

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Оценка качества криоконсервированной ПК до и после криохранения в автоматизированной системе «BioArchive®» в Московском банке стволовых клеток

И.В. Кобзева, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева, Е.Э. Карпова, Я.А. Круглова, Е.В. Боякова, Н.К. Шахпазян, А.Е. Гомзяков

Банк стволовых клеток Департамента Здравоохранения города Москвы, Москва

#### Evaluation of the quality of cryopreserved umbilical cord blood before and after cryostorage BioArchive® in Stem cell bank of Moscow

I.V. Kobzeva, T.A. Astrelina, M.V. Yakovleva, E.E. Karpova, Y.A. Kruglova, E.V. Boyakova, N.R. Shachpazyan, A.E. Gomzyakov  
Stem Cell Bank of the Moscow Health Department, Moscow, Russia

В статье проведен анализ качества криоконсервированной пуповинной крови (ПК) до и после криохранения в автоматизированной системе «BioArchive®» в Московском банке стволовых клеток. Представлены биологические характеристики криоконсервированной пуповинной крови (клеточный состав, жизнеспособность клеток (CD45+7-ADD-), количество CD34+-клеток), заготовленной для клинического применения. Показано, что после долгосрочного криохранения качество криоконсервированной пуповинной крови сохраняется, не изменяется и не зависит от срока криохранения, отмечается незначительное снижение количества ядродержащих клеток, колониобразующей активности. Выявлено, что на сохранение гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови после криохранения влияют метод их выделения, инициальные уровни гематокрита до криохранения и гемоконсерванта CPDA в пуповинной крови.

**Ключевые слова:** пуповинная кровь, гемопоэтические стволовые клетки, качество, криохранение, банк стволовых клеток.

Опыт эффективных трансплантаций аллогенных гемопоэтических стволовых (ГСК) пуповинной крови (ПК) пациентам с различными заболеваниями показал, что ПК является полноценным источником клеток, способных обеспечить долгосрочное восстановление гемопоэза [1–7]. Использование ПК в качестве альтернативного источника клеток позволило существенно расширить возможности применения аллогенных ГСК, особенно для лечения тех пациентов, которым ранее данный вид терапии был недоступен (представители расовых и этнических меньшинств, длительное ожидание подходящего донора костного мозга). Ежегодно в мире проводится более 2–3 тыс. трансплантаций ПК пациентам с различными заболеваниями, в 2009 г. впервые число трансплантаций ПК превысило количество трансплантаций костного мозга [8].

Спустя 20 лет после первого успешного применения более 20 тыс. образцов ПК, полученных от родственных и неродственных доноров, были трансплантированы 14 тыс. пациентов [4, 9].

The analysis of the quality of cryopreserved umbilical cord blood before and after the cryostorage BioArchive® of Stem Cells Bank in the Moscow. Represented the biological characteristics of cryopreserved umbilical cord blood (cell structure, cell viability (CD45+7-ADD-), the number of CD34+-cells), harvested for clinical use. It is shown that after the cryostorage quality of cryopreserved umbilical cord blood is stored, does not change and does not depend on the long-term of storage, there is a slight decrease in the number of nucleated cells, colony-forming activity. Revealed that the preservation of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood after cryostorage depends on the method of their selection, the initial levels of hematocrit to store and CPDA in cord blood.

**Key words:** cord blood, hematopoietic stem cells, quality, cryostorage, stem cell bank.

Успех трансплантаций аллогенных ГСК ПК во многом зависит от качества и безопасности заготовленного клеточного материала [2, 10–13]. Для восстановления биологических свойств ГСК и применения их в клинической практике криоконсервированная ПК должна быть «разморожена». Однако в процессе замораживания и размораживания в клетках могут возникнуть различные морфофункциональные повреждения (изменение формы и размера клеток, нарушение целостности мембраны, изменение конформации макромолекул), что снижает общее количество жизнеспособных и функционально активных клеток. Глубина этих повреждений напрямую зависит от технологии замораживания и размораживания клеточного материала [14]. Так как скорость восстановления гемопоэза и эффективность трансплантации ПК строго коррелирует с количеством и качеством трансплантируемых ядродержащих клеток и клеток с CD34+ иммунофенотипом, оценка качества криоконсервированной ПК, находящейся на хранении, является одной из первостепенных

e-mail: t\_astrelina@mail.ru

задач, стоящих перед современными банками ПК [2, 8, 13, 15].

