

УДК 57.043:612.111

В.В. РЯЗАНЦЕВ*, Л.А. БАБИЙЧУК, О.Л. ЗУБОВА, Т.М. ГУРИНА

Криоконсервирование кордовой крови с использованием ПЭО-1500

UDC 57.043:612.111

V.V. RYAZANTSEV*, L.A. BABIYCHUK, O.L. ZUBOVA, T.M. GURINA
Cord Blood Cryopreservation with PEO-1500

Разработан безотмывочный метод криоконсервирования цельной кордовой крови с использованием криопротектора ПЭО-1500, который позволяет сохранить после размораживания до 99% эритроцитов, а по данным трансфузионной пробы - до 93%. Установлена сохранность биологически активных веществ плазмы на уровне контроля. После криоконсервирования по вышеуказанному методу с помощью иммунофлуоресцентного теста показана сохранность до 70% лимфоцитов крови, в том числе и стволовых клеток (CD34⁺) кордовой крови.

Ключевые слова: криоконсервирование, кордовая кровь, эритроциты, плазма.

Розроблено безвідмивний метод криоконсервування цілної кордової крові з використанням криопротектора ПЕО-1500, який дозволяє зберегти після розморожування до 99% еритроцитів, а за даними трансфузійної проби – до 93%. Встановлена збереженість біологічно активних речовин плазми на рівні контролю. Після криоконсервування за вищезгаданим методом за допомогою імунофлуоресцентного тесту показано збереження до 70% лімфоцитів крові, у тому числі і стовбурових клітин (CD34⁺) кордової крові.

Ключові слова: криоконсервування, кордова кров, еритроцити, плазма.

The method without washing-out for the whole cord blood cryopreservation with PEO-1500, enabling to preserve up to 99 and 93% erythrocytes after freeze-thawing and by the transfusion test data, correspondingly, has been designed. The integrity of biologically active substances in plasma at the control level has been established. After cryopreservation with the mentioned above method the immunofluorescent test has demonstrated the integrity of up to 70% blood lymphocytes, including cord blood stem cells (CD34⁺).

Key-words: cryopreservation, cord blood, erythrocytes, plasma.

В последнее время кордовая кровь (КК) и полученные из нее препараты находят все большее применение в клинической практике [3], причем в лечебных целях используется как цельная кордовая кровь, так и отдельные ее компоненты. Особо ценным является применение цельной кордовой крови в неонатологии при переливании большого объема крови новорожденным, в спортивной медицине с целью усиления адаптационных свойств организма.

В клинической практике для лечения некоторых заболеваний используют выделенные из КК эритроциты или клетки лимфоидного ряда, в том числе стволовые гемопоэтические, плазму или сыворотку.

В связи с этим возникла необходимость создания запасов КК и разработки методов криоконсервирования эритроцитов, плазмы и цельной кордовой крови [1].

В настоящее время основным при криоконсервировании эритроцитов является глицериновый

Recently the cord blood (CB) and its derived preparations have become widely spread in clinical practice [3], moreover both whole cord blood and its separate components have been used in therapeutic purposes. Applying the whole cord blood in neonatology when transfusing large blood volume to newborn children, in sports medicine with the aim to strengthen the adaptation properties of organism, is of the most value.

Either isolated from CB erythrocytes or lymphoid cells, including stem hemopoietic ones, plasma or serum, are used in clinical practice for treating some diseases.

Due to this fact the necessity of establishing the CB stocks and designing the methods for erythrocytes, plasma and the whole cord blood cryopreservation has arisen [1].

Nowadays the principle method for erythrocyte cryopreservation is the glycerol one [1], enabling to obtain quite a high percentage of viable cells after cryopreservation, in spite of a significant disadvantage consisting in a long-term and complicated procedure of cryoprotectant removal after cell freeze-thawing.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

метод [1], который позволяет получить довольно высокий процент жизнеспособных клеток после криоконсервирования, хотя и имеет существенный недостаток, заключающийся в длительной и сложной процедуре удаления криопротектора после размораживания клеток.

