

УДК 611.013.8.086.16:615.014.41



Прокопюк В. Ю., Прокопюк О. С., Мусатова И. Б., Шевченко Н. А., Роечко А. А., Терехова Е. А., Волина В. В.

Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, Харьков, Украина

e-mail: prokopyuk@mail.ru

ОЦЕНКА СОХРАННОСТИ ЭКСПЛАНТОВ ПЛАЦЕНТЫ, ПУПОВИНЫ И ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

РЕЗЮМЕ

Исследованы морфологическая сохранность и функциональное состояние эксплантов плаценты, пуповины и плодных оболочек человека методами витального окрашивания с помощью тестов восстановления МТТ и резазурина, уровня содержания глюкозы в среде инкубирования, активности лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы до и после криоконсервирования.

Установлено, что предложенная программа криоконсервирования сохраняет высокий уровень жизнеспособности эксплантов плаценты, пуповины и плодных оболочек, наиболее информативными методами оценки сохранности указанных биообъектов до и после криоконсервирования являются методы витального окрашивания, определения содержания глюкозы в среде инкубирования, МТТ-тест и тест восстановления резазурина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экспланты плаценты; пуповина; плодные оболочки; криоконсервирование тканей

Криоконсервирование клеток и ткани плаценты, пуповины и плодных оболочек приобретает все большую актуальность с развитием современной биологии и медицины. Описанные биообъекты могут быть использованы для получения стволовых клеток [14, 20] в эксперименте, тестировании фармпрепаратов [10], в аутобанкинге [17], для лабораторных исследований [7, 9]. Плодные оболочки используются в качестве скаффолдов для конструкций в тканевой инженерии [15, 16], как аллогraftы в реконструктивной хирургии [11, 18] и офтальмологии [13, 6]. В ряде исследований рассматривается целесообразность выделения клеток не из нативного, а из замороженного плацентарного материала [19], что значительно упрощает технологии низкотемпературного банкинга, исключая необходимость выделения клеток в короткие сроки после рождения последа. Показано, что клетки, выделенные как из нативной, так и из криоконсервированной плаценты сохраняют фенотип мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, способность к направленной дифференцировке и миграции в поврежденный орган [4, 5]. Проанализирована возможность выделения клеток из криоконсервированных эксплантов плаценты, проведена оценка структурной сохранности эксплантов [10, 21], однако не уделено внимания параметрам их функционального состояния. В связи

с изложенным вопросы оценки жизнеспособности плацентарных биообъектов до и после криоконсервирования по параметрам морфологической сохранности и функционального состояния остаются актуальными для биотехнологий низкотемпературного банкинга [2, 12]. Кроме того, методы криоконсервирования и оценки состояния тканей после размораживания требуют оптимизации и стандартизации [3, 8].

Целью работы является оценка сохранности эксплантов ткани плаценты, пуповины и плодных оболочек после криоконсервирования с определением наиболее информативных тестов оценки структур плаценты, находящихся в низкотемпературном банке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭКСПЛАНТОВ

Экспланты плаценты, пуповины и плодных оболочек получали после нормальных родов из 12 последев женщин в возрасте 18-35 лет после их информированного согласия с соблюдением норм био-медицинской этики в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации, Этического

кодекса врача Украины, Комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (ИПККиК НАН Украины). Послед доставляли в лабораторию через 1–3 часа после родов в условиях влажной камеры. Ткань плаценты с материнской стороны разделяли на фрагменты размером до 0,5 см и отмывали в среде *DMEM* (*BioWest*, Франция) в объеме 50 мл до прекращения выделения крови. Плодные оболочки разделяли на фрагменты размером 2×2 см; из пуповины удаляли сосуды, разделяли на фрагменты размером до 0,4 см, дважды отмывали в среде *DMEM*. Для культивирования использовали 15 мг эксплантов ткани плаценты, либо 30 мг эксплантов плодных оболочек, либо 30 мг эксплантов пуповины, которые помещали в 24-луночный культуральный планшет (*SPL*, Корея), добавляли 1 мл питательной среды *DMEM High Glucose w/o L-Glutamine, w/o Sodium Pyruvate* (*BioWest*, Франция) (далее – питательная среда) с 10% Fetal Bovine Serum (*Lonza*, Бельгия) (далее – FBS) и 1% раствора Антибиотик-антимикотик (*BioWest*, Франция). Соотношение массы экспланта с питательной средой было подобрано предварительно для соответствия исследуемых показателей пределам чувствительности применяемых методов. Экспланты культивировали в CO₂-инкубаторе (*ThermoScientific*, США) при температуре +37 °С и 5% CO₂.