Целью нашего исследования являлось изучение качества криоконсервированной ПК до и после криохранения в автоматизированной системе «BioArchive®» в Московском банке стволовых клеток.

### Материал и методы

Для определения факторов, влияющих на биологические характеристики (клеточный состав, жизнеспособность клеток (CD45<sup>+</sup>7-ADD), количество CD34<sup>+</sup>-клеток) и качество криоконсервированной ПК до и после криохранения в автоматизированной системе «BioArchive®» было исследовано 600 образцов ПК.

Сбор ПК осуществляли при срочных или оперативных родах (37-41 нед.). Во время беременности все роженицы подписывали информированное согласие. ПК собирали в систему для сбора крови (Green Cross, Корея), содержащую стандартное количество гемоконсерванта CPDA (цитратно-фосфатно-декстрозно-адениновый раствор). Степень разведения образцов ПК гемоконсервантом CPDA зависела от объема собранной ПК.

Выделение клеток ПК с целью уменьшения объема обрабатываемого материала и удаления эритроцитов в асептических условиях проводили двумя способами:

– *метод двойного центрифугирования (МДЦ)*: после первого центрифугирования ПК разделялась на три фракции – «клеточная плазма», лейкоцитарный слой и эритроциты, после второго – получали бесклеточную плазму и клеточный концентрат, содержащий ГСК, с помощью центрифуги «Cryofuge 5500i», (Heraeus, Германия) и автоматического плазмоекстрактора «Auto Volume Expressor» (ThermoGenesis, США);

– *метод автоматического выделения клеток (МАВК)* с помощью клеточного сепаратора «Serax S1000» (Biosafe, Швейцария).

После выделения ядросодержащих клеток непосредственно перед «замораживанием» в каждый образец пуповинной крови вводили криоконсервирующий раствор ДМСО в сочетании с декстраном-40 (или для оценки влияния комбинированных криопротекторов на качество пуповинной крови ДМСО в сочетании с реополиглиукином) в количестве 10% от объема конечного продукта. После этого все обработанные образцы ПК подвергали немедленной криоконсервации в автоматизированном криокомплексе «BioArchive®» (ThermoGenesis, США).

Изъятие и размораживание криоконсервированной ПК из автоматизированного криокомплекса «BioArchive®» для планового контрольного исследования проводилось ежегодно, согласно международным стандартам [16] и составляло 6% от всех заложенных образцов ПК.

### Тестирование ГСК ПК

Оценивали следующие параметры (биологические характеристики) ПК до и после криохранения:

1) *клеточный состав пуповинной крови*, исследуемый при помощи автоматического гематологического анализатора ABX Pentra 60 C Plus (HORIBA ABX Diagnostics Inc., Франция), в режиме автоматической аспирации с определением 26 параметров, а также посредством морфологической оценки маз-

ков, окрашенных по методу Паппенгейма – Крюкова (комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая – Грюнвальда и краской Романовского).

2) *количество ГСК пуповинной крови* оценивали по экспрессии мембранных маркеров в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами к CD34 и CD45 при помощи проточной цитометрии FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Количество CD34<sup>+</sup> клеток в криоконсервированной ПК оценивалось в виде 2 параметров: доля от общего количества лейкоцитов и абсолютное количество CD34<sup>+</sup>-клеток в 1 мл ПК в одном образце.

3) *жизнеспособность полученных ядросодержащих клеток пуповинной крови* оценивали с помощью проникающего в клетку красителя 7-ADD, связывающегося с ДНК, с определением количества CD45<sup>+</sup> клеток, негативных по реакции с 7-ADD, на проточном цитофлуометре FACSCalibur.

4) *колониобразующая способность ГСК пуповинной крови*, которую определяли с помощью культивирования клеточной суспензии в метилцеллюлозе в течении 14 сут. при температуре 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе с подсчетом количества колониобразующих единиц (КОЕ) на 1×10<sup>5</sup>: КОЕ-ГМ – гранулоцитарных-макрофагальных, КОЕ-Г – гранулоцитарных, КОЕ-М – макрофагальных, КОЕ-Эр – эритроцитарных, КОЕ-mix – смешанных. Для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл пуповинной крови полученные величины КОЕ умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови.

