopsy and for postpartum placenta study [27], as well as for drug testing [60] and isolation of cells used either in experimental work or clinical practice [46, 52, 105, 121]. Placental fragments are most frequently stored under hypothermic conditions (4°C) and at liquid nitrogen temperature (-196°C) [25, 39, 55, 60].

Studying the effect of hypothermia on morphofunctional state of placental fragments revealed the possibility to store fresh and frozen-thawed fragments during 24 and 12 hrs, respectively, since the cells underwent the minimum damages during this time period [46]. Garrod A. *et al.* [39] showed that short-term (48 hrs) hypothermic storage of the placenta was applicable for certain types of research. Cirelli N. *et al.* [25] studied post hypothermic storage placental explants and revealed the rapid apoptotic and morphological changes, occurred within 3–6 hrs after culturing. Colleoni F. *et al.* [27] noted that cryopreservation resulted in a significant increase in respiratory activity of mitochondria, if compared to the samples delivered to laboratory 'on ice'.

Either slow rates or combined protocols are most often used to freeze placental fragments. In particular, Grishchenko V.I. *et al.* [56] proposed the following method to cryopreserve the tissues of fetoplacental complex, including the placenta: biological specimen to cool from room temperature down to 0°C, then freeze down to -10°C with 5–6 deg/min rate and after 1–2 hrs exposure at the mentioned temperature to immerse into liquid nitrogen. Here, the survival of biological objects made about 85%, the indices of lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were slightly different from the control ones. According to the results of vital staining, determination of hormone content and morphological features following placental tissue cryopreservation with two-step program under DMSO protection quite a high integrity of placental fragments was established [148]. Huppertz B. *et al.* [60] compared the results of placental explant freezing via immersion into liquid nitrogen using the programmed freezing and doubted the need to apply programmed freezers, because of complicated cryopreservation procedure. Prokopyuk O.S. *et al.* [102, 104] considered the initiation of





Досліджено можливість кріоконсервування елементів трофобласта в кріозахисних середовищах, які містили гліцерол, сахарозу, 1,2-пропандіол, ГЕК [7, 40, 95]. Показано, що максимальне насичення тканини плаценти кріопротекторами відбувається впродовж 20 хв за температури близько 4°C [7]. Для низькотемпературного консервування оптимальним кріопротектором дослідники вважають 8%-й розчин ДМСО [40]. В.І. Грищенко та співавт. [30] застосовували також розчини ДМСО та ПЕО в концентрації 10%. В. Huppertz та співавт. [95], порівнявши концентрації ДМСО, етиленгліколю, пропандіолу від 1 до 3 М, зробили висновок, що ефективною є концентрація ДМСО 3 М. Запропоновано також метод кріоконсервування хоріальної тканини після 20-хвилинної експозиції за -20°C у розчині, який містить 5% ДМСО та 5% ПЕО, і подальшому зануренні у рідкий азот [31]. При цьому зберігалось 85% життєздатних клітин, вміст пікнотичних ядер у клітинах хоріальної тканини не перевищував 25%. Для зменшення токсичності кріозахисних середовищ, підвищення збереженості фрагментів плаценти та можливості застосування препаратів у клінічній практиці було запропоновано використовувати плазмозамісні розчини з кріозахисними властивостями [40]. Найбільшої морфофункціональної збереженості тканини плаценти та окремих її клітин було досягнуто при використанні кріозахисного середовища, яке містило 5% ДМСО та 5% ГЕК. Крім того визнано, що можливе кріоконсервування при застосуванні лише гідроксиетил-крохмалю або комбінації 5% ДМСО з 6,8% сахарози. Розчини полівінілпіролідону, сорбітолу та декстрану не забезпечували збереженості та цілісності тканини плаценти [47]. За даними вищезгаданих дослідників розморожування кріоконсервованих фрагментів плаценти здійснювалося на водяній бані за температури 40...42°C.

Для оцінки збереженості тканини плаценти після розморожування в залежності від мети дослідження застосовують різноманітні методи: гістологічні; електронно-мікроскопічні; забарвлення трипановим синім та нейтральним червоним; МТТ- та резазуриновий тести; виділення патологічного протеїну P13; визначення активності лактатдегідрогенази, лужної фосфатази та рівню глюкози в середовищі культивування; визначення активності окремих генів, а також генетичної стабільності та активності мітохондрій [81, 95, 120]. Найтипівішими змінами при кріоконсервуванні є відшарування та розриви трофобласта, розриви мезенхіми, загибель клітин, апоптотичні зміни [95, 120].

Окрема увага приділяється збереженню тканини плаценти для подальшого виділення клітин. Х.М. Ю та співавт. [148] оцінювали кількість виділених жит-

crystal formation as essential procedure, increasing the integrity of placental tissue fragments.

High integrity of trophoblast was reached during vitrification of chorionic structures under glycerol and propanediol protection [62].

The possibility to cryopreserve trophoblast elements in cryoprotective media, containing glycerol, sucrose, 1,2-propanediol, HES was studied [15, 46, 60]. The maximum saturation of placental tissue with cryoprotectants was shown to occur within 20 min at temperature of about 4°C [15]. Researchers believed 8% DMSO solution to be the optimal cryoprotectant for low temperature preservation [46]. Grischenko V.I. *et al.* [56] also used 10% DMSO and PEO solutions. Huppertz B. *et al.* [60] compared the concentrations of DMSO, ethylene glycol, propanediol from 1 to 3 M, and concluded the 3 M DMSO concentration to be efficient one. There was also proposed the cryopreservation method for chorionic tissue after 20 min exposure at -20°C in the solution, containing 5% DMSO and 5% PEO, and further immersion into liquid nitrogen [52]. In this case 85% of viable cells were preserved, the content of pyknotic nuclei in cells of chorionic tissue did not exceed 25%. To reduce the toxicity of cryoprotective media, and improve the preservation of placental fragments and the possibility of using preparations in clinical practice there has been proposed to apply the plasm substitute solutions with cryoprotective properties [46]. The highest morphofunctional integrity of placental tissue and its individual cells was achieved when using the cryoprotective medium, containing 5% DMSO and 5% HES. In addition the cryopreservation with using only hydroxyethyl starch or a combination of 5% DMSO with 6.8% sucrose was recognized as possible one. Solutions of polyvinylpyrrolidone, sorbitol and dextran did not ensure the survival and integrity of placental tissue [102]. According to the reported data of the mentioned above researchers the cryopreserved placental fragments were thawed in a water bath at 40...42°C.

To assess placental tissue integrity after thawing depending on the research purpose one uses various methods such as histological, electron microscopic, staining with trypan blue and neutral red; MTT- and resazurin tests; isolation of pathological protein P13; determination of activity of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and glucose level in culture medium; determination of activity of single genes, as well as genetic stability and activity of mitochondria [27, 60, 106]. The most typical changes in cryopreservation are the detachment and ruptures of trophoblast, breaks of mesenchyme, cell death, and apoptotic changes [60, 106].

Special attention is paid to storage of placental tissue for further cell isolation. Yu X. M. *et al.* [147] evaluated



тездатних клітин із тканини плаценти та пуповини до та після кріоконсервування з різними концентраціями ДМСО. Продемонстровано, що з нативного матеріалу виділяється близько 67% життєздатних клітин, а з кріоконсервованого в 10%-му розчині ДМСО – 55%. Кількість життєздатних клітин, виділених із кріоконсервованого біоматеріалу, залежить від концентрації кріопротектора. M. Sommer та співавт. [130] порівнювали популяції клітин, які були виділені з нативного та кріоконсервованого біопсійного матеріалу плаценти людини. Показано, що культури клітин із нативного та кріоконсервованого матеріалу не відрізняються за типом та культуральними властивостями; популяції мезенхімальних стовбурових клітин, виділених із кріоконсервованих хоріальних ворсин, зберігають генетичну стабільність протягом 10-ти пасажів культивування, популяції анеуплоїдних клітин з'являються не раніше 14-го пасажу [126].

Крім того, заморожування тканини плаценти проводять для подальшого виділення з неї екстрактів або вивчення її механічних властивостей. Доведено, що зберігання тканини плаценти при  $-196^{\circ}\text{C}$  приводить до збільшення відносного вмісту високомолекулярних білків в екстрактах, а при  $-20^{\circ}\text{C}$  – відносного вмісту білків із молекулярною масою менше 80 кДа [42]. Показано, що тижневе низькотемпературне зберігання плаценти не впливає на її механічні характеристики [101].

### **Кріоконсервування плодових оболонок, пуповини**

На початку ХХ століття плодові оболонки (амніотична та хоріальна) застосовували в медицині для лікування ушкоджень та дегенеративних змін рогівки ока, опіків, трофічних виразок [65, 66, 99]. Визначено, що плодові оболонки мають регенеративні, протизапальні, антифіброзні та антибактеріальні властивості [83, 108, 124]. Їх «імунологічна привілейованість» [104] зберігається при кріоконсервуванні [110, 12]. Цей факт є підґрунтям для створення низькотемпературних банків плодових оболонок [122]. Амніотичну оболонку також застосовують як основу для культивування інших типів клітин для трансплантації [113].