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ЭКСПЛАНТОВ

В качестве среды для криоконсервирования использовали питательную среду с 10% диметилсульфоксидом (*Sigma-Aldrich*, США) (далее – ДМСО) и 10% FBS, для чего к эксплантам в среде добавляли равный объем среды с двойной концентрацией ДМСО и FBS. Экспозиция биообъектов в криозащитной среде составляла 10 минут при температуре +4 °С, после чего экспланты переносили в криопробирки (*Nunc*, США) объемом 1,8 мл, охлаждали при помощи программного замораживателя ЗП-10 (ИПККиК НАН Украины) со скоростью 1 град/мин до температуры -70 °С, затем погружали в жидкий азот для хранения при температуре -196 °С в течение 1–7 сут. Размораживание проводили при температуре +37 °С на водяной бане (*Micromed*, Украина). После размораживания ткань отмывали от криопротекторов в питательной среде в объеме 15 мл в течение 10 минут. В качестве положительного контроля использовали нативные экспланты, в качестве отрицательного – экспланты в среде без добавления ДМСО после их прямого погружения в жидкий азот и последующего размораживания.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СОХРАННОСТИ ЭКСПЛАНТОВ

Гистологическое исследование образцов проводили по стандартной методике [1] с окрашиванием препаратов гематоксилином и эозином. Каждый препарат исследовался в 10 полях зрения. Витальное окрашивание проводили по стандартной методике с использованием 0,01%-ного раствора нейтрального красного (*ПанЭко*, Россия) и 0,4%-ного раствора трипанового синего (*ПанЭко*, Россия) в течение 10 минут при температуре +37 °С с последующим отмыванием в фосфатно-солевом буфере (*BioWest*, Франция) (далее – PBS). При

изготовлении нативных препаратов плодных оболочек разделяли амниотическую и хориальную оболочки для изучения состояния амниотического эпителия. Использовали микроскоп Delta Optical NIB-100 (Польша) и программное обеспечение TourView V.3.7.1460.

МТТ-ТЕСТ

В 24-луночный культуральный планшет помещали 15 мг эксплантов ткани плаценты, либо 30 мг эксплантов плодных оболочек, либо 30 мг эксплантов пуповины, добавляли 0,5 мл питательной среды, 75 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл (*ПанЭко*, Россия) в PBS. Инкубировали 4 часа в CO₂-инкубаторе при температуре +37 °С с 5% CO₂; удаляли среду; из экспланта экстрагировали формазан в течение 30 мин при температуре +37 °С, добавляя 1 мл 96%-ного этилового спирта. После этого измеряли оптическую плотность (ОП) надосадка, окрашенного формазаном, на спектрофотометре PV 1251C (*Solar*, Белоруссия) при длине волны 590 нм.

ТЕСТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЕЗАЗУРИНА

В 24-луночный культуральный планшет помещали 15 мг эксплантов ткани плаценты, либо 30 мг эксплантов плодных оболочек, либо 30 мг эксплантов пуповины, добавляли 1,0 мл питательной среды, 200 мкл раствора резазурина в концентрации 0,15 мг/мл (*Синбиас*, Россия) в PBS. Инкубировали 24 часа в CO₂-инкубаторе при температуре +37 °С. Измеряли ОП на спектрофотометре PV 1251C (*Solar*, Белоруссия) при длине волны 570 нм.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛДГ, ЩФ И ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ ИЗ СРЕДЫ

