

Влияние криоконсервирования на функциональные свойства ядродержащих клеток лейкоконцентрата кордовой крови человека

UDC 615.361.018.5.013.8.014.41

A.N. GOLTSEV*, V.V. VOLINA, M.V. OSTANKOV, K.A. GOLTSEV,
L.V. SOKOL, YE.V. BROVKO, L.G. CHERNYSHENKO, O.YU. KOZHINA

Effect of Cryopreservation on Functional Properties of Human Cord Blood Leukoconcentrate Nucleated Cells

Изучали влияние криоконсервирования на функциональные свойства более дифференцированных кроветворных предшественников зрелых клеточных типов в кордовой крови человека, а также выявляли степень корреляции изменения экспрессии фенотипических маркеров с функциональным состоянием этих клеток. Отмечено наличие корреляции функционального состояния гемопоэтических клеток с изменением экспрессии фенотипических маркеров. Установлена сохранность функциональных свойств компонентов лейкоконцентрата кордовой крови человека при использовании предложенного способа его получения и криоконсервирования.

Ключевые слова: кордовая кровь человека, ядродержащие клетки крови, функциональные свойства, криоконсервирование.

Вивчали вплив криоконсервування на функціональні властивості більш диференційованих кроветворних попередників зрілих клітинних типів у кордовій крові людини, а також виявляли ступінь кореляції зміни експресії фенотипових маркерів з функціональним станом цих клітин. Виявлена наявність кореляції функціонального стану гемопоетичних клітин зі зміною експресії фенотипових маркерів. Встановлено збереження функціональних властивостей компонентів лейкоконцентрату кордової крові людини при використанні запропонованого способу його отримання і криоконсервування.

Ключові слова: кордова кров людини, ядровмісні клітини крові, функціональні властивості, криоконсервування.

Cryopreservation effect on functional properties of more differentiated hemopoietic precursors of mature cells in human cord blood was investigated, as well as correlation between phenotypic marker expression and functional condition of these cells was assessed. Correlation between functional state of hemopoietic cells and phenotypic marker expression was noted. Maintenance of functional properties of human cord blood leukoconcentrate components was proved when the suggested method for its obtainment and cryopreservation being applied.

Key words: human cord blood, blood nucleated cells, functional properties, cryopreservation.

В клинической практике широко применяется кордовая (пуповинная) кровь, в единице объема которой содержится больше гемопоэтических стволовых клеток и предшественников зрелых клеточных типов по сравнению с периферической кровью взрослого человека и примерно столько же как в его костном мозге [9, 10, 21]. Плазма пуповинной крови содержит комплекс биологически активных компонентов: гормонов, интерлейкинов, интерферонов, ростовых факторов, ферментов и проферментов, витаминов и микроэлементов, гемопоэтинов и адаптогенов, эндорфинов и энкефалинов в физиологически сбалансированном соотношении [7, 8, 12, 15, 19].

Криоконсервирование является безальтернативным методом хранения ядродержащих клеток, в том числе и кордовой крови [9, 16, 17].

Cord (umbilical) blood, the volume unit of which contains more hemopoietic stem cells and mature cell precursors as compared to adult human peripheric blood, and approximately the same quantity as adult human bone marrow does, is widely used in clinical practice [9, 10, 21]. Umbilical blood plasma comprises a complex of biologically active components: hormones, interleukines, interferons, growth factors, enzymes and pro-enzymes, vitamins and microelements, hemopoietins and adaptogens, endorphins and enkephalins in physiologically balanced ratios [7, 8, 12, 15, 19].

Cryopreservation is the only method for storage of nuclear cells including cord blood ones [9, 16, 17].

An original method for obtaining and cryopreservation of cord blood nucleated components suspended in autologous plasma without any traditional cryoprotectants has been elaborated [6].

Разработан оригинальный способ получения и криоконсервирования ядродержащих компонентов кордовой крови, взвешенных в аутологичной плазме без использования традиционных криопротекторов [6].