Для криоконсервирования эритроцитов и, особенно, цельной кордовой крови наиболее перспективна разработка безотмывочных методов с использованием непроникающих криопротекторов. В наших предыдущих работах было показано, что среди различных непроникающих криопротекторов (ПЭО 400, 1500, 2000, гидроксиэтилкрахмалы, поливинилпирролидоны) наиболее эффективным для криозащиты эритроцитов донорской крови человека является ПЭО-1500. Максимальная сохранность клеток достигается при дозированном добавлении данного криопротектора к эритроцитам при низкой положительной температуре [2].

Цель данной работы – разработка безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов, цельной кордовой крови, плазмы и клеток крови человека; исследование их структурной и функциональной полноценности после размораживания.

Материалы и методы

В работе использовали кордовую кровь человека. Кровь объемом не менее 50 мл заготавливали на консерванте “Тлюгицир” из вены пульсирующей пуповины после нормальных родов.

Для экспериментов по разработке безотмывочного метода криоконсервирования КК применяли 30%-й ПЭО-1500, приготовленный на физиологическом растворе NaCl и 0,01М фосфатном буфере. Криопротектор к суспензии клеток цельной КК добавляли дозированно 1:1 по объему при низкой положительной температуре. Затем взвесь клеток переносили в стандартный алюминиевый контейнер и замораживали до -196°C погружением в жидкий азот. Оттаивание проводили при $42-44^{\circ}\text{C}$ на водяной термостатируемой бане при постоянном покачивании. После размораживания эритроцитов спектрофотометрически измеряли гемолиз и осмотическую хрупкость эритроцитов, используя модель трансфузии: перенос деконсервированных эритроцитов в физиологический раствор NaCl (1:10 по объему) и инкубирование при 37°C в течение часа.

Содержание биологически активных веществ плазмы КК определяли с помощью тест-систем “Алькор-био” (С.-Петербург) методом иммуноферментного анализа (ИФА) [6].

Фенотипирование ядродержащих клеток и лимфоцитов проводили по методике окрашивания клеток по иммунофлуоресцентному тесту. Моно-

The designing of methods without washing-out using non-penetrative cryoprotectants is the most perspective way for erythrocyte and, especially, the whole cord blood cryopreservation. As shown in our previous papers, among the different non-penetrative cryoprotectants (PEO 400, 1500, 2000, hydroxyethylstarches, polyvinyl pyrrolidones) the PEO-1500 is the most efficient one for human donor blood erythrocyte cryoprotection. The maximum cell integrity is achieved under this cryoprotectant dosed addition into erythrocytes at low positive temperature [2].

This research was aimed to design a cryopreservation method without washing for the whole human cord blood, plasm and blood cells and to investigate their structural and functional integrity after freeze-thawing.

Materials and methods

Human cord blood was used in the research. Blood of higher than 50 ml volume was procured with “Glygicir” preservative from pulsating umbilical cord vein after easy delivery.

When designing the method without washing-out for CB cryopreservation a 30% PEO-1500, prepared with NaCl physiological solution and 0.01 mM phosphate buffer, was applied. Cryoprotectant was added into the whole CB cell suspension in 1:1 v/v dose at low positive temperature. Afterwards the cell suspension was transferred into the standard aluminium container and frozen down to -196°C by immersing into liquid nitrogen. Thawing was done at $42-44^{\circ}\text{C}$ on water thermostated bath at a constant shaking. After erythrocyte freeze-thawing the hemolysis and erythrocyte osmotic fragility were spectrophotometrically measured using transfusion model: transferring frozen-thawed erythrocytes into NaCl physiological solution (1:10 by volume) and 1 hr's incubation at 37°C .

The content of CB plasm biologically active substances was determined with “Alkor-bio” test-systems (St. Petersburg) by the immune enzyme analysis method (IEA) [6].