Выполняли *HLA-типирование образцов ПК*, для чего выделяли ДНК из клеток с использованием автоматизированной системы KingFisher, проводили молекулярные методы типирования с применением ПЦП обратным дот-блоттингом методом SSO (Sequence Specific Oligonucleotides) и с помощью аллель-специфических праймеров (Sequence Specific Primer).

В процессе обработки ПК определяли групповую принадлежность и осуществляли инфекционный контроль.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программ Microsoft Excel, Biostat 2009, OpenEpi 2.3. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Средний срок криохранения образцов ПК составил 3,5±1,3 лет, средний объем криоконсервированных образцов – 20,1±1,0 мл. Доля гемоконсерванта CPDA в криоконсервированной ПК составил 30,3±0,3%. Процент содержания ДМСО в криоконсервированной ПК – 10,0±0,3%.

Был проанализирован клеточный состав 600 образцов ПК до и после криохранения. Абсолютное количество ядросодержащих клеток ПК статистически значимо снижалось после криохранения и составило 3,7±1,0×10<sup>7</sup>/мл и 3,1±0,8×10<sup>7</sup>/мл соответственно ( $p = 0,02$ ). Процент сохранения ядросодержащих клеток после криохранения составил 87,0±13,3%. Жизнеспособность (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) ядросодержащих клеток ПК до (99,3±4,3%) и после криохранения (97,9±7,4%) практически не изменялась. Абсолютное количество мононуклеарных клеток криоконсервированной ПК не изменялось после криохранения.

Количество нейтрофилов до и после криохранения ПК статистически значимо снижалось с  $1,8 \times 10^7/\text{мл}$  до  $1,4 \times 10^7/\text{мл}$  ( $p = 0,03$ ), процент сохранения составил  $78,6 \pm 21,2\%$ . Абсолютное количество  $CD34^+$ -клеток после криохранения ПК снижалось с  $0,13 \pm 0,08 \times 10^6/\text{мл}$  до  $0,09 \pm 0,05 \times 10^6/\text{мл}$  ( $p = 0,035$ ), и сохранение  $CD34^+$ -клеток составило  $93,7 \pm 5,3\%$ .

При оценке КОЕ клеток ПК было показано, что количество колоний КОЕ-mix, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-ГМ и КОЕ-Эр после криохранения ПК в автоматизированной системе «BioArchive®» снижалось (табл.).

В ряде зарубежных научных работ были представлены данные по оценке биологических свойств

криоконсервированной ПК после размораживания на небольшом количестве образцов ПК. Так, в исследовании итальянских ученых сохранение ядродержащих клеток (40 криоконсервированных образцов ПК из 40 различных банков ПК) после размораживания составило  $78,9 \pm 15,4\%$ , из них жизнеспособных клеток  $85,5 \pm 10,6\%$ , средний срок криохранения –  $43,3 \pm 26,2$  мес. [17]. Аналогичное исследование было выполнено в Японии при оценке качества 54 криоконсервированных образцов ПК из 9 различных банков ПК. Было показано, что процент сохранения ядродержащих клеток,  $CD34^+$ -клеток и КОЕ-ГМ составил  $96,0 \pm 11,3\%$ ,  $83,0 \pm 17,0\%$  и  $88,6 \pm 41,2\%$ , соответственно [18].

#### Количество колониобразующих единиц клеток ПК до и после криохранения

КОЕ	Количество клеток, $\times 10^5$		Сохранение, %	P
	До криоконсервации	После криоконсервации		
КОЕ-mix	$26,9 \pm 4,1$	$25,9 \pm 8,4$	$99,3 \pm 3,4$	0,005
КОЕ-Г	$19,1 \pm 3,2$	$17,03 \pm 4,4$	$85,1 \pm 5,6$	0,038
КОЕ-М	$13,7 \pm 3,3$	$12,4 \pm 3,6$	$81,3 \pm 3,3$	0,040
КОЕ-ГМ	$19,5 \pm 2,4$	$17,3 \pm 4,9$	$82,3 \pm 9,8$	0,036
КОЕ-Эр	$21,6 \pm 7,7$	$13,6 \pm 3,2$	$69,4 \pm 5,7$	0,001

Примечание: КОЕ-ГМ – гранулоцитарно-макрофагальные, КОЕ-Г – гранулоцитарные, КОЕ-М – макрофагальные, КОЕ-Эр – эритроцитарные, КОЕ-mix – смешанные колониобразующие единицы.