Влияние временных и температурных параметров хранения кордовой крови человека (ККЧ) перед криоконсервированием, а также самого процесса криоконсервирования на функциональные свойства стволовых кроветворных клеток описано в работах [11, 13]. Однако полученные данные противоречивы и требуют дальнейшего изучения.

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования на функциональные свойства более дифференцированных кроветворных предшественников зрелых клеточных типов в кордовой крови человека (ККЧ), а также выявление степени корреляции изменения экспрессии фенотипических маркеров с функциональным состоянием этих клеток.

Материалы и методы

Объектом исследования был лейкоконцентрат кордовой крови человека (ЛККЧ), взвешенный в аутологичной плазме и полученный седиментационным методом [5].

Для исследования ЛККЧ был разделен на группы: ЛККЧ₁ – нативный лейкоконцентрат, полученный из ККЧ (контроль для группы ЛККЧ₂); ЛККЧ₂ – криоконсервированный ЛККЧ₁ сразу после отогрева.

Клеточный спектр ЛККЧ до и после криоконсервирования определяли в мазках, фиксированных в метиловом спирте и окрашенных азур II – эозином.

Ядродержащие клетки лейкоконцентрата выделяли центрифугированием при 1500 об/мин в течение 40 мин. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в Рингер-фосфатном буфере до необходимой концентрации клеток.

Количество популяций, субпопуляций лимфоцитов, моноцитов и предшественников зрелых клеточных типов в клеточных суспензиях ЛККЧ определяли с помощью моноклональных антител (МАТ) (ООО “Сорбент”, Россия) [3] на флюоресцентном микроскопе (Inverso Epi Fluor, Ceti, Бельгия).

Фагоцитарную активность ядродержащих клеток ЛККЧ оценивали после их инкубации с 18-часовой культурой *Staphyococcus aureus*, убитой нагреванием, смешанных в соотношении 1:2 соответственно [2]. В окрашенных азур II-эозином мазках определяли количество фагоцитирующих и нефагоцитирующих клеток среди 200 подсчитанных. Из числа фагоцитирующих клеток устанавливали относительное количество клеток в стадиях аттракции и поглощения, а также фагоцитарное

Influence of duration and temperature of human cord blood (HCB) storage before cryopreservation as well as influence of cryopreservation procedure *per se* on functional properties of hemopoietic stem cells are described in [11, 13]. Nevertheless the data obtained are contradictory and require further studies.

The aim of the work is the study of cryopreservation influence on functional properties of more differentiated hemopoietic precursors of mature cells in human cord blood (HCB) as well as assessing correlation between phenotypic marker expression and functional condition of these cells.

Materials and methods

The subject of investigation was human cord blood leukoconcentrate (HCBL) suspended in autologous plasma and obtained by the sedimentation technique [5].

For the investigation the HCBL was divided into the following groups: HCBL₁ – native leukoconcentrate obtained from HCB (control for HCBL₂); HCBL₂ – frozen-thawed HCBL₁ right after thawing.

HCBL cell composition before and after cryopreservation was determined in smears fixed in methanol and dyed with azure II – eosin.

Leukoconcentrate nucleated cells were isolated by centrifugation at 1,500 rpm for 40 min. Supernatant was removed, and cell pellet was resuspended in Ringer’s phosphate buffer until a required cell concentration was achieved.

Quantities of populations, subpopulations of lymphocytes, monocytes and hemopoietic precursors of mature cells in HCBL cell suspensions were determined by means of monoclonal antibodies (MAB) (Ltd Sorbent, Russia) [3] on a fluorescent microscope (Inverso Epi Fluor, Ceti, Belgium).