Nucleated cell and lymphocyte phenotyping was performed using the method of cell staining by immune fluorescent test. Mononuclears were isolated from the whole blood by centrifugation with ficoll-verografin gradient (1.077 g/ml density). We added 5 ml of tested monoclonal antibody into isolated cells and incubated for 30-45 min at 4°C . The surplus of primary antibodies was washed-out with Hank's solution by centrifugation for 5 min at 200 g. To the sediment of washed-out cells we added 50 ml of F(ab)-fragments of sheep antibodies against murine Ig, FITC labelled and diluted in 1:100. Physiological solution, prepared with phosphate buffer (PBS) and containing 0.5% gelatins and 0.1% sodium aside (PBS may be replaced by

нуклеары выделяли из цельной крови центрифугированием на градиенте фиколл-верографина (плотность 1,077 г/мл). К выделенным клеткам добавляли 5 мкл тестируемого моноклонального антитела и инкубировали 30-45 мин при 4°C. Излишек первичных антител отмывали раствором Хенкса центрифугированием в течение 5 мин при 200 g. К осадку отмывтых клеток добавляли 50 мкл F(ab)-фрагментов овечьих антител к Ig мыши, меченных FITC и разведенных 1:100. Для разведения использовали физиологический раствор, приготовленный на фосфатном буфере (ФБ) и содержащий 0,5% желатины и 0,1% азида натрия (ФБ можно заменить раствором Хенкса). Клетки суспендировали и инкубировали 30 мин при 4°C, затем их отмывали 2 раза центрифугированием по вышеуказанному способу. Окрашенные клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа под иммерсией с $\times 90$. Количество антиген-позитивных клеток определяли при просмотривании 200 лимфоцитов как процент флуоресцирующих клеток за вычетом флуоресцирующих клеток, наблюдаемых в препарате отрицательного контроля, подготовленного аналогичным образом. При этом клетки обрабатывали раствором Хенкса или нормальным Ig мыши. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакета прикладных программ "Statistika 6.0" методом Стьюдента-Фишера по t-критериям.

Результаты и их обсуждение

На эритроцитах донорской крови было показано, что "холодовая" дозированная обработка эритроцитов ПЭО-1500 позволяет значительно повысить их устойчивость к криоконсервированию по сравнению с обработкой при комнатной температуре, поэтому мы сочли целесообразным применить для криоконсервирования эритроцитов КК метод [2] и сравнить устойчивость эритроцитов донорской и кордовой крови к криоконсервированию.

Проведенные эксперименты показали, что обработка эритроцитов КК и донорской крови непроникающим ПЭО-1500 не вызывает гемолиз клеток. Криоконсервирование эритроцитов КК с ПЭО-1500 по методу "холодовой" обработки позволило обнаружить, что у эритроцитов донорской и кордовой крови наблюдается низкий уровень гемолиза после отогрева суспензии клеток (табл. 1). При моделировании трансфузии гемолиз эритроцитов КК достоверно не отличался от гемолиза эритроцитов донорской крови и составлял $17 \pm 2,1\%$, что является допустимым показателем для переливания крови. Эти данные свидетельствуют о

Hank's solution) were used for dilution. Cells were suspended and incubated for 30 min at 4°C, then twice washed-out with centrifugation by the mentioned above method. The stained cells were analysed using fluorescent microscope with immersion, $\times 90$. The number of antigen-positive cells was determined when observing 200 lymphocytes as the percentage of fluorescing cells minus those, observed in the preparation of negative control, prepared in a similar way. Cells were thereby treated with Hank's solution or normal murine Ig. Results were statistically processed using the "Statistika 6.0" software by the Student-Fisher method on t-criteria.

Results and discussion

The "cold" dosed erythrocyte treatment with PEO-1500 was demonstrated in donor blood erythrocytes as enabled to significantly increase their resistance to cryopreservation compared to the treatment at room temperature, therefore we considered as expedient the applying of the method [2] for CB erythrocyte cryopreservation and comparing erythrocyte resistance of the donor and cord blood to cryopreservation.