Экспланты культивировали в течение 24 часов в 1 мл питательной среды по вышеописанной методике. Использовали коммерческие наборы «Лактатдегидрогеназа-L Liquid 100» (*Erba Lachema s.r.o*, Чехия), «Щелочная фосфатаза – MEG Liquid 50» (*Erba Lachema s.r.o*, Чехия), «Глюкоза Liquid 500 С» (*Erba Lachema s.r.o*, Чехия) в соответствии с инструкцией производителя. Измеряли ОП на спектрофотометре PV 1251C (*Solar*, Белоруссия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента для оценки гистологических изменений в полях зрения и U-критерия Манна-Уитни, для биохимических исследований при $p < 0,05$. Использовали программное обеспечение Statgraphics V 2.1.

Работа выполнена в рамках НИР «Исследование геропротекторного и геротерапевтического действия плацентарных биообъектов», № госрегистрации 0114U001319.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании препаратов положительного контроля эксплантов плаценты, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдали типичную структуру хориальных ворсин (рис. 1, а).

ИССЛЕДУЕМЫЙ ПРЕПАРАТ	ПРЕПАРАТ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ	ПРЕПАРАТ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ	ПРЕПАРАТ ПОСЛЕ ПРОГРАММНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ			
Ворсины без патологических изменений, % ворсин (M ± m)	93,1±7,1	–	75,5±8,2**
Разрушенные ворсины, % ворсин (M ± m)	2,3±0,4	89,5±5,7*	5,1±4,5**
Десквамация трофобласта, % ворсин (M ± m)	–	74,1±4,1*	11,4±1,7**
Пикноз ядер, % ядер (M ± m)	2,9±0,5	85,4±7,4*	17,3±5,8**
Разрывы мезенхимы, % ворсин (M ± m)	2,6±0,7	87,5±5,7*	24,0±2,8**

Таблица 1. Гистологические изменения структуры эксплантов плаценты после криоконсервирования (n = 120, по 10 полям зрения в 12 образцах)

Примечания:
* Достоверность различий с препаратом положительного контроля $p < 0,05$ ** Достоверность различий с препаратом отрицательного контроля $p < 0,05$

В отрицательном контроле наблюдали характерные криповреждения: необратимые изменения структуры, выражающиеся в разрушении терминальных ворсин, разволокнении коллагеновых волокон, разрывах соединительнотканной стромы, десквамации трофобласта и резком пикнозе ядер его клеток (рис. 1, g). В деконсервированных образцах плаценты общий вид препаратов по своей структуре был близок к положительному контролю. При этом в терминальных ворсинах плаценты в большинстве случаев отсутствовали патологические изменения. Изредка наблюдалось набухание коллагеновых волокон соединительнотканной стромы ворсин и разрывы мезенхимы, а также умеренная констрикция гемокapилляров. Не было выявлено повреждений эндотелия кровеносных сосудов. Клетки трофобласта имели более плотные ядра, наблюдалась их десквамация. Клеточные элементы соединительнотканной стромы ворсин сохранялись без видимых изменений (рис. 1, d). Ранее в литературе типичные криповреждения оценивались описательно [10], нами была предпринята попытка оценить их количественно для оценки степени криповреждения, результаты представлены в таблице.

При изучении витально окрашенных нативных препаратов эксплантов плаценты выявлялись единичные клетки, окрашенные трипановым синим и нейтральным красным, а также единичные случаи проникновения красителя в строму в большей части препарата, обусловленное, на наш взгляд, нарушением целостности трофобласта, его десквамацией (рис. 1, b, c). В отрицательном контроле наблюдали окрашивание трипановым синим и нейтральным красным всех клеточных элементов – как трофобластических, так и клеток стромы (рис. 1, h, i). В деконсервированных образцах наблюдали единичные окрашенные клетки, проникновение трипанового синего в строму, что может объясняться десквамацией трофобласта, выявленной при гистологических исследованиях (рис. 1, e, f).