Phagocytic activity of HCBL nucleated cells was estimated after their incubation with 18-hour *Staphylococcus aureus* culture, heat-killed and mixed in the ratio 1:2, respectively [2]. In azure II – eosin stained smears the quantities of phagocytosing and non-phagocytosing cells were determined per 200 counted ones. From the number of phagocytosing cells the relative quantity of cells at attraction and consumption stages as well as the phagocytic number as the average value of mic-roorganisms phagocytosed by one phagocyte were found.

Cell oxidation-reduction potential was estimated by means of nitro blue tetrazolium reduction test (NBTR-test) [19]; metabolic activity providing intracellular production of H₂O₂ (one of the main bactericide substances) was estimated by the quantity of intracellular diformazan dark granules.

Lisosomal enzyme activities were determined by the quantity of cells, in lisosomes of which non-specific

число как среднее количество фагоцитированных микроорганизмов одним фагоцитом.

Окислительно-восстановительный потенциал клеток оценивали с помощью НСТ-теста [19], активность метаболического процесса, обеспечивающего внутриклеточную выработку H_2O_2 (одной из главных бактерицидных субстанций), – по количеству темно-окрашенных гранул внутриклеточного диформазана.

Активность лизосомальных ферментов устанавливали по количеству клеток, в лизосомах которых неспецифическая эстераза (НЭ) и кислая фосфатаза (КФ) положительно реагировали на субстрат [21]. При этом активность КФ коррелировала с образованием мелких гранул синего цвета, а активность НЭ-гранул – темно-фиолетового цвета.

Полученные результаты обрабатывали по методу Стьюдента с учетом коэффициента Фишера. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия с уровнем значимости 5% [1].

Результаты и обсуждение

В нативных суспензиях лейкоконцентрата основными клеточными популяциями являлись лимфоциты, выявлено небольшое количество нейтрофилов, моноцитов и крупных клеток с большим гипохромным ядром и гипохромной цитоплазмой, которые относятся к недифференцированным. После отогрева в клеточном спектре лейкоконцентрата также преобладали лимфоциты, достоверно увеличивалось относительное количество недифференцированных клеток и определялись фибробластоподобные клетки, которые в нативном лейкоконцентрате не выявлялись; относительное количество нейтрофилов уменьшалось (рис. 1).

Было установлено, что относительное количество $CD4^+$ - и $NK\ 1.1^+$ -клеток достоверно возросло, а относительное содержание $CD8^+$ -клеток снижалось в деконсервированных образцах лейкоконцентрата по сравнению с нативными клеточными суспензиями (таблица).

Количество стволовых кроветворных клеток лейкоконцентрата после криоконсервирования не изменялось.

При использовании меченых антител на мембране большинства лимфоцитов после криоконсервирования флуоресцентная метка определялась на одном из полюсов клетки по типу “cap formation”, в то время как на нативных клетках она распределялась равномерно по всей клеточной мембране.

После криоконсервирования ЛККЧ достоверно уменьшались количество фагоцитирующих клеток и относительное количество фагоцитов на стадии поглощения по сравнению с их содержанием в нативном образце. Относительное количество клеток на стадии аттракции после криоконсервирования достоверно увеличивалось (рис. 2).

esterase (NE) and acid phosphatase (AP) responded to the substrate positively [20]. Herewith AP activity correlated with formation of small blue granules, and NE activity – with dark violet granules.

The data obtained were processed by the Student test with the Fisher correction. The difference significance was assessed by the t-test with the significance level of 5% [1].

Results and discussion

Lymphocytes were predominant cell populations in native leukoconcentrate suspensions; a few neutrophils, monocytes and large cells with big hypochromic nuclei and hypochromic cytoplasm, which belong to non-differentiated cells, were found. After thawing leukocytes were also predominant in leukoconcentrate cell composition; the relative quantity of non-differentiated cells increased significantly; fibroblast-like cells, none of which was revealed in native leukoconcentrate, were observed; the relative quantity of neutrophils decreased (Fig. 1).

It was established that the relative quantities of $CD4^+$ and $NK\ 1.1^+$ cells increased significantly, and the relative content of $CD8^+$ cells decreased in thawed samples of leukoconcentrate in comparison with native cell suspensions (Table).