As demonstrated in the experiments performed, no cell hemolysis was evoked while treating CB and donor blood erythrocyte with non-penetrative PEO-1500. CB erythrocyte cryopreservation with PEO-1500 by the "cold" treatment method enabled to reveal a low hemolysis level after cell suspension thawing in donor and cord blood erythrocytes (Table 1). When modelling transfusion CB erythrocyte hemolysis did not statistically and significantly differ from donor blood erythrocyte hemolysis and was $17 \pm 2,1\%$, that was an acceptable index for blood transfusion. These data testify to quite a high erythrocyte survival after cryopreservation with PEO-1500.

As a result of the experiments on the whole CB freezing, performed under similar conditions, a higher integrity of erythrocytes, frozen in the whole blood preparation has been established (Table 1). This is testified by a decrease in hemolysis level right after freeze-thawing and that is especially important after cell transfer into isotonic medium (transfusion test). As summarised in Table 1, these indices are almost twice reduced for cryopreserved whole blood. Due to this we may conclude about a possible application of the whole cryopreserved CB for strengthening the hemotransfusion effect by an immune stimulating effect with CB plasm components under certain clinical indices.

Thus, the obtained results testify to the efficiency of PEO-1500 non-penetrative cryoprotectant for cryopreservation of erythrocytes isolated from CB and especially for erythrocytes, being a part of the whole human CB. Therefore for further designing of the

достаточно высокой выживаемости эритроцитов после криоконсервирования с ПЭО-1500.

В результате экспериментов по замораживанию цельной КК, проведенных в аналогичных условиях, установлена более высокая сохранность эритроцитов, замороженных в препарате цельной крови (табл. 1). Об этом свидетельствует снижение уровня гемолиза сразу после размораживания и, что особенно важно, после переноса клеток в изотоническую среду (трансфузионная проба). Как видно из данных табл. 1, эти показатели для криоконсервированной цельной КК снижаются практически в два раза. В связи с этим можно сделать заключение, что при определенных клинических показаниях возможно применение цельной криоконсервированной КК для усиления эффекта гемотрансфузии иммуностимулирующим действием компонентов плазмы КК.

Полученные результаты свидетельствуют, что ПЭО-1500 является эффективным непроникающим криопротектором для криоконсервирования выделенных из КК эритроцитов и, особенно, эритроцитов в составе цельной КК человека. Поэтому для дальнейшей разработки безотмывочного метода криоконсервирования целесообразно использовать данный криопротектор.

Высокий уровень биологически активных веществ (гормонов, нейропептидов, цитокинов, аминокислот и т.д.) обусловил использование КК в медицине [3, 5, 9, 11].

Кордовая плазма, полученная из пуповинной крови после нормальных родов, по биологическим свойствам и спектру содержащихся веществ может быть отнесена к препаратам крови с выраженными иммуностимулирующим и адаптогенным действием. Сохранение в течение длительного времени полезных свойств плазмы КК возможно при использовании технологии низкотемпературного хранения в жидком азоте при -196°C или при -20°C [4]. Представляло интерес исследование степени сохранности биологически активных веществ после процедуры низкотемпературного хранения. С этой целью методом ИФА были измерены концентрации в плазме кордовой крови трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4), тиреотропного гормона (ТТГ), тестостерона и альфа-фетопропротеина (АФП).

Альфа-фетопропротеин – гликопротеин с молекулярной массой около 70 кДа. В крови здоровых людей нормальная концентрация АФП составляет

Таблица 1. Содержание свободного гемоглобина (%) после обработки и криоконсервирования клеток с ПЭО-1500

Table 1. Free hemoglobin (%) content after cell treatment and cryopreservation with PEO-1500

Условия эксперимента Experimental conditions	Гемолиз после размораживания Hemolysis after freeze – thawing	Трансфузионная проба Transfusion test
Эритроциты донорской крови Donor blood erythrocytes	1,32±0,19	16±1,8
Эритроциты кордовой крови Cord blood erythrocytes	1,16±0,11	17±2,1
Цельная кордовая кровь Whole cord blood	0,59±0,06	7,4±0,4

cryopreservation method without washing-out this cryoprotectant usage is expedient.