Похожее исследование было проведено в Украине. Авторы показали высокий уровень сохранения ядродержащих клеток и  $CD34^+$ -клеток в жизнеспособном состоянии – до 98% и 94–98%, соответственно, а также высокий уровень колониобразующей способности клеток ПК (общее количество колоний составило  $247,6 \pm 36,8$ ). Однако в данном исследовании отсутствовала информация о количестве размороженных образцов ПК, их количестве и сроках криохранения [19].

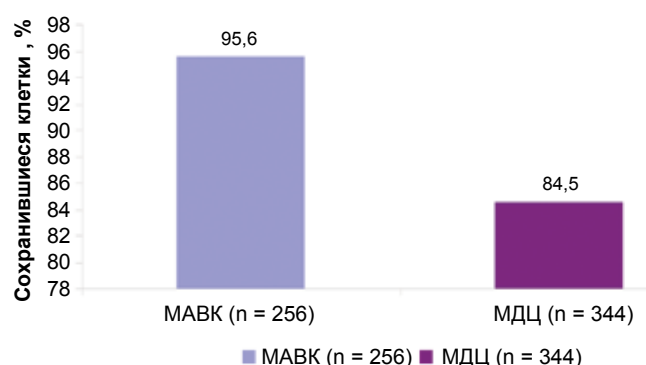
В отечественной литературе было проведено единственное исследование 231 образца ГСК ПК в зависимости от различных способов криоконсервирования и сроков хранения. Было установлено, что для максимального сохранения ГСК ПК в жизнеспособном состоянии криоконсервирование необходимо проводить в программном замораживателе, длительное криохранение должно осуществляться в диапазоне температур  $-130^\circ\text{C}$  ...  $-196^\circ\text{C}$ , количество ГСК с иммунофенотипом  $CD34^+/CD45^+$  в образце ПК прямо пропорционально исходному количеству ядродержащих клеток [20].

#### Оценка качества ПК до и после криохранения в зависимости от метода лейкоконцентрации

Все образцы пуповинной крови были разделены на две группы в зависимости от метода лейкоконцентрации: МАВК ( $n = 256$ ), МДЦ ( $n = 344$ ). При анализе клеточного состава пуповинной крови в зависимости от метода лейкоконцентрации было выявлено, что процент сохранения нейтрофилов ПК после криохранения был статистически значимо ниже в группе МДЦ  $80,21 \pm 2,10\%$  по сравнению

с группой МАВК  $85,31 \pm 3,80\%$  ( $p = 0,0006$ ). При оценке количества жизнеспособных ядродержащих клеток ( $CD45^+7AAD^-$ ) до и после криохранения ПК двумя методами лейкоконцентрации в обеих группах статистически значимых различий выявлено не было.

Процент сохранения  $CD34^+$ -клеток ПК после криохранения был достоверно выше в группе МАВК  $95,61 \pm 4,7\%$  по сравнению с группой МДЦ  $84,52 \pm 5,1\%$  ( $p = 0,042$ ) (рис.).



Доля сохранившихся после криохранения  $CD34^+$ -клеток ПК при различных методах лейкоконцентрации:

МАВК – метод автоматического выделения клеток;

МДЦ – метод двойного центрифугирования

При оценке колониобразующей способности ПК до и после криохранения в группах МАВК и МДЦ статистически значимых различий выявлено не было.

Похожее исследование было выполнено во Франции в 2007 г., в котором был показан высокий уровень сохранения ядросодержащих и CD34<sup>+</sup>-клеток при обработке ПК с помощью МАВК — сохранение ядросодержащих клеток достигало 80%, CD34<sup>+</sup>-клеток — 86% [21]. Однако в данном исследовании не проводилась комплексная оценка всех биологических характеристик ПК до и после криохранения: клеточный состав, жизнеспособность ядросодержащих клеток, колониобразующая способность ГСК ПК.

До настоящего времени в отечественной литературе отсутствовали публикации о влиянии данных методов на биологические характеристики и качество криоконсервированной ПК после размораживания.