The quantity of leukoconcentrate hemopoietic stem cells did not change after cryopreservation.

When labeled antibodies were used, the fluorescent label was observed on one of the cell poles by “cap

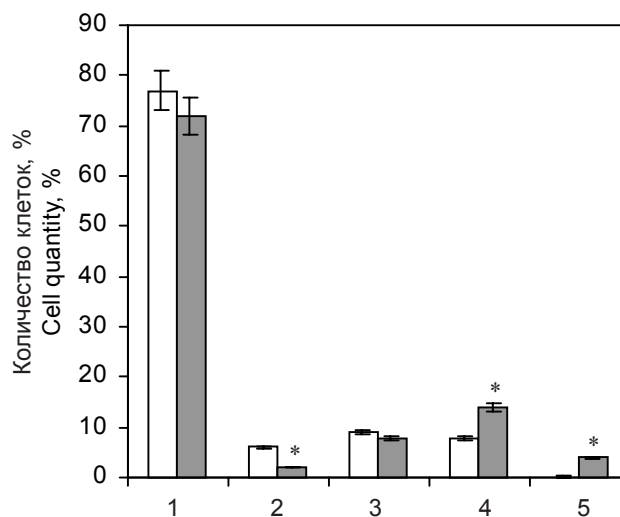


Рис. 1. Клеточный состав ЛККЧ до и после криоконсервирования: □ – ЛККЧ₁; ■ – ЛККЧ₂; 1 – лимфоциты; 2 – нейтрофилы; 3 – моноциты; 4 – недифференцированные клетки; 5 – фибробласты; * – достоверные отличия ЛККЧ₂ по сравнению с ЛККЧ₁ (P < 0,05).

Fig. 1. HCBL cell composition before and after cryopreservation: □ – HCBL₁; ■ – HCBL₂; 1 – lymphocytes; 2 – neutrophils; 3 – monocytes; 4 – non-differentiated cells; 5 – fibroblasts; * – significant difference between HCBL₂ and HCBL₁ (P < 0.05).

Влияние криоконсервирования на количество популяций, субпопуляций лимфоцитов, моноцитов и кроветворных клеток ЛККЧ, %
Cryopreservation influence on the quantities of populations, subpopulations of lymphocytes, monocytes and hemopoietic cells in HCBL, %

Класс МАТ МАВ	CD3 ⁺ Т-клетки T cells	CD4 ⁺ Т-хелперы T helpers	CD8 ⁺ Т-супрессоры T suppressors	CD14 ⁺ моноциты monocytes	CD19 ⁺ В-клетки B cells	CD34 ⁺ стволовые клетки stem cells	NK 1.1 ⁺ – клетки NK 1.1 ⁺ cells
ЛККЧ ₁ HCBL ₁	17,6 ± 0,05	12,5 ± 0,07	25,8 ± 0,04	11,8 ± 0,08	10,8 ± 0,13	3,9 ± 0,05	3,6 ± 0,04
ЛККЧ ₂ HCBL ₂	16,5 ± 0,08	19,0 ± 0,09*	17,0 ± 0,10*	13,5 ± 0,11	13,5 ± 0,15	4,5 ± 0,02	6,9 ± 0,09*

Примечание: * – достоверные отличия данных для ЛККЧ₂ по сравнению с ЛККЧ₁ (P < 0,05).

Note: * – significant differences between HCBL₂ and HCBL₁ (P < 0.05).

Наибольшей фагоцитарной активностью обладали моноциты и нейтрофилы в нативной и криоконсервированной суспензиях; недифференцированные клетки имели слабую фагоцитарную активность. Также обнаружена активная аттракция стафилококков на мембранах лимфоцитов, однако последние не обладали способностью поглощать микробные тела.