High level of biological by active substances (hormones, neuropeptides, cytokines and aminoacids *etc.*) has stipulated the CB usage in medicine [3, 5, 9, 11]. Cord plasm derived from umbilical blood after easy delivery may be referred to blood preparations with manifested immune stimulating and adaptogenic effects according to biological properties and a range of contained in it substances. A long-term preservation of useful properties of CB plasm is possible when using technologies of low temperature storage (in liquid nitrogen either at -196 or -20°C) [4]. Of interest was to investigate the integrity extent of biologically active substances after low temperature storage procedure. With this aim using the IEA method we measured triiodothyronine (T_3), thyroxin (T_4), thyrotropic hormone (ТТГ), testosterone and alpha-fetoprotein (AFP) concentrations in cord blood plasm.

Alpha-fetoprotein is glycoprotein with molecular mass of about 70 kDa. Normal AFP concentration is up to 10 IU/ml in blood of healthy people. In women its concentration increases during pregnancy, while intrauterine growth the AFP is mostly formed in a yolk sac, fetal liver and in a small amount in gastrointestinal tract. Then it comes into the blood of fetus, amniotic fluid and from them partially into mother's blood. During pregnancy the AFP concentration in these fluids changes, for example a medial value of AFP level is nearly 35 ng/ml in blood and 23,300 ng/ml in amniotic coat to the 15th week end [15]. According to the data obtained, the AFP concentration is initially high in CB with no significant changes occurred after cord blood plasm freezing and storage (Table 2).

The similar data were obtained in respect to the one of the sexual hormones: testosterone, which high concentration in CB is also preserved after freeze-

до 10 МЕ/мл. У женщин его концентрация повышается при беременности, в период внутриутробного развития АФП образуется преимущественно в желточном мешке, печени плода и в незначительном количестве – в желудочно-кишечном тракте. Затем он поступает в кровь плода, амниотическую жидкость, а из них –

частично в кровь матери. В течение беременности концентрация АФП в этих жидкостях изменяется, например медиальное значение уровня АФП к концу 15-й недели составляет около 35 нг/мл в крови и 23300 нг/мл в амниотической жидкости [5]. Согласно полученным данным, концентрация АФП изначально высокая в КК, после замораживания и хранения плазмы кордовой крови она существенно не изменяется (табл.2).

Сходные данные были получены в отношении одного из половых гормонов – тестостерона, высокая концентрация которого в КК сохраняется и после размораживания. Измерение содержания тироксиновых гормонов (T_3 , T_4 и ТТГ) показало, что концентрация T_3 , T_4 изначально в КК невысока. Однако концентрация ТТГ, который отвечает за

Таблица 2. Содержание биологически активных веществ после криоконсервирования плазмы кордовой крови
Table 2. Content of biologically active substances after cord blood plasm cryopreservation

Условия эксперимента Experimental conditions	Тестостерон, нмоль/л Testosterone, nmol/l	T_3 , нмоль/л T_3 , nmol/l	T_4 , нмоль/л T_4 , nmol/l	ТТГ, МЕ/л TTH, IU/l	АФП, мг/л AFP, mg/l
Контроль (донорская плазма) Control (donor blood)	0,5–2,2	1,2–2,8	60–160	0,5–4,0	20
Кордовая нативная плазма Cord native plasm	5,0	1,1	65	4,7	3300
Кордовая плазма после криоконсервирования при –196°C Cord plasm after cryopreservation at –196°C	4,8	1,1	61	4,6	2950

thawing. The measurement of thyroxin hormones (T_3 , T_4 and ТТГ) content has demonstrated that T_3 , T_4 concentration in CB is not initially high. However the concentration of ТТГ, responsible for stimulation of thyroid hormone production is higher than the control and is kept after cryopreservation.

Thus, a cord plasm was established as enriched with biologically active substances of different genesis, which content is kept after cryopreservation.

In further research we have studied the phenotype of CB mononuclears prior to and after cryopreservation with PEO-1500 (Table 3). CB is known to be a source of stem cells, which main advantage is less manifested immunological reactivity compared to another stem cell sources, that stipulates a decrease in “graft-versus-host disease” (GVHD) risk.