#### *Оценка качества ПК до и после криохранения в зависимости от уровня гематокрита*

Все размороженные образцы ПК были разделены на две группы в зависимости от инициального уровня гематокрита в криоконсервированной ПК: низкий уровень — от 12% до 39% (n = 286); высокий уровень гематокрита — от 40% до 69% (n = 314).

Процент сохранения ядросодержащих клеток ПК после хранения в группе с высоким уровнем гематокрита был выше 89,51±4,54%, чем в группе с низким уровнем — 84,83±4,98% (p = 0,01). При анализе мононуклеарных клеток, нейтрофилов и эритроцитов ПК до и после криохранения в зависимости от уровня гематокрита ПК статистически значимых различий выявлено не было.

При оценке жизнеспособности ядросодержащих клеток ПК (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) до и после криохранения в группах с низким и высоким уровнем гематокрита ПК достоверных различий также не было установлено. Процент сохранения CD34<sup>+</sup>-клеток в группе образцов с низким уровнем гематокрита был значимо выше, чем в группе с высоким уровнем гематокрита — 96,32±3,46% и 90,06±5,83% соответственно (p = 0,006).

При оценке колониобразующей способности ГСК ПК до и после криохранения было показано, что процент сохранения колониобразующей способности ГСК в группах с низким и высоким уровнем гематокрита статистически значимо не менялся.

Полученные нами данные противоречат аналогичному исследованию, проведенному в Испании, в котором было выявлено, что колониобразующая способность ГСК ПК с высоким уровнем гематокрита (45%) снижалась до 40% по сравнению с ПК с низким уровнем гематокрита (23%) — 64% [11].

#### *Оценка качества ПК до и после криохранения в зависимости от уровня гемоконсерванта CPDA*

Учитывая, что процентное содержание гемоконсерванта CPDA в каждом образце ПК индивидуальное, все размороженные образцы были разделены на две группы в зависимости от уровня гемоконсерванта: низкий уровень CPDA — от 15 % до 29% (n = 236); высокий уровень CPDA — от 30% до 60% (n = 364). Статистически значимых различий при оценке абсолютного количества ядросодержащих

клеток, нейтрофилов, эритроцитов ПК и процента их сохранения до и после криохранения в зависимости от концентрации гемоконсерванта CPDA выявлено не было. Также различий не было показано при сравнении количества жизнеспособных ядросодержащих клеток ПК после криохранения при различном содержании CPDA.

Процент сохранения CD34<sup>+</sup>-клеток ПК в группе с высоким уровнем CPDA был достоверно выше, по сравнению с группой с низким уровнем CPDA 99,0±0,3% и 88,5±0,6% соответственно (p = 0,012).

Колониобразующая способность ГСК ПК в группах с высоким и низким уровнем CPDA до и после криохранения статистически значимо не изменялась.

#### *Оценка качества ПК до и после криохранения в зависимости от сроков криохранения*

Все образцы ПК после изъятия из автоматизированной системы «BioArchive®» были разделены на две группы в зависимости от сроков криохранения: короткий — от 1 года до 3 лет (n = 352), длительный — 4 до 6 лет (n = 248).

При сравнении биологических характеристик ПК (клеточный состав, жизнеспособность (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>), количество CD34<sup>+</sup>-клеток и колониобразующая способность) в обеих группах статистически значимых различий не было выявлено, т.е. криоконсервированная ПК после криохранения в автоматизированной системе «BioArchive®» сохраняла свои биологические свойства (качество) независимо от срока хранения.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей. В исследовании, проведенном в Японии, было установлено, что стандартные протоколы криоконсервирования ГСК ПК в жидком азоте с использованием криопротектора ДМСО в конечной концентрации 10% и методов программного замораживания позволяют в течение десятилетия сохранять более 80% ядросодержащих клеток и 90% гемопоэтических стволовых клеток в жизнеспособном состоянии [22]. Эти данные были подтверждены в исследованиях Н.Е. Врохтмейер с соавт. (1999, 2009), которые показали также высокий процент сохранения ядросодержащих клеток ПК и клеток-предшественниц гемопоэза после 10, 15 и 24 лет хранения в жидком азоте [9, 22].