Плодові оболонки використовують як пластичний матеріал, їх зберігають не тільки за допомогою кріоконсервування і в умовах короткочасної гіпотермії, а й методом ліофілізації [114]. Показано, що всі методи мають свої переваги та недоліки. Так, кріоконсервування дозволяє зберегти життєздатність та цілісність тканини, а ліофілізація спрощує транспортування. Ряд досліджень доводять, що ліофілізація дозволяє зберегти структуру та біологічні властивості амніотичної оболонки [66, 88].

a number of viable cells isolated from placental and umbilical cord tissue prior to and after cryopreservation with different DMSO concentrations. There was demonstrated the fact, that 67% of viable cells was isolated from fresh sample and 55% was derived from the tissue cryopreserved with 10% DMSO solution. A number of viable cells isolated from cryopreserved biomaterial depended on cryoprotectant concentration. Sommer M. *et al.* [124] compared the cell populations, isolated from native and cryopreserved human placental biopsy material. Cell cultures from fresh and cryopreserved specimens showed no differences by type and cultural properties; the populations of mesenchymal stem cells isolated from cryopreserved chorionic villi, preserved their genetic stability during 10 culturing passages, the populations of aneuploid cells did not appear until the passage 14 [114].

Moreover, the placental tissue is frozen either for further procurement of extracts from it or study of its mechanical properties. The storage of placental tissue at  $-196^{\circ}\text{C}$  was proved to result in an increased relative content of high molecular proteins in the extracts and the procedure at  $-20^{\circ}\text{C}$  led to an elevated relative content of proteins with molecular weight below 80 kDa [95]. One week of low temperature storage of placenta was demonstrated as not affecting its mechanical characteristics [68].

### **Cryopreservation of fetal membranes, umbilical cord**

In the early 20th century the fetal membranes (amniotic and chorionic ones) were used in medicine to treat injuries and degenerative changes in the cornea, burns, trophic ulcers [3, 4, 65]. Fetal membranes were found to have regenerative, anti-inflammatory, anti-fibrous and antibacterial properties [29, 79, 112]. Their 'immunologic privilege' [72] was preserved during cryopreservation [81, 112], that was the basis for establishing low temperature banks of fetal membranes [110]. Amniotic membrane was also used as the basis for culturing of other cell types for transplantation [89].

Fetal membranes are used as a plastic material, stored not only by means of cryopreservation and short-term hypothermia, but using freeze-drying as well [90]. All the methods were shown to have their *pro* and *contra*. In particular, cryopreservation allows preserving viability and integrity of tissue, but freeze-drying simplifies transportation. As proved by numerous studies, freeze-drying enables to preserve the structure and biological properties of amniotic membrane [4, 39]. By the content of biologically active substances and clinical efficiency the cryopreserved amniotic membrane is a promising biomaterial for use in ophthalmology [131].



За вмістом біологічно активних речовин та клінічною ефективністю кріоконсервована амніотична оболонка є найбільш перспективним біоматеріалом для застосування в офтальмології [137].

F.A. Tehrani та співавт. [134] показали, що антибактеріальні властивості амніотичної оболонки не залежать від способу кріоконсервування або ліофілізації та пов'язані не з клітинами, а з компонентами сполучної тканини. В. Werber та співавт. [143] довели можливість застосування амніотичної рідини для лікування хронічних виразок, а М. Kang та співавт. [98] використовували для цього екстракт ліофілізованої амніотичної оболонки.

Кріоконсервування амніотичної оболонки проводять за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  із додаванням 50%-го розчину гліцеролу, рідше ДМСО [65, 105, 108, 137]. С.Л. Allen та співавт. [66] продемонстрували підвищення збереженості амніотичної оболонки після кріоконсервування та ліофілізації з застосуванням експозиції у розчинах цукрів. Н. Thomasen і співавт. [137] показали, що довгострокове зберігання амніотичної оболонки не впливає на її цілісність, стерильність, вміст біологічно активних речовин, а також на розподіл колагенів та ламіліну. Продемонстрована збереженість мікроструктури клітин та сполучнотканинних компонентів хоріальної оболонки при кріоконсервуванні під захистом ДМСО [49]. До найбільш суттєвих кріоушкоджень плодових оболонок під час кріоконсервування відносять розшарування, десквамацію та загибель клітин, апоптотичні зміни, втрату механічних та оптичних властивостей [120].

Відомо, що пуповина є джерелом стовбурових клітин [133]. У публікаціях, в яких розглядається проблема кріоконсервування тканини пуповини, доведено, що структуру та життєздатність її клітин можливо зберегти під захистом ДМСО [47, 82, 109, 120].

## Висновки

Плацента є унікальним джерелом стовбурових клітин, амніотичної та хоріальної оболонок, кордової крові та сироватки, екстрактів біологічно активних речовин. Ці біооб'єкти, по-перше, характеризуються високим біологічним потенціалом, по-друге, мають перевагу щодо донації матеріалу та етичних питань. На сьогоднішній день низькотемпературне зберігання застосовується для всіх компонентів плаценти та кордової крові: ворсинчастої тканини, оболонок, пуповини, сироватки та клітин кордової крові, амніотичної рідини. Плацентарні біооб'єкти зберігаються з діагностичною, експериментальною та терапевтичною цілями. Режимми їх низькотемпературного зберігання та методики кріоконсервування залежать від особливостей біооб'єктів та мети, з якою вони зберігаються. Так, при кріоконсерву-

Tehrani F.A. *et al.* [128] showed that antibacterial properties of amniotic membrane did not depend on the method of cryopreservation or freeze-drying and were associated not with cells, but the components of connective tissue. Werber B. *et al.* [142] proved the possibility to apply amniotic fluid for the therapy of chronic ulcers, and Kang M. *et al.* [63] used for this purpose the extract of frozen-dried amniotic membrane.

Amniotic membrane is cryopreserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  with 50% solution of glycerol, or more rarely DMSO [3, 73, 79, 131]. Allen C.L. *et al.* [4] demonstrated an increase in amniotic membrane survival rate after cryopreservation and freeze-drying following exposure in solutions of sugars. Thomasen H. *et al.* [131] showed a long-term storage of amniotic membrane as not affecting its integrity, sterility, content of biologically active substances, as well as distribution of collagen and lamellin. The integrity of cell microstructure and connective tissue components of chorionic membrane during cryopreservation under DMSO protection was demonstrated [115]. The most significant cryodamages of fetal membranes during cryopreservation included exfoliation, cell desquamation and death, apoptotic changes, loss of mechanical and optical properties [106].

The umbilical cord is known to be the source of stem cells [127]. The reports considering the umbilical cord tissue cryopreservation, indicated the possibility to preserve the structure and viability of cells under DMSO protection [28, 80, 102, 106].

## Conclusions

The placenta is the unique and promising source of stem cells, amniotic and chorionic membranes, cord blood and serum, extracts of biologically active substances. First, these biological objects are characterised with a high biological potential, secondly they have advantage as for material donation and ethical questions. Today the low temperature storage is used for all placental and cord blood components: villous tissue, membranes, umbilical cord, cord blood cells and serum, amniotic fluid. Placental biological derivatives are stored for diagnostic, experimental and therapeutic purposes. Regimens of their low temperature storage and cryopreservation techniques depend on the peculiarities of biological objects and the purpose for which they are stored. In particular, when cryopreserving fetal membranes for ophthalmic practice of importance is the material devitalization, during storage of either serum or amniotic fluid one tends to preserve the protein composition, for cell suspensions the viability and absence of apoptotic and genetic changes in cells are important, and when cryopreserving the tissue the preservation of not only cells, but cell-to-cell interactions as well is vital. The most studied and versatile





ванні фетальних оболонок для офтальмологічної практики важливою є девіталізація матеріалу, при зберіганні сироватки або амніотичної рідини прагнуть до збереження білкового складу, для клітинних суспензій важливі життєздатність та відсутність апоптотичних і генетичних змін клітин, а при кріоконсервуванні тканини – збереженість не тільки клітин, а й міжклітинних зв'язків. Найбільш дослідженими та різноманітними є методи консервування та низькотемпературного зберігання плодкових оболонок, які застосовуються в офтальмологічній та хірургічній практиці, а також методи кріоконсервування стовбурових клітин плаценти та кордової крові.

Наявність кріоушкоджень або порушень біоб'єктів після кріоконсервування свідчить про потребу подальшого вдосконалення існуючих методів низькотемпературного зберігання. Перспективною є розробка методів кріоконсервування тканини та експлантів плаценти для їх подальшого застосування з науковою та діагностичною метою, а також для виділення клітин та персонального зберігання. Окремий напрямок досліджень – кріоконсервування біоматеріалу згідно з принципами належної лабораторної та медичної практики, яка вимагає підвищених стандартів стерильності та застосування дозволених хімічних субстанцій.