Таблица 3. Фенотипирование ядродержащих клеток КК после криоконсервирования с ПЭО-1500 при –196°C
Table 3. Phenotyping of CB nucleated cells after cryopreservation with PEO-1500 at –196°C

Маркер Marker	Цельная КК (контроль), % Whole CB (control), %	Цельная КК после добавления 15% –го ПЭО–1500, % Whole CB after adding 15% PEO–1500, %	Цельная КК после криоконсервирования в 15% – м ПЭО–1500, % Whole CB after cryopreservation in 15% PEO–1500, %	Донорская кровь, % Donor blood, %
CD 3	46	44	42	65–79
CD 4	36	36	35	34–44
CD 8	17	15	13	19–27
CD 20	12	12	11	3–15
CD 45RA	40	41	37	54–74
CD 56	3	3	1	9–19
CD 16	10	12	8	6–18
CD 34	2	2	1	0
HLA–DR	14	14	13	7–21

стимуляцию выработки гормонов щитовидной железой, выше контрольной и сохраняется после криоконсервирования.

Таким образом, установлено что кордовая плазма обогащена биологически активными веществами различного генеза, содержание которых сохраняется после криоконсервирования. В дальнейшем мы исследовали фенотип мононуклеаров КК до и после криоконсервирования с применением ПЭО-1500 (табл.3). Известно, что КК – источник стволовых клеток, главным ее преимуществом, по сравнению с другими источниками стволовых клеток, является менее выраженная иммунологическая реактивность, что обуславливает снижение риска реакции “трансплантат против хозяина” (РТПХ).

Детальный анализ фенотипических и функциональных характеристик Т-лимфоцитов КК показал, что большинство их имеет фенотип ранних Т-лимфоцитов CD45RA [10]. Эта особенность мембранных структур указанных клеток может свидетельствовать о сниженной способности Т-лимфоцитов КК к иммунному ответу по классическому пути. Следовательно, для иммунокомпетентных клеток КК характерна большая вероятность индукции иммунологической толерантности. Сниженная антиген-презентирующая способность КК объясняется небольшим содержанием клеток, экспрессирующих антигены HLA II класса [7], поэтому использование КК при трансфузии исключает необходимость элиминации зрелых антиген-реактивных Т-лимфоцитов с целью минимизации РТПХ. Кроме того, сохранение этих клеток в криоконсервированной КК обеспечивает реализацию ее противоопухолевой активности, то есть развитие реакции “трансфузия против лейкоза” [8]. Данные о составе популяций и функциональной активности естественных киллеров и подобных естественным киллерам КК также свидетельствуют о возможности их участия в реализации эффекта “трансфузия против лейкоза”. В пользу этого факта свидетельствует наличие характерной для КК популяции CD16⁺ TCRa/b⁺, которая, предположительно, когда клетки активированы, отвечает за реакцию “трансфузия против лейкоза”. Вместе с указанными клетками противоопухолевый эффект обеспечивают CD16⁺, CD56⁺, которые в значительном количестве содержатся в КК.

Выводы

Разработанный безотмывочный метод криоконсервирования цельной кордовой крови человека с использованием ПЭО-1500 позволяет сохранить одновременно клетки разного вида: большое количество эритроцитов и ядросодержащих клеток в жизнеспособном состоянии, а в плазме кордовой крови – биологически активные вещества.

Detailed analysis of phenotypic and functional characteristics of CB T-lymphocytes has demonstrated that the majority of them has the early T-lymphocytes CD45RA phenotype [10]. This peculiarity of membrane structures of the mentioned cells may testify to a decreased functioning of CB T-lymphocytes to an immune response by the standard way. Consequently, for CB immune competent cells a high probability of immunologic tolerance induction is characteristic. A decreased antigen-presenting CB capability is explained by a low cell content, expressing HLA antigens of II class [7], therefore the CB use in transfusion excludes the necessity of elimination of mature antigen-reactive T-lymphocytes aiming to GVHD minimisation. In addition, these cells preservation in cryopreserved CB provides realisation of its anti-tumoral activity, i.e. development of “transfusion-versus-leukemia” response [8]. Data about the population composition and functional activity of natural killers and similar to them CB cells testify to their possible participation in realising the “transfusion-versus-leukemia” effect. Together with the mentioned cells an anti-tumoral effect is provided by CD16⁺, CD56⁺, being in great number in CB.