Фагоцитарное число в клетках суспензии ЛККЧ₂ достоверно снижалось по сравнению с таковым в клетках суспензии ЛККЧ₁.

Относительное количество клеток, положительно реагирующих в НСТ-тесте, и клеток, в лизосомах которых НЭ положительно реагировала на субстрат, после криоконсервирования достоверно

formation” type on membranes of most of leukocytes after cryopreservation, whereas it was distributed uniformly all along cellular membranes of native cells.

After cryopreservation of HCBL the quantity of phagocytosing cells and the relative quantity of phagocytes at consumption stage decreased significantly in comparison with their numbers in the native samples. The relative quantity of cells at attraction stage increased significantly after cryopreservation (Fig. 2).

Monocytes and neutrophils had the highest phagocytic activities in native and cryopreserved suspensions; non-differentiated cells had low phagocytic activity. An active attraction of staphylococci on lymphocytes membranes was also observed, though the latter were unable to consume microbial bodies.

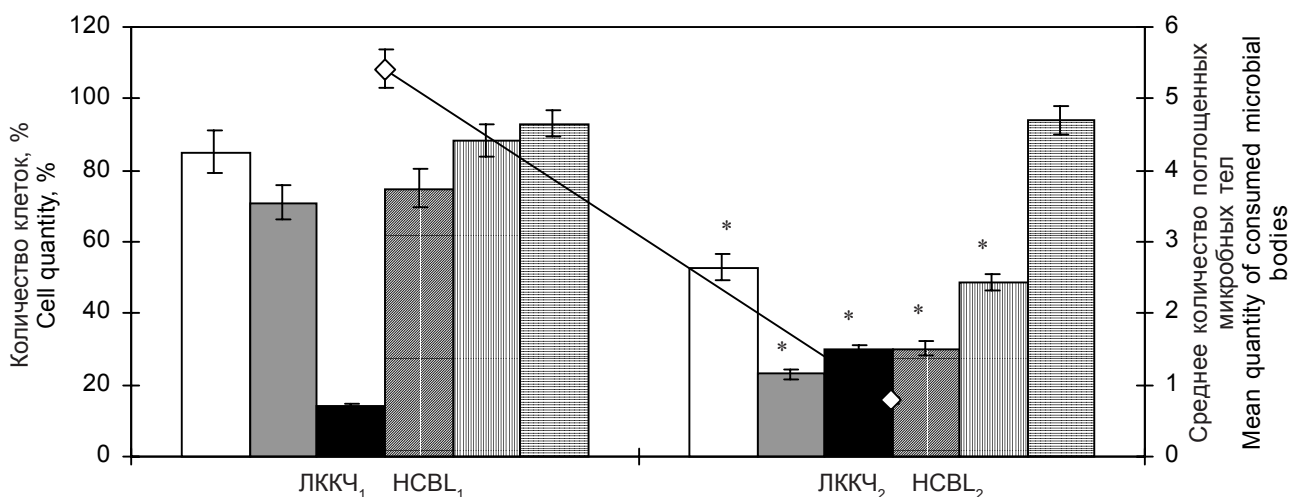


Рис. 2. Фагоцитарная активность ядерных клеток и гистохимические показатели фагоцитов ЛККЧ до и после криоконсервирования: □ – процент фагоцитирующих клеток; █ – стадия поглощения; █ – стадия аттракции; ▨ – НСТ-положительные клетки; ▨ – НЭ-положительные клетки; ▨ – КФ-положительные клетки; ◆ – количество микробов, поглощенных клеткой; * – достоверные различия по сравнению с ЛККЧ₁ (P < 0,05)

Fig. 2. Phagocytic activity of nucleated cells and histochemical indices of HCBL phagocytes before and after cryopreservation: 1 – HCBL₁; 2 – HCBL₂. □ – percentage of phagocytosing cells; █ – consumption stage; █ – attraction stage; ▨ – NBT-positive cells; ▨ – NE-positive cells; ▨ – AP-positive cells; ◆ – quantity of microbes consumed by one cell; * – significant difference in comparison with HCBL₁ (P < 0.05).