### Література

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопозитических стволовых клеток из пуповинной крови // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46. – С. 513–520.
2. Абдулкадыров К.М. и др. Плацентарная кровь: альтернативный источник кроветворных стволовых клеток для трансплантаций. Создание банков пуповинной крови // Терапевтический архив. – 2001. – Т. 73, №7. – С. 76–78.
3. Астрелина Т.А., Гомзяков А.Е., Кобзева И.В. и др. Оценка качества и безопасности применения кріоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике // Клеточная трансплантация и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, №4. – С. 82–87.
4. Бабийчук Л.А., Грищенко В.И., Зубов П.М. и др. Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядродержащих клеток пуповинной крови после кріоконсервирования // Клеточная трансплантация и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 77–81.
5. Бабийчук Л.А., Зубов П.М., Михайлова О.А., Рязанцев В.В. Оценка стадий апоптоза ядродержащих клеток кордовой крови до и после кріоконсервирования // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, №3, Ч. 2 (59). – С. 22–25.
6. Берегова Ю.П. Порівняльний вплив Кріокорду-С і БІОТРИТУ в профілактиці патології органів репродуктивної системи // Трансплантологія. – 2003. – №4. – С. 53–54.
7. Боброва Е.Н., Зинченко А.В., Щетинский М.И. Динамика насыщения ткани плаценты диметилсульфоксидом // Проблемы криобиологии. – 2005. – №1. – С. 20–26.

are the methods of preservation and low temperature storage of fetal membranes, used in ophthalmic and surgical practice, as well as those of cryopreservation for placental and cord blood stem cells.

The presence of either cryodamages or disorders in biological objects after cryopreservation testifies to the need for further improvement of existing methods of low temperature storage. Very promising is the development of the methods for cryopreservation of placental tissues and explants for their further application with scientific and diagnostic purposes, as well as for cell isolation and autobanking. A particular research direction is the cryopreservation of biological material according to the good laboratory and medical practice, requiring high standards of sterility and use of authorized chemicals.

### References

1. Abdulkadyrov K.M., Romanenko N.A., Starkov N.N. Procurement and clinical application of peripheral hematopoietic stem cells from cord blood. *Problems in Oncology* 2000; 46: 513–520.
2. Abdulkadyrov K.M. et al. Placental blood: alternative source of hematopoietic stem cells for transplantations. Establishing banks for cord blood. *Terapevticheskii arkhiv* 2001; 73(7): 76–78.
3. Adds P.J., Hunt C.J. Dart J.K. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(8): 905–907.
4. Allen C.L., Clare G., Stewart E.A. et al. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing. *PLoS One* 2013; 8(10): e78441.
5. Armson B.A. Umbilical cord blood banking: implications for perinatal care providers. *J Obstet Gynaecol Can* 2005; 27(7): 673.
6. Aschner B. Ueber die Function der Hypophyse. *Pflug Arch Gest Physiol* 1912; 146: 1–147.
7. Astrelina T.A., Gomzyakov A.E., Kobzeva I.V. et al. Assessment of quality and safety of application of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal placental cells in clinical practice. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering* 2013; 8(4): 82–87.
8. Babijchuk L.O., Grischenko V.I., Gurina T.M. et al., inventors. Cryopreservation way for cord blood nucleated cells, including hemopoietic stem cells. Patent of Ukraine N 92227; IPC A 01 N 1/02. 2010 Oct 11.
9. Babijchuk L.A., Grischenko V.I., Ryazantsev V.V. et al., inventors. Way of isolation of cord blood nucleated cells. Patent of Ukraine N23499; IPC C 12 N 5/00. 2007 May 25.
10. Babijchuk L.A., Grischenko V.I., Zubov P.M. et al. Structural and functional state and viability of cord blood nucleated cells after cryopreservation. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering* 2010; 5(4): 77–81.
11. Babijchuk L.A., Zubov P.M., Mikhailova O.A., Ryazantsev V.V. Assessment of apoptosis stages of cord blood nucleated cells prior to and after cryopreservation. *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik* 2012; 15(3 Pt2) (59): 22–25.
12. Ballen K.K., Barker J.N., Stewart S.K., Greene M.F., Lane T.A. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14(6): 724–725.
13. Berasturis Cabrera L. Local treatment of burns with placental extracts; technic of application of placental extract prepared by Filatov's method in burns, original technic. *Arch Med Infant* 1954; 23(2): 123–144.



8. Введенский Б.П., Ковалев Г.А., Тыныныка Л.Н. и др. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови при лечении деструктивно-дистрофических процессов в суставах // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, №1. – С. 41–43.
9. Гольцев А.Н., Калинин Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть I. Характеристика гемопоэтического потенциала // Проблемы криобиологии. – 1998. – №1. – С. 3–24.
10. Гольцев А.Н. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть II. Иммунологическая характеристика // Проблемы криобиологии. – 1998. – №2. – С. 3–21.
11. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. и др. Терапевтический потенциал ПФПК. Лечение аутоиммунного артрита // Імунологія та алергологія. – 2003. – №1. – С. 21–22.
12. Гольцев А.Н., Волина В.В., Останков М.В. и др. Влияние криоконсервирования на функциональные свойства ядродержащих клеток кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №1. – С. 66–72.
13. Грищенко В.И., Прокопюк О.С. Перспективы и возможности использования плацентарной крови // Медицинские вести. – 1997. – Т. 4. – С. 26–27.
14. Грищенко В. І., Кузьміна І. Ю., Юрченко Т. М. та ін. Заготівля, криоконсервування плацентарної тканини та її клінічне застосування: Метод. рекомендації. – Харків, 1996. – 15 с.
15. Грищенко В.І., Ліпіна О.В., Прокопюк О.С., Савченко Ю.А. Заготівля, криоконсервування сироватки і плазми кордової крові та їх клінічне застосування: Метод. рекомендації. – Харків, 2000. – 12 с.
16. Грищенко В.І., Морозова Т.Ф., Воротілін О.М. та ін. Приготування та зберігання криоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання: Метод. рекомендації. – Харків, 1997. – 18 с.
17. Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Волкова Н.О., Перчик О.А. Влияние различных режимов низкотемпературного хранения на содержание гормонов в криозкстракте плаценты // Проблемы криобиологии. – 2004. – №4. – С. 8–11.
18. Егоров В.В., Иванов А.А., Пальцев М.А. Стволовые клетки человека // Молекулярная медицина. – 2003. – №2. – С. 3–14.
19. Карпова Н.С., Абдулкадыров К.М., Селиванов Е.А., Балашова В.А. Изучение длины теломер и колониеобразующей способности гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови при криоконсервировании // Клеточная трансплантология. – 2011. – Т. 6, №4. – С. 42–47.
20. Костяев А.А. Низкотемпературное консервирование гемопоэтических стволовых клеток при  $-80^{\circ}\text{C}$  в режиме быстрого двухступенчатого замораживания (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – СПб, 2003. – 35 с.
21. Липина О.В., Савченко Ю.А., Мусатова И.Б. Низкотемпературное консервирование плазмы кордовой крови // Биотрансплантология на пороге XXI века: Сб. тез. симпозиума по проблеме тканевых банков с международным участием. – Самара, 2001. – С. 22–23.
22. Ліпіна О.В., Трифонов В.Ю., Прокопюк О.С., Мусатова І.Б. Препарат сироватки кордової крові людини: клінічне застосування // Світ медицини та біології. – 2009. – №4. – С. 38–41.
23. Ліпіна О.В., Шідловський В.О., Дейкало І.М. та ін. Імунокоригуюча терапія в комплексному лікуванні хворих на важку гнійну патологію в хірургії // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №1. – С. 79–84.
24. Мошко Ю.А. Криоконсервирование сыворотки кордовой крови, определение ее биологической активности и клинической эффективности в терапии хронических сальпингоофоритов: Дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 2003. – 161 с.
25. Нардід О.А. Внутрішньо- і міжмолекулярні взаємодії та їх роль в кріопшкодженні та кріозахисті біологічних структур.
14. Beregova Yu.P. Comparative effect of Cryocord-C and Biotrit in preventing pathology of organs of reproductive system. *Transplantologiya* 2003; (4): 53–54.
15. Bobrova E.N., Zinchenko A.V., Schetinsky M.I. Dynamics of placenta tissue saturation with dimethyl sulfoxide. *Problems of Cryobiology* 2005; (1): 20–26.
16. Boros B., Mehes G., Arato M. Biologic properties of Filatow's placental extract. *Klin Monbl Augenheilkd Augenarztl Fortbild* 195; 118(3): 308–315.
17. Bosse R., Singhofer-Wowra M., Rosenthal F., et al. Good manufacturing practice production of human stem cells for somatic cell and gene therapy. *Stem Cells* 1997; 15: 275–280.
18. Brooke G., Rossetti T., Pelekanos R. et al. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Br J Haematol* 2009; 144(4): 571–579.
19. Brown J.A., Boussiotis V.A. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol* 2008; 127(3): 286–297.
20. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem / progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828–3832.
21. Burgos H., Herd A., Bennett J.P. Placental angiogenic and growth factors in the treatment of chronic varicose ulcers: preliminary communication. *J Royal Soc Med* 1989; 82(10): 598.
22. Calvarano G., De Polis F., Sabatini G. Treatment with placental extract in periodontal disease. *Dent Cadmos* 1989; 57(1): 85–86.
23. Chang B.S., Kendrick B.S., Carpenter J.F. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci* 1996; 85(12): 1325–1330.
24. Chizhevsky V.V., Prokopyuk O.S., Groshevoj M.I. et al. Low temperature bank of biological objects: scientific and methodical grounds and perspectives of development. In: Goltsev A.N., editor. *Current Problems in Cryobiology and Cryomedicine*. Kharkov; 2012, p. 469–486.
25. Cirelli N., Lebrun P., Gueuning C. et al. Secretory characteristics and viability of human term placental tissue after overnight cold preservation. *Hum Reprod* 2000; 15(4): 756–761.
26. Cole F.R. Placental blood and placental extract in wound healing. *Am J Surg* 1948; 76(1): 38–43.
27. Colleoni F., Morash A.J., Ashmore T. et al. Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory analysis. *Placenta* 2012; 33(2): 122–123.
28. Cooke M., Tan E.K., Mandrycky C. et al. Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane/chorion tissue. *J Wound Care* 2014; 23(10): 465–476.
29. De Seze S., Durieu J., Carlier J.C. Tissue therapy of rheumatism (amniotic implantations and injections of placental extracts); results of our preliminary experiments. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1953; 69(5–6): 152–156.
30. Donaldson C., Armitage W.G., Denning-Kendall P. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18(4): 725–731.
31. Egorov V.V., Ivanov A.A., Paltsev M.A. Human stem cells. *Molekularnaya Meditsina* 2003; (2): 3–14.
32. Falko O.V., Lipina O.V., Volina V.V. et al. About correction of disorders of endothelial aortic layer in experimental atherosclerosis using cryopreserved serum of placental blood. *Bulletin of Urgent and Recovery Medicine* 2012; 13 (1): 122–126.
33. Falko O.V., Prokopyuk O.S., Rozanova E.D. et al. Effect of freezing regimens and terms of low temperature storage on the integrity of proteins of placental blood serum. *Proceedings of the international scientific and practical conference: Practice-oriented biotechnological studies in plant research, cattle breeding and medicine*; Brest, Belarus; 2013, p. 120–123.
34. Fal'ko O.V., Zemlianskikh N.G., Lipina O.V. et al. Modification of placenta blood serum proteins under low temperature effect. *Biomed Khim* 2013; 59(2): 219–234.