Conclusions

The designed method without washing-out for the whole human cord blood cryopreservation with PEO-1500 enables to preserve simultaneously different cells: a great number of erythrocytes and nucleated cells in a viable state and biologically active substances in cord blood plasm.

References

1. *Agranenko V.A., Vinograd-Finkel F.R., Fedorova L.I. et al.* Methods of a long-term storage in frozen state for erythrocytes to be transfused: Method. recommendations.– Moscow: Ministry of Health Care of USSR, 1980.– 47 p.
2. *Babichuk L.A., Zemlyanskikh N.G., Kuzmina L.M.* New method for erythrocyte cryopreservation for clinical practice // *Transplantology.*– 2000.– Vol. 1, N1.– P. 296-298.
3. *Grischenko V.I., Prokopyuk O.S.* Perspectives and possibilities of placental blood usage // *Meditinskije vesti.*– 1997.– N4.– P. 26-27.
4. *Lipina O.V., Prokopyuk O.S., Savchenko Yu.A.* To the question about cord blood plasm cryopreservation // *Problems of cryobiology.*– 2000.– N4.– P.83-84.
5. *Morozova R.P., Kozulina E.P., Nikolenko I.A. et al.* Placenta is a source of biologically active substances // *Ukr. biokhim. zhurnal.*– 1999.– Vol. 1, N4.– P. 21-29.
6. *Taranov A.G.* Diagnostic test-systems // Moscow: Publishing House “Mokeyev”, 2002.– 288p.
7. *Torubarova N.A., Koshel I.V., Yatsik G.V.* Hemopoiesis in fetus and newborn child.– Moscow: Meditsina, 1993.– 208 p.
8. *Antin J.H.* Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomen // *Blood.*– 1993.– Vol.82, N8.– P. 2273-2277.
9. *Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S., Ribeiro R.C.* Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults//

Литература

1. Аграненко В.А., Виноград-Финкель Ф.Р., Федорова Л.И. и др. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий: Метод. рекомендации.– М.: МЗ СССР, 1980.– 47 с.
2. Бабійчук Л.О., Землянських Н.Г., Кузьміна Л.М. Новый метод криоконсервування еритроцитів для клінічної практики // Трансплантологія.– 2000.– Т.1, №1.– С.296-298.
3. Грищенко В.И., Прокопюк О.С. Перспективы и возможности использования плацентарной крови // Медицинские вести.– 1997.– №4.– С.26-27.
4. Липина О.В., Прокопюк О.С., Савченко Ю.А. К вопросу о криоконсервировании плазмы кордовой крови // Пробл. криобиологии.– 2000.– №4.– С. 83-84.
5. Морозова Р.П., Козулина Е.П., Николенко И.А. и др. Плацента – источник биологически активных веществ // Укр. биохим. журнал.– 1999.– Т.1, №4.– С. 21-29.
6. Таранов А.Г. Диагностические тест-системы.– М.: Изд-во "Мокеев", 2002.– 288 с.
7. Торубарова Н.А., Кошель И.В., Яцик Г.В. Кроветворение плода и новорожденного.– М.: Медицина, 1993.– 208 с.
8. Antin J.H. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon // Blood.– 1993.– Vol.82, N8.– P. 2273-2277.
9. Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S., Ribeiro R.C. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults// Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1992.– Vol.89, N9.– P. 4109-4113.
10. Harris D.T., Shumacher M.J., Locascio J. et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T-lymphocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1992.– Vol. 89, N21.– P.10006-10010.
11. Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W. et al. Stored Placental Blood for Unrelated Bone Marrow Reconstitution // Blood.– 1993.– Vol.81, N7.– P. 1679-1690.

Accepted in 01.11.2005

Поступила 01.11.2005