Анализ эксплантов плаценты при помощи МТТ-теста выявил достоверное снижение показателя ОП отрицательного контроля. Показатели ОП положительного контроля и деконсервированных эксплантов плаценты не отличались между собой (рис. 2, a), что говорит о сохранности метаболической активности. При исследовании восстановления резазурина выявлено, что показатель ОП деконсервированных эксплантов плаценты значительно ниже показателя ОП положительного контроля, однако достоверно выше

показателя ОП отрицательного контроля (рис. 2, b). При изучении уровня глюкозы в среде инкубирования эксплантов плаценты показано, что содержание глюкозы в среде инкубирования образца отрицательного контроля соответствует содержанию, заявленному производителем, т.е. ткань можно считать нежизнеспособной. В среде инкубирования образца положительного контроля уровень глюкозы достоверно снижен, а в среде инкубирования деконсервированного образца он имеет тенденцию к снижению по сравнению с положительным контролем, что может свидетельствовать об интенсификации окислительного фосфорилирования после криовоздействия (рис. 2, e). В то же время концентрация глюкозы остается на довольно высоком уровне, что, на наш взгляд, свидетельствует о том, что ее концентрация в среде не является лимитирующим фактором для культивирования эксплантов на протяжении 24 часов. Одновременно продемонстрировано снижение активности щелочной фосфатазы после криоконсервирования (рис. 2, d). Достоверных изменений активности лактатдегидрогеназы не установлено (рис. 2, c), что может быть связано с удалением выделенной после разрушения мембран ЛДГ в процессе отмывки эксплантов.

При морфологическом исследовании плодных оболочек после криоконсервирования (рис. 3, d) выявлено отсутствие повреждений эпителия амниотической оболочки. Коллагеновые волокна соединительной ткани губчатого слоя хориальной оболочки были уплотнены, с редко расположенными между ними фиброцитами. Клетки трофобласта имели несколько уплотненную цитоплазму и небольшие ядра, между ними выявлялись макрофаги. В фибриноиде определялись единичные клетки трофобласта. В образцах отрицательного контроля (рис. 3, g) изменения были более выражены. Наблюдалось разрушение амниотического эпителия, уплотнение коллагеновых волокон волокнистой соединительной ткани губчатого слоя хориальной оболочки с редкими фиброцитами, слой трофобласта истончен, его клетки с пикнотичными ядрами располагались более кучно, макрофаги среди них не определялись. При этом морфологические изменения в оболочках были менее выражены, чем в ворсинах, что может быть связано с более плотной соединительнотканной стромой и меньшим количеством клеток.

При витальном окрашивании образцов положительного контроля амниотической оболочки как нейтральным красным, так