#### **Выводы**

1. Установлено, что качество криоконсервированной ПК после долгосрочного криохранения в системе «BioArchive®» сохраняется. Отмечается незначительное снижение количества ядросодержащих клеток и нейтрофилов; CD34<sup>+</sup>-клеток; колониобразующей способности ГСК ПК.

2. Криоконсервированная ПК, полученная методом автоматического выделения клеток после долгосрочного криохранения, содержит больше нейтрофилов и CD34<sup>+</sup>-клеток, по сравнению с криоконсервированной ПК, полученной методом двойного центрифугирования.

3. Криоконсервированная ПК с инициальным уровнем гематокрита от 12% до 39% после долгосрочного хранения содержит больше CD34<sup>+</sup>-клеток и меньше ядросодержащих клеток по сравнению

с криоконсервированной ПК с инициальным уровнем гематокрита от 40% до 69%.

4. Криоконсервированная ПК с инициальным уровнем гемоконсерванта CPDA от 30% до 60% после долгосрочного криохранения содержит больше CD34<sup>+</sup>-клеток и меньше мононуклеарных клеток, по сравнению с криоконсервированной ПК с инициальным уровнем CPDA от 15 % до 29%.

5. Показано, что качество криоконсервированной ПК после долгосрочного криохранения в системе «BioArchive®» не зависит от срока хранения.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* 1989; 321(17): 1174–78.
2. Gluckman E., Rocha V. Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis. *Blood cells, molecules, and diseases* 2004; 33(3): 271–3.
3. Gluckman E., Rocha V., Arcese W. et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Experimental Hematology* 2004; 32: 397–407.
4. Gluckman E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Blood reviews* 2011; 25(6): 255–9.
5. Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 44(10): 635–42.
6. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1995; 92(22): 10119–122.
7. Wagner J.E., Rosenthal J., Sweetman R. et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996; 88(3): 795–802.
8. Rocha V., Broxmeyer H.E. New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: S126–32.
9. Broxmeyer H.E., Cooper S., Hass D.M. et. al. Experimental basis of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 44(10): 627–33.
10. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. и др. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови. *Вопросы онкологии* 2000; 46: 513–20.
11. Querol S., Azqueta C., Garsia J. Effect of red blood cell content on progenitor function after Cryopreservation of cord blood buffy-coat products. *Abstracts of EBMT Conference, Montreux, 2002; p740: S202.*
12. Rubinstein P., Taylor P.E., Scaradavou A. et al. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* 1994; 20: 587–96.

#### Заключение

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало, что ПК, криоконсервированная в Московском банке стволовых клеток, после криохранения сохраняет свои биологические характеристики и практически не изменяет их после криохранения в автоматизированной системе «BioArchive®», является качественным альтернативным источником ГСК и может быть рекомендована к использованию в клинической практике.

13. Wagner J.E., Barker J.N., DeFor T.E. et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100: 1611–16.
14. Davies P. L., Baardsnes J., Kuiper M.J. et al. Structure and function of antifreeze proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2002; 357: 927–35.
15. Laughlin M.J., Eapen M., Rubinstein P. et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *New England journal of medicine* 2004; 351: 2265–75.
16. [http:// www.netcord.org/](http://www.netcord.org/)
17. Zinno F., Landi F., Aureli V. et al. Pre-transplant manipulation processing of umbilical cord blood units: Efficacy of Rubinstein's thawing technique used in 40 transplantation procedures. *Transfus. Apher. Sci.* 2010; 43(2): 173–8.
18. Miura J., Minegishi M., Itoh T. et al. Quality evaluation of umbilical cord blood progenitor cells cryopreserved with a small-scale automated liquid nitrogen system. *Cryobiology* 2008; 57(2): 178–81.
19. Бабийчук Л.А., Грищенко В.И., Зубов П.М. и др. Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядродержащих клеток пуповинной крови после криоконсервирования. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2010; 3: 77–81.
20. Карпова Н.С. Прогнозирование эффективности обработки пуповинной крови с трансплантационными целями [диссертация]. Санкт-Петербург: Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России; 2012.
21. Lapiere V., Pellegrini N., Bardey I. et al. Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy* 2007; 9(2): 165–9.
22. Mugishima H., Harada K., Chin M. et al. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 395–6.

Поступила 11.03.2013