- тур: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. – Харків, 2012. – 42 с.
26. Нардид О.А. Влияние низких температур на белковые системы // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 83–101.
  27. Нардид Э.О. Биологическая активность криоконсервированной сыворотки кордовой крови в экспериментальной модели постгистерэктомического синдрома: Дис... канд. мед. наук. – Харьков, 2010. – 133 с.
  28. Нардид Э.О., Розанова Е.Д., Цымбал Л.В. и др. Состояние белков сыворотки кордовой крови после замораживания // Биофизика. – 2009. – Т. 54. – Вып. 5. – С. 881–886.
  29. Пат. № 31175 Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування суспензії клітин плаценти / А.М. Гольцев, В.І. Грищенко, Т.М. Гурина, І.В. Рассоха; заявник і патентовласник ІПКіК НАН України – № U 2007 14177; заявл. 17.12.2007; опубл. 25.03.2008, Бюл. №6.
  30. Пат. № 30808, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб консервування тканин фетоплацентарного комплексу / В.І. Грищенко, Т.М. Юрченко, О.С. Прокопюк та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № 98062927; заявл. 05.06.1998; опубл. 15.12.200, Бюл. №7.
  31. Пат. № 67588, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування хоріальної тканини / В.І. Грищенко, В.Ю. Прокопюк В.В. Чижевський та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № 2003109777; заявл. 31.10.03; опубл. 15.06.2004, Бюл. №6.
  32. Пат. № 79009, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування тканини плаценти / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № U 201210931; заявл. 19.09.2012; опубл. 10.04.2013, Бюл. №7.
  33. Пат. №31847А, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк та ін.; заявл. 05.11.98.; опубл. 15.12.2000, Бюл. №7.
  34. Пат. №58223А, Україна, МПК7 А 61 К 35/50. Спосіб одержання трансплантатів плодкових оболонок / В.І. Грищенко, В.І. Строна, Т.М. Юрченко та ін.; опубл. 15.07.03, Бюл. №7.
  35. Пат. №92227, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гурина та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – №200814009; заявл. 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл. №19.
  36. Пат. №23499, Україна, МПК С 12 N 5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові / Л.А. Бабійчук, В.І. Грищенко, В.В. Рязанцев та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № 200700585; заявл. 22.01.07; опубл. 25.05.07, Бюл. №7.
  37. Пат. №7937, Україна, МПК7 А 61 К 35/16 А 61 В 17/00. Спосіб лікування цукрового діабету, ускладненого діабетичною мікроангіопатією / Я.О. Попович, А.Г. Шевчук, О.С. Прокопюк та ін.; заявлено 20.12.04.; опубл. 15.07.05, Бюл. №7.
  38. Перчик О.А., Волина В.В. Влияние препаратов плаценты на морфофункциональное состояние органов и тканей старых крыс // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №3. – С. 341–347.
  39. Питько В.А., Розанова К.Д., Погожих Д.М. та ін. Вплив температурного режиму зберігання тканини плаценти на властивості одержаних з неї водно-солевих екстрактів // Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. – 2006. – С. 585–587.
  40. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение / Под. ред. А.Н. Гольцева, Т.Н. Юрченко. – Харьков, 2012. – 318 с.
  41. Fellner O.O. Experimentelle untersuchungen uber die wirkung von gewebsextrakten aus der plazenta und den weiblichen sexualorganen auf das genital. Arch Gynakol 1913; 100: 641.
  42. Filatov V.P. Tissue therapy. Kyiv: Publishing House of Academy of Sciences of UkrSSR; 1949.
  43. Gabellieri E. ANS fluorescence detects widespread perturbations of protein tertiary structure in ice. Biophys J 2006; 90(9): 3239–3245.
  44. Gao J., Liu L., Liu W. et al. Study of process optimization on freeze drying of human amniotic membrane. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 2012; 29(4): 705–709.
  45. Garrod A., Batra G., Ptacek I. et al. Duration and method of tissue storage alters placental morphology – implications for clinical and research practice. Placenta 2013; 34(11): 1116–1119.
  46. Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al. Clinical applications of stem cells transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking. Fetal Liver Transplantation 1992; Suppl: 114–117.
  47. Goltsev A.N. Human umbilical cord blood as the source of hematopoietic cells for clinical application. Part II. Immunological characteristics. Problems of Cryobiology 1998; (2): 3–21.
  48. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Ostankova L.V. et al. Therapeutic potential of products of fetoplacental complex. Therapy of autoimmune arthritis. Immunologiya ta Alergologiya: Nauka i Praktyka 2003; (1): 21–22.
  49. Goltsev A.M., Grischenko V.I., Gurina T.M., Rassokha I.V., inventors. Way of cryopreservation for placental cell suspension. Patent of Ukraine N 31175; IPC A 01 N 1/02. 2008 Mar. 5.
  50. Goltsev A.N., Kalinichenko T.A. Human umbilical cord blood as the source of hematopoietic cells for clinical application. Part I. Characteristics of hematopoietic potential. Problems of Cryobiology 1998; (1): 3–24.
  51. Goltsev A.N., Volina V.V., Ostankov M.V. et al. Effect of cryopreservation on functional properties of nucleated cells of human cord blood. Problems of Cryobiology 2010; 20 (1): 66–72.
  52. Goltsev A.N., Yurchenko T.N., editors. Placenta: cryopreservation, clinical application. Kharkov; 2012.
  53. Graca G., Duarte I.F., Goodfellow B.J. et al. Potential of NMR spectroscopy for the study of human amniotic fluid. Anal Chem 2007; 79(21): 8367–8375.
  54. Grischenko V.I., Kuzmina I.Yu., Yurchenko T.M. et al. Procurement, cryopreservation of placental tissue and its clinical application [methodical recommendations]. Kharkov; 1996.
  55. Grischenko V.I., Lipina O.V., Prokopyuk O.S., Savchenko Yu.A. Procurement, cryopreservation of cord blood serum and plasm and their clinical application [methodical recommendations]. Kharkov; 2000.
  56. Grischenko V.I., Morozova T.F., Vorotilin O.M. et al. Preparation and storage of cryopreserved suspension of placenta for clinical application [methodical recommendations]. Kharkov; 1997.
  57. Grischenko V.I., Prokopyuk O.S. Perspectives and possibilities of placental blood application. Meditsinskie Vesti 1997; 4: 26–27.
  58. Grischenko V.I., Prokopyuk V.Yu., Chizhevsky V.V. et al., inventors. Cryopreservation way for chorionic tissue. Patent of Ukraine N 67588; IPC A 01 N 1/02. 2004 June15.
  59. Grischenko V.I., Prokopyuk O.S., Volkova N.O., Perchik O.A. Effect of different regimens of low temperature storage on the content of hormones in placental cryoextract. Problems of Cryobiology 2004; (4): 8–11.
  60. Grischenko V.I., Strona V.I., Yurchenko T.M., et al., inventors. Way for procurement of fetal membrane transplants. Patent of Ukraine N 58223A; IPC A 61 K 35/50. 2003 July15.
  61. Grischenko V.I., Yurchenko T.N., editors. Placenta: cryopreservation, structure, properties and perspectives of clinical application. Kharkov; 2011.
  62. Grischenko V.I., Yurchenko T.M., Prokopyuk O.S. et al., inventors. Cryopreservation way for tissues of fetoplacental complex. Patent of Ukraine N 30808; IPC A 01 N 1/02. 2000 Dec15.





41. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства и перспективы клинического применения / Под. ред. В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Харьков, 2011. – 292 с.
42. Погожих Д.М. Вплив низькотемпературного зберігання на властивості та біологічну активність екстрактів плаценти: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2009. – 22 с.
43. Погожих Д.Н., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №1. – С. 22–26.
44. Попович Я.О., Шевчук А.Г., Василюк М.Д. Препарати крио-плацентарного комплексу в корекції оксидантного стресу при хірургічному лікуванні хворих на синдром діабетичної стопи // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 224–227.
45. Прокопюк О.С. и др. Криоконсервированные эритроциты пуповинной крови – антианемическая гемотрансфузионная среда // Влияние охлаждения на биологические объекты: Сб. науч. тр. – Харьков, 1990. – С. 121–124.
46. Прокопюк О.С., Петренко А.Ю., Прокопюк В.Ю., Чижевский В.В. Криоконсервирование плаценты различной степени зрелости // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 220.
47. Прокопюк О.С. Криоконсервування плаценти та визначення механізмів її впливу на організм пацієнтів пізнього онтогенезу (експериментальне дослідження): Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Харків, 2014. – 37 с.
48. Рассоха И.В., Гольцев А.Н., Гурина Т.М. Влияние разных режимов криоконсервирования на способность суспензии плаценты проявлять иммунокорректирующую активность при лечении адьювантного артрита у мышей // Проблемы криобиологии. – 2004. – №1. – С. 21–29.
49. Роенок А.А., Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С. и др. Морфофункциональная характеристика криоконсервированной оболочки последа человека // Актуальные проблемы медицины: Сб. науч. тр. – Гомель, 2014. – Т. 2. – С. 238–241.
50. Розанова С.Л., Науменко Е.И., Розанова Е.Д. и др. Изменение антиоксидантных свойств экстрактов плаценты человека после замораживания // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 288–295.
51. Румянцев Г.Е. Тканевая терапия / Под. ред. А.Н. Гордиенко, П.Н. Снегирева. – Ростов-на-Дону: Ростиздат, 1951. – 182 с.
52. Смолянинов А.Б. Клеточная медицина: концепция ее развития // Клиническая патофизиология. – 2004. – №1. – С. 10–18.
53. Тканевая терапия / Под. ред. акад. АМН СССР Н.А. Пучковской. – К.: Здоров'я, 1975. – 208 с.
54. Трифонов В.Ю., Прокопюк В.Ю., Зайченко А.В. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 75–84.
55. Фалько О.В., Прокопюк О.С., Розанова Е.Д. и др. Влияние режимов замораживания и сроков низкотемпературного хранения на сохранность белков сыворотки плацентарной крови // Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве и медицине: Материалы междунар. науч.-практ. конф. – Брест, 2013. – С. 120–123.
56. Фалько О.В., Липина О.В., Волина В.В. и др. О коррекции нарушений эндотелиального слоя аорты при экспериментальном атеросклерозе с помощью криоконсервированной сыворотки плацентарной крови // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, №1. – С. 122–126.
57. Філатов В.П. Тканинна терапія. – К.: Вид-во АН УССР, 1949. – 37 с.
58. Харченко Н.С. Препараты плаценты и их клиническое применение // Акушерство и гинекология. – 1947. – №2. – С. 27–31.
59. Цуцаева А.О., Грищенко В.И., Кудкоцева О.В. та ін. Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування гемо-
57. Haller M.J., Wasserfall C.H., McGrail K.M. et al. Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 2041–2046.
58. Harris D.T. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev* 2008; 4(4): 269–274.
59. 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: 76–87.
60. Huppertz B., Kivity V., Sammar M. et al. Cryogenic and low temperature preservation of human placental villous explants. A new way to explore drugs in pregnancy disorders. *Placenta* 2011; 32: 65–76.
61. International Standards for Cord Blood Collection, Processing, Testing, Banking, Selection and release NetCord-FACT International Standards Third Edition 12/08/06; 1–85.
62. Isachenko V.V., Ostashko F.I., Grishchenko V.I. et al. Survival of trophoblastic fragments and vesicles after vitrification, ultrarapid freezing, and storage at 4 degrees C. *Cryobiology* 1993; 30(4): 432–437.
63. Kang M., Choi S., Cho Lee A.R. Effect of freeze dried bovine amniotic membrane extract on full thickness wound healing. *Arch Pharm Res* 2013; 36(4): 472–478.
64. Karpova N.S., Abdulkadyrova K.M., Selivanov E.A., Balashova V.A. Study of telomere length and colony-forming capability of cord blood hematopoietic stem cells during cryopreservation. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering* 2011; 6(4): 42–47.
65. Kesting M.R., Loeffelbein D.J., Steintraesser L. et al. Cryopreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats. *Ann Plast Surg* 2008; 60(6): 684–691.
66. Kharchenko N.S. Placental preparations and their clinical application. *Obstetrics and Gynecology* 1947; (2): 27–31.
67. Khuu H.M., Cowley H., David-Ocampo V. et al. Catastrophic failures of freezing bags for cellular therapy products: description, cause and consequences. *Cytotherapy* 2002; 4: 539–549.
68. Klinich K.D., Miller C.S., Hu J., et al. Effect of frozen storage on dynamic tensile properties of human placenta. *J Biomech Eng* 2012; 134(3): 034501.
69. Kocaomer A., Kern S., Kluter H. et al. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells* 2007; 25: 1270–1278.
70. Kogler G., Critser P., Trapp T., Yoder M. Future of cord blood for non-oncology uses. *Bone Marrow Transplantation* 2009; 44(10): 683–697.
71. Kostayev A.A. Low temperature preservation of hematopoietic stem cells at –80°C with the regimen of rapid two-step freezing (experimental study) [Author's abstract of dissertation]. St-Petersburg; 2003.
72. Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R. et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(7): 1539–1546.
73. Laurent R., Nallet A., Obert L. et al. Storage and qualification of viable intact human amniotic graft and technology transfer to a tissue bank. *Cell Tissue Bank* 2014; 15(2): 267–275.
74. Law L.W., Sahota D.S., Chan L.W. et al. Effect of long-term storage on placental growth factor and fms-like tyrosine kinase 1 measurements in samples from pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 12: 1475–1480.
75. Lipina O.V., Savchenko Yu.A., Musatova I.B. Low temperature preservation of cord blood plasm. In: *Bioimplantology on the threshold of XXI century. Proceedings of Symposium on Problem of Tissues Banks with International Participation*. Samara; 2001.
76. Lipina O.V., Shidlovsky V.O., Deikalo I.M. et al. Immunocorrecting therapy in a combined treatment of patients with severe purulent pathology. *Problems of Cryobiology* 2005; 15 (1): 79–84.