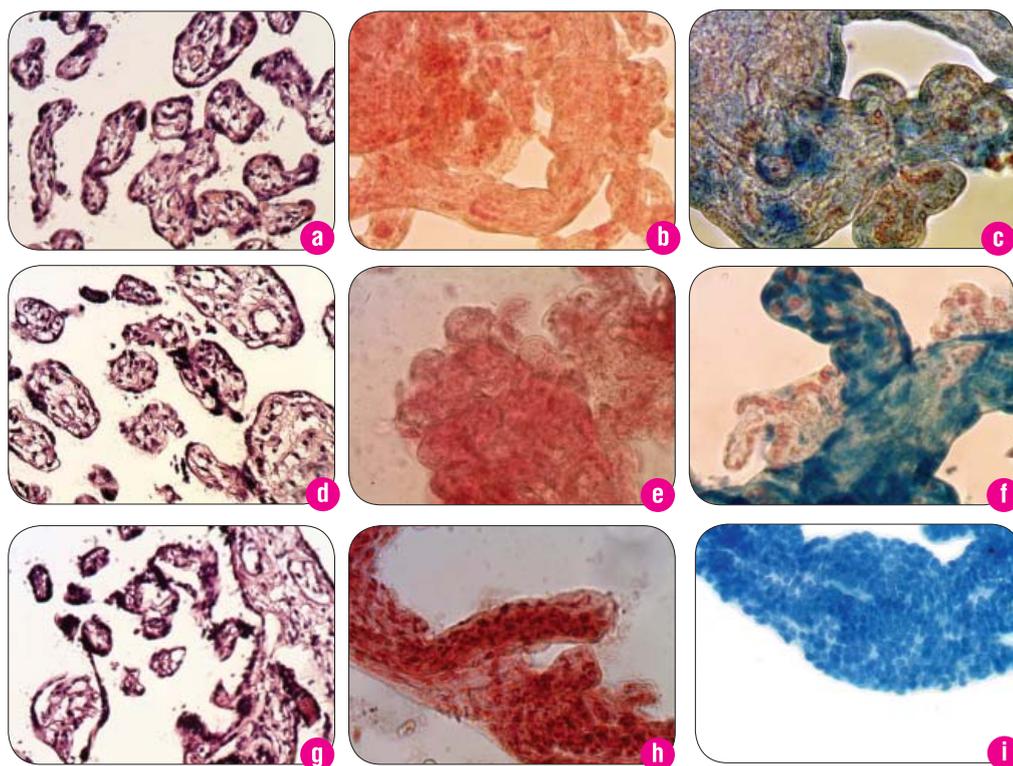
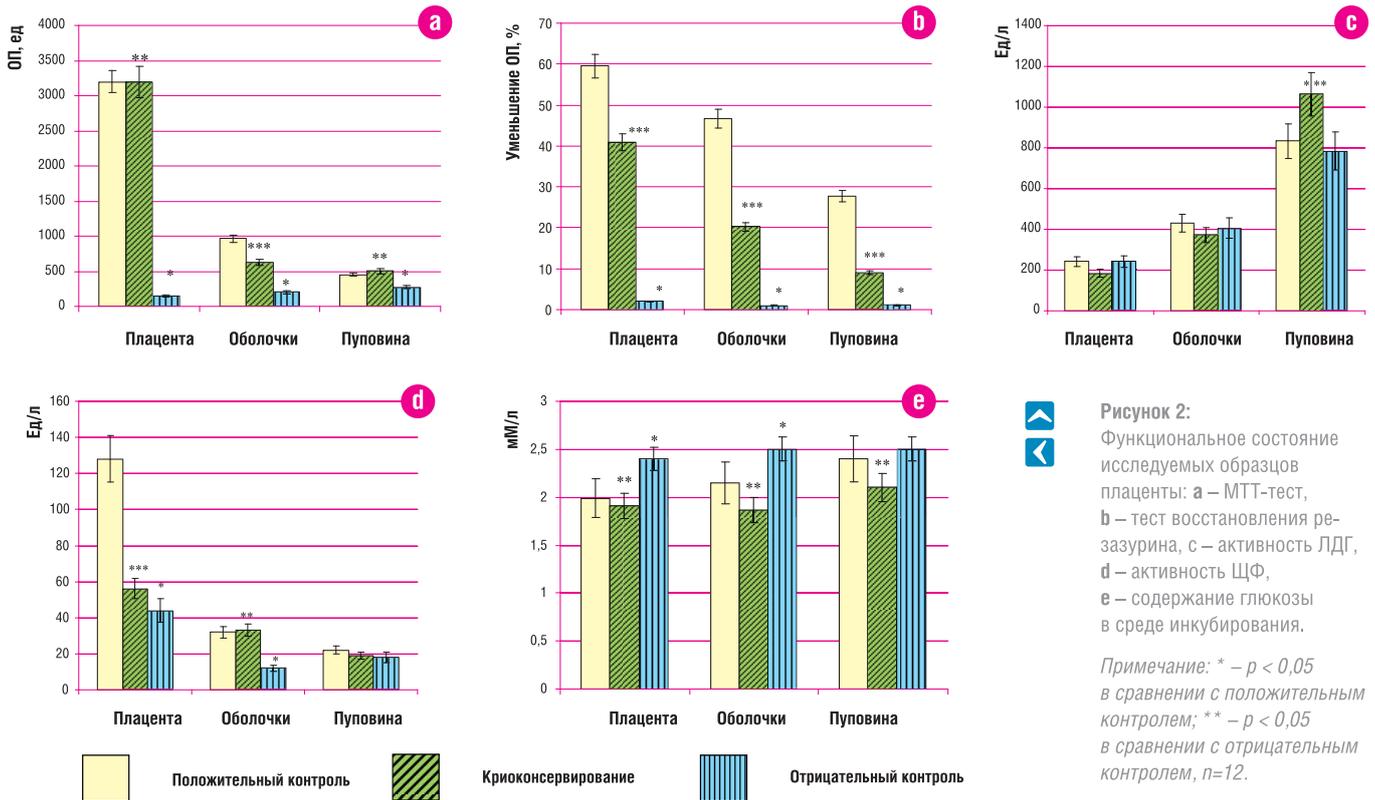