снижалось, а относительное количество клеток, в лизосомах которых КФ положительно реагировала на субстрат, не изменялось.

Установлено, что криоконсервирование нативного ЛККЧ не изменяло количество ядросодержащих и сохранных клеток в суспензии.

Показано, что после криоконсервирования в цитограмме ЛККЧ увеличивалось процентное содержание недифференцированных клеток, а также обнаруживались фибробластоподобные клетки, что можно объяснить как количественным перераспределением клеточных популяций, так и снижением адгезивной активности фибробластоподобных клеток, которые после криоконсервирования находятся преимущественно во взвешенном состоянии.

С помощью моноклональных антител показано, что различные популяции лейкоцитов и субпопуляции лимфоцитов обладали разной криоустойчивостью. Криоустойчивы были стволовые кроветворные клетки, Т-хелперы, В-клетки, моноциты и НК-клетки, а Т-супрессоры – криолабильны.

Установлено, что под влиянием криоконсервирования изменялась топография распределения маркерных белков и белковых комплексов мембран клеток ЛККЧ, о чем свидетельствует однополюсное распределение люминесцентной метки при определении популяций и субпопуляций лимфоцитов с помощью моноклональных антител [4], а также снижение поглотительной активности фагоцитов.

Выявлено, что структуры, определяющие бактерицидные свойства фагоцитов ЛККЧ и выявляемые в НСТ-тесте, а также системы, участвующие в синтезе неспецифической эстеразы, криолабильны. Системы, обеспечивающие продукцию КФ в клетках ЛККЧ, оказались криоустойчивыми. Это можно объяснить тем, что высокая активность КФ обнаруживается у лимфоцитов и моноцитов [14], а их относительное количество после криоконсервирования лейкоконцентрата не изменяется. Возможно, предложенный способ криоконсервирования ЛККЧ оптимален для сохранения в клетках КФ.

Выводы

Установлена сохранность функциональных свойств компонентов ЛККЧ при использовании предложенного способа его получения и криоконсервирования.

Влияние криоконсервирования на свойства мембран более дифференцированных кроветворных предшественников зрелых клеточных типов, процентное содержание которых в цитограмме ЛККЧ уменьшалось после криоконсервирования, проявлялось в изменении топографии распределения маркерных белков и белковых комплексов мембран этих клеток, а также в снижении поглотительной

The phagocytic number in HCBL₂ cells decreased significantly in comparison with that in HCBL₁.

After cryopreservation the relative quantities of cells reacting positively in NBTR-test and cells, in lysosomes of which NE responded positively to the substrate, decreased significantly; and the relative quantity of cells, in lysosomes of which AP responded positively to the substrate, did not change.

Cryopreservation of native HCBL was not established to change the quantities of nuclear and safe cells in suspension.

The percentage of non-differentiated cells in HCBL cytograms was shown to increase after cryopreservation, besides fibroblast-like cells were found, which can be explained both by a quantitative redistribution of cell populations and by a reduction in adhesive activity of fibroblast-like cells, which are mainly in a suspended state after cryopreservation.

Using monoclonal antibodies we showed that leukocyte different populations and lymphocyte subpopulations differed by their cryolability. Hemopoietic stem cells, T-helpers, B-cells, monocytes and NK-cells were cryotolerant, and T-suppressers were cryolabile.

The topography of marker protein distribution and HCBL cell membrane protein complexes was discovered to change under the influence of cryopreservation, which is confirmed by unipole distribution of the luminescent label, when lymphocyte populations and subpopulations were determined with monoclonal antibodies [4], as well as by a decline in phagocyte consumption activity.