- поетичних клітин кордової крові людини: Метод. рекомендації. – Харків, 2000. – 16 с.
60. Цуцаева А.А., Грищенко В.И., Кудокоцева О.В. и др. Криоконсервирование гемопоэтических стволовых клеток из кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. – 2000. – №1. – С. 59–63.
  61. Чижевский В.В., Прокопюк О.С., Грошевой М.И. и др. Низкотемпературный банк биологических объектов: научно-методические основы и перспективы развития // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под. ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 469–486.
  62. Шаблий В., Кучма М., Кирик В. и др. Мезенхимальные и стромальные клетки из нативной и криоконсервированной плаценты человека: фенотип, мультипотентность и миграционный потенциал in vivo // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №2. – С. 157–160.
  63. Ширшев С.В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, №2. – С. 230–237.
  64. Юрченко Т.Н., Прокопюк О.С., Кузьмина И.Ю. и др. О возможности криоконсервирования плацентарной ткани // Тези І з'їзду Українського товариства криобіологів і криомедиків. – Харків, 1995. – С. 284–285.
  65. Adds P.J., Hunt C.J., Dart J.K. Amniotic membrane grafts, 'fresh' or frozen – a clinical and in vitro comparison // Br. J. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 85, №8. – P. 905–907.
  66. Allen C.L., Clare G., Stewart E.A. et al. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, Issue 10. – e78441.
  67. Armson B.A. Umbilical cord blood banking: implications for perinatal care providers // J. Obstet. Gynaecol. Can. – 2005. – Vol. 27, №7. – P. 673.
  68. Aschner B. Ueber die Function der Hypophyse // Pflug. Arch. Gest. Physiol. – 1912. – Vol. 146 – P. 1–147.
  69. Ballen K.K., Barker J.N., Stewart S.K., Greene M.F., Lane T.A. Collection and preservation of cord blood for personal use // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2008. – Vol. 14, №6. – P. 724–725.
  70. Berasturis Cabrera L. Local treatment of burns with placental extracts; technic of application of placental extract prepared by Filatov's method in burns, original technic // Arch. Med. Infant. – 1954. – Vol. 23, №2 – P. 123–144.
  71. Boros B., Mehes G., Arato M. Biologic properties of Filatov's placental extract // Klin. Monbl. Augenheilkd. Augenarztl. Fortbild. – 1951. – Vol. 118, №3 – P. 308–315.
  72. Bosse R., Singhofer-Wowra M., Rosenthal F. et al. Good manufacturing practice production of human stem cells for somatic cell and gene therapy // Stem Cells. – 1997. – Vol. 15. – P. 275–280.
  73. Brooke G., Rossetti T., Pelekanos R. et al. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials // Br. J. Haematol. – 2009. – Vol. 144, №4. – P. 571–579.
  74. Brown J.A., Boussiotis V.A. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution // Clin. Immunol. – 2008. – Vol. 127, №3. – P. 286–297.
  75. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem / progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 3828–3832.
  76. Burgos H., Herd A., Bennett J.P. Placental angiogenic and growth factors in the treatment of chronic varicose ulcers: preliminary communication // J. Royal Soc. Med. – 1989. – Vol. 82. – P. 598–599.
  77. Calvarano G., De Polis F., Sabatini G. Treatment with placental extract in periodontal disease // Dent. Cadmos. – 1989. – Vol. 57, №1 – P. 85–86.
  78. Chang B.S., Kendrick B.S., Carpenter J.F. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants // J. Pharm. Sci. – 1996. – Vol. 85, №12. – P. 1325–1330.
  79. Cirelli N., Lebrun P., Gueuning C. et al. Secretory characteristics and viability of human term placental tissue after overnight
  77. Lipina O.V., Trifonov V.Yu., Prokopyuk O.S., Musatova I.B. Human cord blood serum preparation: clinical application. World of Medicine and Biology 2009; (4): 38–41.
  78. Liseth K., Abrahamsen J.F., Bjorsvik S. et al. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. Cytotherapy 2005; 7: 328–333.
  79. Madhavan H.N., Priya K., Malathi J. Et al. Preparation of amniotic membrane for ocular surface reconstruction. Indian J Ophthalmol 2002; 50(3): 227–231.
  80. Martins J.P., Santos J.M., de Almeida J.M. et al. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data. Stem Cell Res Ther 2014; 5(1): 1–15.
  81. Micera A., Jirsova K., Normando E.M. et al. Molecular and biochemical expression of TLRs in human amniotic membrane: a comparative study of fresh and cryopreserved specimens. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2014; 252(2): 267–274.
  82. Moon J.H., Lee J.R., Jee B.C. et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. Human Reprod 2008; 23: 1760–1770.
  83. Moshko Yu.A. Cryopreservation of cord blood serum, determination of its biological activity and clinical efficiency in therapy of chronic salpingoophoritis [dissertation]. Kharkov; 2003.
  84. Nardid E.O. Biological activity of cryopreserved serum of cord blood in experimental model of post-hysterectomy syndrome [Dissertation]. Kharkov; 2010.
  85. Nardid E.O., Rozanova E.D., Tsymbal L.V. et al. State of proteins of cord blood serum after freezing. Biofizika 2009; 54 (5): 881–886.
  86. Nardid O.A. Intra- and intermolecular interactions and their role in cryodamage and cryoprotection of biological structures [Author's abstract of dissertation]. Kharkov; 2012.
  87. Nardid O.A. Low temperature effect on protein systems. Problems of Cryobiology 2014; 24 (2): 83–101.
  88. Newby D., Dalgliesh G.L., Aitken D.A. et al. Effect of cryopreservation on human cytotrophoblast cells in culture: hCG and PALP production. Placenta 2007; 28(4): 350–352.
  89. Niknejad H., Deihim T., Solati-Hashjin M. et al. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. Cryobiology 2011; 63(3): 145–151.
  90. Okabe M., Kitagawa K., Yoshida T et al. Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: physical, morphological properties, and safety as the new biological material. J Biomed Mater Res A 2014; 102(3): 862–870.
  91. Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop 'Placenta Derived Stem Cells'. Stem Cells 2008; 26(2): 300–311.
  92. Perchik O.A., Volina V.V. Effect of placental preparations on morphofunctional state of organs and tissues in old rats. Problems of Cryobiology 2006; 16 (3): 341–347.
  93. Pipino C., Shangaris P., Resca E. et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? Br Med Bull 2013; 105: 43–68.
  94. Pitko V.A., Rozanova K.D., Pogozhikh D.M. et al. Effect of temperature regimen of storage of placental tissue on properties of derived from it aqueous-saline extracts. Collection of scientific papers of association of obstetrician-gynaecologists of Ukraine 2006: 585–587.
  95. Pogozhikh D.M. Effect of low temperature storage on properties and biological activity of placental extracts [Author's abstract of dissertation]. Kharkov; 2009.
  96. Pogozhykh D., Prokopyuk V., Pogozhykh O. et al. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin. PLoS One 2015; 2(10): 1–15.
  97. Pogozhikh D.N., Rozanova E.D., Nardid O.A. Changes in properties of human placental aqueous-saline extracts during