Рисунок 1: Микрофотографии гистопрепаратов эксплантов плаценты: a, b, c – образцы положительного контроля; d, e, f – образцы после криоконсервирования; g, h, i – образцы отрицательного контроля. Световая микроскопия, окраска геметоксилином и эозином (a, d, g); окраска нейтральным красным (b, e, h); окраска трипановым синим (c, f, i). Ув.×400.



и трипановым синим, окрашивалось $4,1 \pm 2,1\%$ клеток (рис. 3, b, c, $n=12$), после криовоздействия – $23,8 \pm 5,3\%$ клеток (рис. 3, e, f, $n=12$). Методы витального окрашивания позволили подсчитать количество жизнеспособных клеток. В образцах отрицательного контроля окрашивались все клетки, при этом окрашенными были в основном ядра, что, по нашему мнению, свидетельствует о значительных повреждениях клеточной мембраны и вымывании красителя (рис. 3, h, i). Витально окрашенные препараты хориальной оболочки ока-

зались неинформативны, т.к. многослойное строение ткани не позволило визуализировать взаимодействие красителя с отдельными клеточными структурами, в отличие от ворсин и амниотической оболочки, где визуализируются отдельные клетки.

Результаты МТТ-теста (рис. 2, a) и теста восстановления резазурина (рис. 2, b) достоверно различались для образцов отрицательного контроля, положительного контроля и деконсервированных образцов плодных оболочек. Такое отличие активности метаболизма