Structures determining bactericide properties of HCBL phagocytes and revealed by the NBTR-test as well as systems participating in non-specific esterase synthesis were established to be cryolabile. Systems providing AP production in HCBL turned out to be cryotolerant. This can be explained by the fact that AP high activity is observed in lymphocytes and monocytes [14], and their relative quantity does not change after cryopreservation. The method suggested for cryopreservation of HCBL is likely to be optimal for maintenance of AP in cells.

Conclusions

Integrity of functional properties of HCBL components was proved when the suggested method for its obtaining and cryopreservation being used.

The influence of cryopreservation on membrane properties of more differentiated hemopoietic precursors of mature cells, percentage of which decreased in HCBL cytogram after cryopreservation, was manifested through topographic changes of marker protein distribution and HCBL cell membrane protein complexes of these cells as well as through a reduction in phagocyte consumption activity. This conditioned the correlation between phenotypic marker expression changes and functional state of these cells.

активности фагоцитов. Это обусловило корреляцию изменения экспрессии фенотипических маркеров с функциональным состоянием этих клеток.

Литература

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1980.– 293 с.
2. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике.– М.: Наука, 1990.– 224 с.
3. Филатов А.В., Багурин П.С., Маркова Н.А. и др. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов человека с помощью панели моноклональных антител // Гистология и трансфузиология.– 1990.– №1.– С. 16–19.
4. Цуцаева А.А., Гольцев А.Н., Попов Н.Н. и др. Кримоиммунология.– Киев: Наук. думка, 1988.– 176 с.
5. Цуцаева А.О., Грищенко В.І., Кудокотсева О.В., Прокопюк О.С. Заготівля, кримоконсервування та клінічне застосування гемопоетичних клітин кордової крові людини: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 16 с.
6. Патент №31847А, МПК А01N1/02. Україна. Спосіб кримоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокотсева та інш. Заявлено 05.11.1998; Опубл. 15.12.2000. Бюл. №7.
7. Adeyemo O., Jeyakumar H. Plasma progesterone, estradiol-17 beta- and testosterone in maternal and cord blood, and maternal human chorionic gonadotropin at parturition // Afr. J. Med. Med. Sci.– 1993.– Vol. 22, N3.– P. 55–60.
8. Brooks K.J., Lowy C., Thomas C.R. A comparison of the metabolic profiles of fetal and maternal plasma and placenta in normal and diabetic rats by 1H magnetic resonance spectroscopy // Diabetes Res.– 1994.– Vol. 26, N3.– P. 117–125.
9. 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, N10.– P. 3828–3832.
10. Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulation cells in human clinical transplantation // Blood Cells.– 1991.– Vol. 17, N2.– P. 313–329.
11. Campos L., Roubi N., Gyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N6.– P. 511–515.
12. Debieve F., Beerlandt S., Hubinont C., Thomas K. Gonadotropins, prolactin, inhibin A, inhibin B, and activin A in human fetal serum from midpregnancy and term pregnancy // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85, N1.– P. 270–274.
13. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // New Engl. J. Med.– 1989.– Vol. 321, N17.– P. 1174–1189.
14. Harris D.A. Spectrophotometric assays // In: Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach / Eds.: C.L. Bashford, D.A. Harris.– Washington: IRL Press.– 1987.– P. 49–90.
15. Ho Y.B., Philips W.D., Cannon W. et al. Prolactin, estradiol, and thyroid hormones in umbilical cord blood of neonates with and without hyaline membrane disease: a study of 405 neonates from midpregnancy to term // Am. J. Obstet. Gynecol.– 1982.– Vol. 142, N6, Pt. 1.– P. 698–703.
16. Rubinstein P., Roserfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood.– 1993.– Vol. 81, N7.– P. 1679–1690.
17. 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, N22.– P. 10119–10122.