- cold preservation // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15, №4. – P. 756–761.
80. Cole F.R. Placental blood and placental extract in wound healing // *Am. J. Surg.* – 1948, Jul. – Vol. 76, №1. – P. 38–43.
  81. Colleoni F., Morash A.J., Ashmore T. et al. Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory analysis // *Placenta.* – 2012. – Vol. 33, №2. – P. 122–123.
  82. Cooke M., Tan E.K., Mandrycky C. et al. Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane / chorion tissue // *J. Wound Care.* – 2014. – Vol. 23, №10. – P. 465–476.
  83. De Seze S., Durieu J., Carlier J.C. Tissular therapy of rheumatism (amniotic implantations and injections of placental extracts); results of our preliminary experiments // *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris.* – 1953. – Vol. 69, №5–6. – P. 152–156.
  84. Donaldson C., Armitage W.G., Denning-Kenndall P. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // *Bone Marrow Transplant.* – 1996. – Vol. 18, №4. – P. 725–731.
  85. Fal'ko O.V., Zemlianskikh N.G., Lipina O.V. et al. Modification of placenta blood serum proteins under low temperature effect // *Biomed Khim.* 2013. – Vol. 59, №2. – P. 219–234.
  86. Fellner O.O. Experimentelle Untersuchungen ueber die Wirkung von Gewebsextrakten aus der Plazenta und den Weiblichen Sexualorganen auf das Genital // *Arch. Gynakol.* – 1913, Vol. 100. – P. 641.
  87. Gabellieri E. ANS Fluorescence detects widespread perturbations of protein tertiary structure in ice // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90, №9. – P. 3239–3245.
  88. Gao J., Liu L., Liu W. et al. Study of process optimization on freeze drying of human amniotic membrane. // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol. 29, №4. – P. 705–709.
  89. Garrod A., Batra G., Ptacek I. et al. Duration and method of tissue storage alters placental morphology – implications for clinical and research practice // *Placenta.* – 2013. – Vol. 34, №11. – P. 1116–1119.
  90. Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al. Clinical applications of stem cells transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // *Fetal Liver Transplantation.* – 1992. – Suppl. – P. 114–117.
  91. Graca G., Duarte I.F., Goodfellow B.J. et al. Potential of NMR spectroscopy for the study of human amniotic fluid // *Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 79, №21. – P. 8367–8375.
  92. Haller M.J., Wasserfall C.H., McGrail K.M. et al. Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P. 2041–2046.
  93. Harris D.T. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications // *Stem Cell Rev.* – 2008. – Vol. 4, №4. – P. 269–274.
  94. 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. – Vol. 46. – P. 76–87.
  95. Huppertz B., Kivity V., Sammar M. et al. Cryogenic and low temperature preservation of human placental villous explants. A new way to explore drugs in pregnancy disorders // *Placenta.* – 2011. – Vol. 32. – P. 65–76.
  96. International Standards for Cord Blood Collection, Processing, Testing, Banking, Selection and Release for Administration NetCord-FACT International Standards. Draft Fifth Edition 09/07/12. – 85 p.
  97. Isachenko V.V., Ostashko F.I., Grishchenko V.I. et al. Survival of trophoblastic fragments and vesicles after vitrification, ultrarapid freezing, and storage at 4 degrees C // *Cryobiology.* – 1993. – Vol. 30, №4. – P. 432–437.
  98. Kang M., Choi S., Cho Lee A.R. Effect of freeze dried bovine amniotic membrane extract on full thickness wound healing // *Arch. Pharm. Res.* – 2013. – Vol. 36, №4. – P. 472–478.
  99. Kesting M.R., Loeffelbein D.J., Steinstraesser L. et al. Cryopreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats // *Ann. Plast. Surg.* – 2008. – Vol. 60, №6. – P. 684–691.
  - low temperatures storage. *Problems of Cryobiology* 2008; 18 (1): 22–26
  98. Popovich Ya.O., Shevchuk O.S., Prokopyuk O.S. et al., inventors. Way for therapy of diabetes mellitus complicated with diabetic microangiopathy. Patent of Ukraine N 7937; IPC7 A 61 K 35/16 A 61 B 17/00. 2005 July 15.
  99. Popovich Ya.O., Shevchuk A.G., Vasilyuk M.D. Preparations of fetoplacental complex in correction of oxidant stress in surgical treatment of patients with diabetic foot syndrome. *Transplantologiya* 2007; 9 (1): 224–227
  100. Porter A.E., Auth J., Prince M. et al. Optimization of cytokine stability in stored amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(2): 459–462.
  101. Privalov P.L. Cold denaturation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1990; 25(4): 281–305.
  102. Prokopyuk O.S. Cryopreservation of placenta and determination of its effect mechanisms on a body of patients of late ontogenesis (experimental study) [Author's abstract of dissertation]. Kharkov; 2014.
  103. Prokopyuk O.S. et al. Cryopreserved erythrocytes of umbilical blood: antianemic transfusion medium. In: Yurchenko T.N. et al., editors. Effect of cooling on biological objects. Kharkov; 1990; p. 121–124.
  104. Prokopyuk O.S., Petrenko A.Yu., Prokopyuk V.Yu., Chizhevsky V.V. Cryopreservation of placenta of different maturity degree. *Problems of Cryobiology* 2008; 18 (2): 220.
  105. Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S., Chizhevsky V.V., inventors. Cryopreservation way for placental tissue. Patent of Ukraine N 79009; IPC A 01 N 1/02. 2013 Apr 10.
  106. Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S., Musatova I.B. et al. Survival of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. *Cell and organ transplantology* 2015; 3(1): 34–38.
  107. Puchkovskaya N.A., editor. Tissue therapy. Kiev: Zdorov'ya; 1975.
  108. Radke T.F., Barbosa D., Duggleby R.C. et al. The assessment of parameters affecting the quality of cord blood by the appliance of the Annexin V staining method and correlation with CFU assays. *Stem Cells Int* 2013; 823912.
  109. Rassokha I.V., Goltsev A.N., Gurina T.M. Effect of different cryopreservation regimens on capability of placental suspension to manifest an immunocorrecting activity during treatment of adjuvant arthritis in mice. *Problems of Cryobiology* 2004; (1): 21–29.
  110. Ravishanker R., Bath A.S., Roy R. 'Amnion Bank' – the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns* 2003; 29(4): 369–374.
  111. Regnault T.R.H., Galan H.L., Parker T.A. et al. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. *Placenta* 2002; 23(Suppl A): 119–129.
  112. Ricci E., Vanosi G., Lindenmair A. et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell Tissue Bank* 2013; 14(3): 475–488.
  113. Riordan N.H., Chan K., Marleau A.M., Ichim T.E. Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression? *J Transl Med* 2007; 5: 8.
  114. Roselli E.A., Lazzati S., Iseppon F. et al. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. *Cytotherapy* 2013; 15(11): 1340–1351.
  115. Royenko A.A., Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S. et al. Morphofunctional characteristics of cryopreserved membrane of human afterbirth. In: Actual Problems of Medicine (collection of scientific papers). Gomel, Belarus; 2014; 2: 238–241.
  116. Rozanova S.L., Naumenko E.I., Rozanova E.D. et al. Changes in antioxidant properties of human placental extracts after freezing. *Problems of Cryobiology* 2010; 20 (3): 288–295.
  117. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R. E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for



100. Khuu H.M., Cowley H., David-Ocampo V. et al. Catastrophic failures of freezing bags for cellular therapy products: description, cause and consequences // *Cytotherapy*. – 2002. – Vol. 4. – P. 539–549.
101. Klinich K.D., Miller C.S., Hu J. et al. Effect of frozen storage on dynamic tensile properties of human placenta // *J. Biomech. Eng.* – 2012. – Vol. 134, №3. – 034501.
102. Kocaoemer A., Kern S., Kluter H. et al. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. 25. – P. 1270–1278.
103. Kogler G., Critser P., Trapp T., Yoder M. Future of cord blood for non-oncology uses // *Bone Marrow Transplant*. – 2009. – Vol. 44, №10. – P. 683–697.
104. Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R. et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42, №7. – P. 1539–1546.
105. Laurent R., Nallet A., Obert L. et al. Storage and qualification of viable intact human amniotic graft and technology transfer to a tissue bank // *Cell Tissue Bank*. – 2014. – Vol. 15, №2. – P. 267–275.
106. Law L.W., Sahota D.S., Chan L.W. et al. Effect of long-term storage on placental growth factor and fms-like tyrosine kinase 1 measurements in samples from pregnant women // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2010. – Vol. 12. – P. 1475–1480.
107. Liseth K., Abrahamsen J.F., Bjorsvik S. et al. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft // *Cytotherapy*. – 2005. – Vol. 7. – P. 328–333.
108. Madhavan H.N., Priya K., Malathi J. et al. Preparation of amniotic membrane for ocular surface reconstruction // *Indian J. Ophthalmol.* – 2002. – Vol. 50, №3. – P. 227–231.
109. Martins J.P., Santos J.M., de Almeida J.M. et al. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data // *Stem Cell Res. Ther.* – 2014. – Vol. 5, №1. – P. 1–15.
110. Micera A., Jirsova K., Normando E.M. et al. Molecular and biochemical expression of TLRs in human amniotic membrane: a comparative study of fresh and cryopreserved specimens // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 252, №2. – P. 267–274.
111. Moon J.H., Lee J.R., Jee B.C. et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells // *Human Reprod.* – 2008. – Vol. 23. – P. 1760–1770.
112. Newby D., Dalgliesh G.L., Aitken D.A. et al. Effect of cryopreservation on human cytotrophoblast cells in culture: hCG and PALP production // *Placenta*. – 2007. – Vol. 28, №4. – P. 350–352.
113. Niknejad H., Deihim H., Soltani-Hashjin M. et al. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells // *Cryobiology*. – 2011. – Vol. 63, №3. – P. 145–151.
114. Okabe M., Kitagawa K., Yoshida T et al. Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: physical, morphological properties, and safety as the new biological material // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2014. – Vol. 102, №3. – P. 862–870.
115. Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26, №2. – P. 300–311.
116. Pipino C., Shangaris P., Resca E. et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource // *Br. Med. Bull.* – 2013. – Vol. 105. – P. 43–68.
117. Pogozhykh D., Prokopyuk V., Pogozhykh O. et al. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin. – *PLoS One*. – 2015. – Vol. 2, №10. – 16. unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(22): 10119–10122.
118. Romyantsev G.E. *Tissue therapy*. Rostov-on-Don: Rostizdat; 1951.
119. Schmidt D., Hoerstrup S.P. Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Weekly* 2007; 2(137): 80–85.
120. Seo J.M., Sohn M.Y., Suh J.S. et al. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology* 2011; 62(3): 167–173.
121. Shablyi V., Kuchma M., Kirik V. et al. Mesenchymal and stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and migration potential in vivo. *Problems of Cryobiology* 2012; 22 (2): 157–160.
122. Shirshov S.V. Proteins of fetoplacental complex in regulation of immune reactions. *Uspekhi Sovremennoi Biologii* 1993; 113 (2): 230–237.
123. Smolyaninov A.B. Cell medicine: concept of its development. *Clinical Pathophysiology* 2004; (1): 10-18.
124. Sommer M., Funfstuck R., Stein G. Cell cultures from cryopreserved renal biopsies and other tissue samples. *Exp Toxicol Pathol* 1999; 51(3): 229–234.
125. Spong C.Y., Ghidini A., Ossandon M. et al. Are the cytokines interleukin-6 and angiogenin stable in frozen amniotic fluid? *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(4): 783–786.
126. Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood* 1987; 70: 974–978.
127. Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta* 2011; 32 (Suppl. 4): 311–315.
128. Tehrani F.A., Ahmadiani A., Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology* 2013; 67(3): 293–298.
129. Thirumala S., Goebel W.S., Woods E.J. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis* 2009; 5(3): 143–154.
130. Thirumala S., Zvonik S., Floyd E. et al. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog* 2005; 21: 1511–1524.
131. Thomasen H., Pauklin M., Noelle B. et al. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2011; 36(3): 247–255.
132. Thomasen H., Pauklin M., Steuhl K.P. et al. Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247(12): 1691–1700.
133. Tiwary S.K., Shukla D., Tripathi A.K. et al. Effect of placental-extract gel and cream on non-healing wounds. *J Wound Care* 2006; 15(7): 325–328.
134. Trifonov V.Yu., Prokopyuk V.Yu., Zajchenko A.V. Cryopreserved serum of cord blood in recovery of reproductive function in antiphospholipid syndrome. *Problems of Cryobiology* 2011; 21 (1): 75–84.
135. Tsutsayeva A.A., Grischenko V.I., Kudokotseva O.V. et al. Cryopreservation of hematopoietic stem cells from human cord blood. *Problems of Cryobiology* 2000; (1): 59–63.
136. Tsutsayeva A.O., Grischenko V.I., Kudokotseva O.V. et al. Procurement, cryopreservation and clinical application of hematopoietic cells of human cord blood [methodical recommendations]. Kharkov; 2000.
137. Tsutsayeva A.A., Grischenko V.I., Prokopyuk O.S. et al., inventors. Cryopreservation way for cord blood hemopoietic cells. Patent of Ukraine N 31847A; IPC A 01 N 1/02. 2000 Dec 15.
138. Vanichsetakul P. Clinical use of cord blood for stem cell transplantation. *J Med Assoc Thai* 2005; 88(2): 93–100.