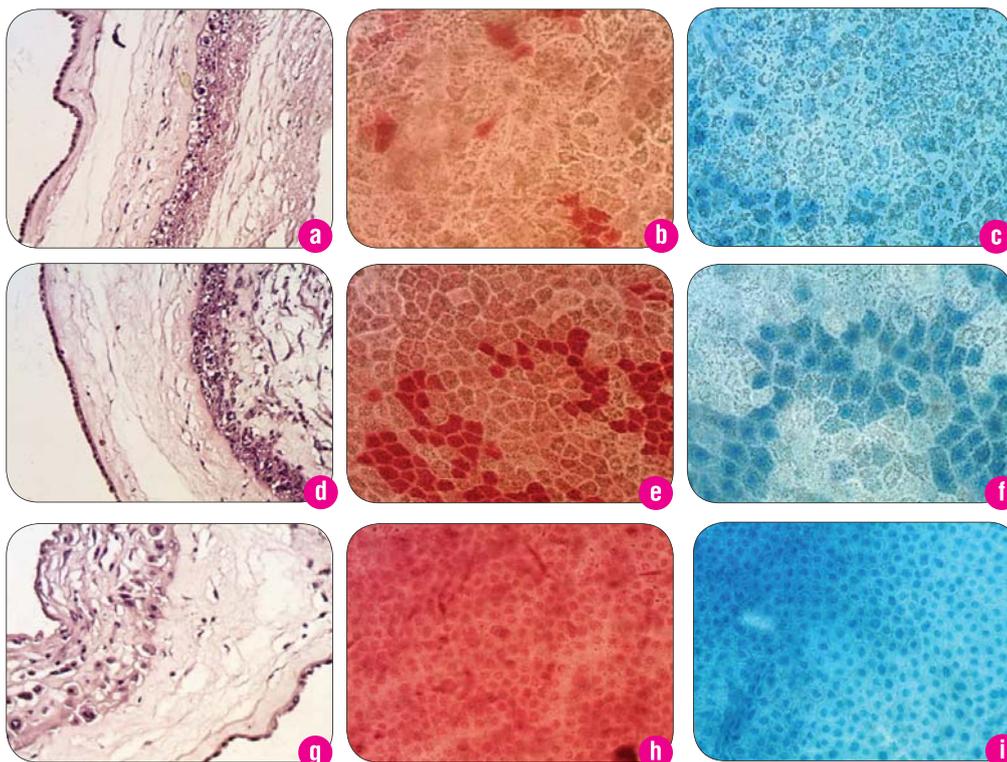


Рисунок 3:
 Микрофотографии гистопрепаратов эксплантов плодных оболочек: **a, b, c** – образцы положительного контроля; **d, e, f** – образцы после криоконсервирования; **g, h, i** – образцы отрицательного контроля. Световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином (a, d, g), ув.×200; окраска нейтральным красным (b, e, h), ув.×400; окраска трипановым синим (c, f, i), ув.×400.

в эксплантах плодных оболочек от эксплантов плаценты объясняется большей однородностью ткани плодных оболочек. Выделение сопоставимых эксплантов ткани плаценты сопряжено с техническими трудностями: в эксплант могут попадать ворсины разного порядка с разным содержанием фибриноида, что отражается на их активности, в то же время строение оболочек однородно при условии полного отделения от матки и сохранения их толщины. Для этого биообъекта были получены также достоверные данные изменения активности ЩФ (рис. 2, d) и концентрации глюкозы (рис. 2, e) в среде инкубирования, что свидетельствует о сохранности ткани после примененной программы криоконсервирования. Активность ЛДГ (рис. 2, e) достоверно не изменялась.

При криоконсервировании эксплантов пуповины выраженных морфологических изменений обнаружено не было, что связывали с большим количеством межклеточного вещества, богатого гиалу-

роновой кислотой, отмечали пикноз ядер и некоторое расширение межклеточных пространств. Результаты витального окрашивания эксплантов пуповины были неинформативны в связи с трудностью получения однослойных препаратов из гелеобразного биоматериала – Вартонова студня. Данные МТТ-теста (рис. 2, a) и теста восстановления резазурина (рис. 2, b) достоверно различались для деконсервированного образца, образцов положительного и отрицательного контролей, как и концентрация глюкозы в среде инкубирования (рис. 2, e). При изучении ферментативной активности эксплантов пуповины достоверных различий получено не было, что объясняется небольшим количеством клеток в образцах и особенностями межклеточного вещества. Кроме того, щелочная фосфатаза является более специфическим ферментом для клеток трофобласта, которые присутствуют в ткани плаценты и оболочек, но отсутствуют в Вартоновом студне пуповины.