References

1. Lakin G.F. Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1980.– 293 p.
2. Lebedev K.A., Ponyakina I.D. Immunogram in clinical practice.– Moscow: Nauka, 1990.– 224 p.
3. Filatov A.V., Bagurin P.S., Markova N.A. et al. Investigation of human lymphocyte subpopulation composition with a monoclonal antibody panel // Gistologiya i Transfuziologiya.– 1990.– N1.– P. 16–19.
4. Tsutsayeva A.A., Goltsev A.N., Popov N.N. et al. Cryoimmunology.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 176 p.
5. Tsutsayeva A.O., Grischenko V.I., Kudokotseva O.V., Prokopyuk O.S. Procurement, cryopreservation and clinical application of human cord blood hemopoietic cells: Methodical recommendations.– Kharkov, 2000.– 16 p.
6. Patent of Ukraine N31847A, IPC A01N1/02. A method for cryopreservation of cord blood hemopoietic cells / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva et al.– Filed in: 11.05.98. Published in: 12.15.2000. Bul. N7.
7. Adeyemo O., Jeyakumar H. Plasma progesterone, estradiol-17 beta- and testosterone in maternal and cord blood, and maternal human chorionic gonadotropin at parturition // Afr. J. Med. Med. Sci.– 1993.– Vol. 22, N3.– P. 55–60.
8. Brooks K.J., Lowy C., Thomas C.R. A comparison of the metabolic profiles of fetal and maternal plasma and placenta in normal and diabetic rats by 1H magnetic resonance spectroscopy // Diabetes Res.– 1994.– Vol. 26, N3.– P. 117–125.
9. 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, N10.– P. 3828–3832.
10. Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulation cells in human clinical transplantation // Blood Cells.– 1991.– Vol. 17, N2.– P. 313–329.
11. Campos L., Roubi N., Gyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N6.– P. 511–515.
12. Debieve F., Beerlandt S., Hubinont C., Thomas K. Gonadotropins, prolactin, inhibin A, inhibin B, and activin A in human fetal serum from midpregnancy and term pregnancy // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85, N1.– P. 270–274.
13. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // New Engl. J. Med.– 1989.– Vol. 321, N17.– P. 1174–1189.
14. Harris D.A. Spectrophotometric assays // In: Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach / Eds.: C.L. Bashford, D.A. Harris.– Washington: IRL Press.– 1987.– P. 49–90.
15. Ho Y.B., Philips W.D., Cannon W. et al. Prolactin, estradiol, and thyroid hormones in umbilical cord blood of neonates with and without hyaline membrane disease: a study of 405 neonates from midpregnancy to term // Am. J. Obstet. Gynecol.– 1982.– Vol. 142, N6, Pt. 1.– P. 698–703.
16. Rubinstein P., Roserfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood.– 1993.– Vol. 81, N7.– P. 1679–1690.
17. 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, N22.– P. 10119–10122.
18. Takser A., Mergler D., de Grosbois S. et al. Blood manganese content at birth and cord serum prolactin levels// Neurotoxicol. Teratol.– 2004.– Vol. 26, N6.– P. 811–815.
19. Urbanitz D., Fechner T., Grob R. Nitroblau-tetrazolium (NBT) Test bei isolierten menschlichen Monozyten // Blut.– 1975.– Vol. 30, N3.– P. 187–198.

18. *Takser A., Mergler D., de Grosbois S. et al.* Blood manganese content at birth and cord serum prolactin levels // *Neurotoxicol. Teratol.*– 2004.– Vol. 26, N6.– P. 811–815.
19. *Urbanitz D., Fechner T., Grob R.* Nitroblau-tetrazolium (NBT) Test bei isolierten menschlichen Monozyten // *Blut.*– 1975.– Vol. 30, N3.– P. 187–198.
20. *Wachstein M.S.* Histochemistry of leucocytes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*– 1955.– Vol. 59, N5.– P. 1052–1065.
21. *Watt S., Contreras M.* Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential // *Semin. Fetal. Neonat. Med.*– 2005.– Vol. 10, N3.– P. 209–220.

Accepted in 16.02.2010

*Поступила 16.02.2010
Рецензент Н.Г. Землянских*