118. Porter A.E., Auth J., Prince M. et al. Optimization of cytokine stability in stored amniotic fluid // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2001. – Vol. 185, №2. – P. 459–462.
119. Privalov P.L. Cold denaturation of proteins // *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 25, №4. – P. 281–305.
120. Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S., Musatova I.B. et al. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation // *Cell Organ Transplant.* – 2015. – Vol. 3, №1. – P. 34–38.
121. Radke T.F., Barbosa D., Duggleby R.C. et al. The assessment of parameters affecting the quality of cord blood by the appliance of the Annexin V staining method and correlation with CFU assays // *Stem Cells Int.* – 2013. – 823912.
122. Ravishanker R., Bath A.S., Roy R. 'Amnion Bank' – the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns // *Burns.* – 2003. – Vol. 29, №4. – P. 369–374.
123. Regnault T.R.H., Galan H.L., Parker T.A. et al. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review // *Placenta.* – 2002. – Vol. 23, Suppl. A. – P. 119–129.
124. Ricci E., Vanosi G., Lindenmair A. et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model // *Cell Tissue Bank.* – 2013. – Vol. 14, №3. – P. 475–488.
125. Riordan N.H., Chan K., Marleau A.M., Ichim T.E. Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression // *J. Transl. Med.* – 2007. – Vol. 5, №1. – 8.
126. Roselli E.A., Lazzati S., Iseppon F. et al. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures // *Cytotherapy.* – 2013. – Vol. 15, №11. – P. 1340–1351.
127. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R. E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92, №22. – P. 10119–10122.
128. Schmidt D., Hoerstrup S.P. Tissue engineered heart valves based on human cells // *Swiss Med. Weekly.* – 2007. – Vol. 2, №137. – P. 80–85.
129. Seo J.M., Sohn M.Y., Suh J.S. et al. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide // *Cryobiology.* – 2011. – Vol. 62, №3. – P. 167–173.
130. Sommer M., Funfstuck R., Stein G. Cell cultures from cryopreserved renal biopsies and other tissue samples // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 1999. – Vol. 51, №3. – P. 229–234.
131. Spong C.Y., Ghidini A., Ossandon M. et al. Are the cytokines interleukin and angiogenin stable in frozen amniotic fluid // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1998. – Vol. 178, №4 – P. 783–786.
132. Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing // *Blood.* – 1987. – Vol. 70. – P. 974–978.
133. Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications // *Placenta.* – 2011. – Vol. 32, Suppl. 4. – P. 311–315.
134. Tehrani F.A., Ahmadiani A., Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane // *Cryobiology.* – 2013. – Vol. 67, №3. – P. 293–298.
135. Thirumala S., Goebel W.S., Woods E.J. Clinical grade adult stem cell banking // *Organogenesis.* – 2009. – Vol. 5, №3. – P. 143–154.
136. Thirumala S., Zvonick S., Floyd E. et al. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells // *Biotechnol. Prog.* – 2005. – Vol. 21. – P. 1511–1524.
137. Thomasen H., Pauklin M., Noelle B. et al. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of
139. Volkova N.A., Goltsev A.N. Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of culture chorion cells. *Cryo Letters* 2015; 36(1): 25–29.
140. Vvedensky B.P., Kovalev G.A., Tynnyk L.N. et al. Cryopreserved serum of cord blood in therapy of destructive and dystrophic processes in joints. *Bulletin of Urgent and Recovery Medicine* 2012; 13 (1): 41–43.
141. Wang H.Y., Lun Z.R., Lu S.S. Cryopreservation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells without dimethyl sulfoxide. *CryoLetters* 2011; 32(1): P. 81–88.
142. Werber B., Martin E. A prospective study of 20 foot and ankle wounds treated with cryopreserved amniotic membrane and fluid allograft. *J Foot Ankle Surg* 2013; 52(5): 615–621.
143. Woods E.J., Benson J.D., Agca Y. et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48: 146–156.
144. Yang W.-Z., Zhang Y., Wu F. et al. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions (Shenzhen Beike Cell Engineering Research Institute, Shenzhen, China). *Journal of Translational Medicine* 2010; 8(1): 75.
145. Young D.A., Gavrillov S., Pennington C.J. et al. Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. *Biochem Bioph Res Co* 2004; 322: 759–765.
146. Yu G., Borlongan C.V., Stahl C.E. et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells for the repair of myocardial infarction. *Med Sci Monit* 2008; 14(10): 163–172.
147. Yu X.M., Xue Z.G., Dai G.S. et al. Isolation, culture and cryopreservation of cells derived from fetal appendages. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2007; 23(6): 447–450.
148. Yurchenko T.N., Prokopyuk O.S., Kuzmina I.Yu. et al. About the possibility of placental tissue cryopreservation. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> Congress of Ukrainian Society for Cryobiology and Cryomedicine.* Kharkov; 1995, p. 284–285.

- cryopreserved amniotic membrane // *Curr. Eye Res.* – 2011. – Vol. 36, №3. – P. 247–255.
- 138.Thomasen H., Pauklin M., Steuhl K.P. et al. Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications // *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 247, №12. – P. 1691–1700.
- 139.Tiwary S.K., Shukla D., Tripathi A.K. et al. Effect of placental-extract gel and cream on non-healing wounds // *J. Wound Care.* – 2006, Jul. – Vol. 15, №7. – P. 325–328.
- 140.Vanichsetakul P. Clinical use of cord blood for stem cell transplantation // *J. Med. Assoc. Thai.* – 2005. – Vol. 88, №2. – P. 93–100.
- 141.Volkova N.A., Goltsev A.N. Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of culture chorion cells // *CryoLetters.* – 2015. – Vol. 36, №1 – P. 25–29.
- 142.Wang H.Y., Lun Z.R., Lu S.S. Cryopreservation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells without dimethyl sulfoxide // *CryoLetters.* – 2011. – Vol. 32, №1. – P. 81–88.
- 143.Werber B., Martin E. A prospective study of 20 foot and ankle wounds treated with cryopreserved amniotic membrane and fluid allograft // *J. Foot Ankle Surg.* – 2013. – Vol. 52, №5. – P. 615–621.
- 144.Woods E.J., Benson J.D., Agca Y. et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues // *Cryobiology.* – 2004. – Vol. 48. – P. 146–156.
- 145.Young D.A., Gavrilov S., Pennington C.J. et al. Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes // *Biochem. Bioph. Res. Co.* – 2004. – Vol. 322. – P. 759–765.
- 146.Yang W.-Z., Zhang Y., Wu F. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions (Shenzhen Beike Cell Engineering Research Institute, Shenzhen, China) // *J. Transl. Med.* – 2010. – Vol. 8, №1. – P. 75.
- 147.Yu G., Borlongan C.V., Stahl C.E. et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells for the repair of myocardial infarction // *Med. Sci. Monit.* – 2008. – Vol. 14, №10. – P. 163–172.
- 148.Yu X.M., Xue Z.G., Dai G.S. et al. Isolation, culture and cryopreservation of cells derived from fetal appendages // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* – 2007. – Vol. 23, №6. – P. 447–450.