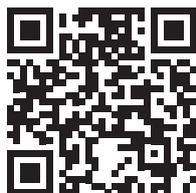
ВЫВОДЫ

Таким образом, криоконсервирование по разработанной методике позволяет сохранить структуру и метаболическую активность эксплантов ткани плаценты, пуповины и плодных оболочек. Наиболее информативными методами оценки исследованных эксплантов, как объектов низкотемпературного банка являются МТТ-тест, тест восстановления резазурина и поглощение глюкозы из среды инкубирования. Гистологическое исследование более информативно для ворсин плаценты. Витальное окрашивание может быть использовано, как экспресс-тест для тканей, отдельные клетки которых визуализируются в нативных препаратах: ворсин плаценты и амниотической оболочки. Исследование активности ЛДГ и ЩФ не дает достоверных результатов, что может быть обусловлено отмывкой эксплантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э. Основы гистологической техники [Текст] / Д. Э. Коржевский, А. В. Меркулов // СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
2. Создание криозащитных сред для сохранения эксплантов ткани плаценты [Текст] / И. Б. Мусатова, О. С. Прокопюк, В. В. Волина, та ін. // Biotechnologia acta. – 2013. – Вип. 6, № 6. – С. 132 – 138.
3. Криоконсервирование плаценты различной степени зрелости [Текст] / О. С. Прокопюк, А. Ю. Петренко, В. Ю. Прокопюк, та ін. // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 220.
4. Мезинхимальные и стромальные клетки из нативной и криоконсервированной плаценты человека: фенотип, мультипотентность и миграционный потенциал in vivo [Текст] / В. Шаблий, М. Кучма, В. Кирик, и др. // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, № 2. – С. 157-160.
5. Фенотипова характеристика культури клітин, одержаної із криоконсервованої тканини хоріона [Текст] / В. Шаблий, М. Кучма, В. Кирик, и др. // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5, № 2. – С. 76-85.
6. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing [Text] / C. L. Allen, G. Clare, E. A. Stewart, et al. // PLoS One. – 2013. – Vol. 30, № 8. – P. 1 – 15.
7. Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory analysis [Text] / F. Colleoni, A. J. Morash, T. Ashmore, et al. // Placenta. – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 122 – 123.
8. Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane/chorion tissue [Text] / M. Cooke, E. K. Tan, C. Mandrycky, et al. // J. Wound Care. – 2014. – Vol. 23, № 10. – P. 465 – 476.
9. Duration and method of tissue storage alters placental morphology – implications for clinical and research practice [Text] / A. Garrod, G. Batra, I. Ptacek, et al. // Placenta. – 2013. – Vol. 34, № 11. – P. 1116 – 1119.
10. Cryogenic and low temperature preservation of human placental villous explants. A new way to explore drugs in pregnancy disorders [Text] / B. Huppertz., V. Kivity, M. Sammar, et al. // Placenta. – 2011. – Vol. 32. – P. 65 – 76.
11. Cryopreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats [Text] / M. R. Kesting, D. J. Loeffelbein, L. Steintraesser, et al. // Ann. Plast. Surg. – 2008. – Vol. 60, № 6. – P. 684 – 691.
12. Storage and qualification of viable intact human amniotic graft and technology transfer to a tissue bank [Text] / R. Laurent, A. Nallet, L. Obert, et al. // Cell Tissue Bank. – 2014. – Vol. 15, № 2. – P. 267 – 275.
13. Preparation of amniotic membrane for ocular surface reconstruction [Text] / H. N. Madhavan, K. Priya, J. Malathi, et al. // Indian J Ophthalmol. – 2002. – Vol. 50, № 3. – P. 227 – 231.
14. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data [Text] / J. P. Martins, J.M. Santos, J. M. de Almeida, et al. // Stem Cell Res Ther. – 2014. – Vol. 5, № 19. – P. 1 – 15.
15. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells [Text] / H. Niknejad, T. Deihim, M. Solati-Hashjin, et al. // Cryobiology. – 2011. – Vol. 63, № 3. – P. 145 – 151.
16. Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: physical, morphological properties, and safety as the new biological material [Text] / M. Okabe, K. Kitagawa, T. Yoshida, et al. // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2014. – Vol. 102, № 3. – P. 862 – 870.
17. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource [Text] / C. Pipino, P. Shangaris, E. Resca, et al. // Br. Med. Bull. – 2013. – Vol. 105. – P. 43 – 68.

18. *Ravishanker R.* «Amnion Bank»- the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns [Text] / *R. Ravishanker, A.S. Bath, R. Roy* // *Burns*. – 2003. – **Vol. 29, № 4**. – P. 369 – 374.
19. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures [Text] / *E. A. Roselli, S. Lazzati, F. Iseppon, et al.* // *Cytotherapy*. – 2013. – **Vol. 15, № 11**. – P. 1340 – 1351.
20. *Taghizadeh R. R.* Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications [Text] / *R. R. Taghizadeh, K. J. Cetrulo, C. L. Cetrulo* // *Placenta*. – 2011. – **Vol. 32, № 4** – P. 311 – 315.
21. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane [Text] / *H. Thomasen, M. Pauklin, B. Noelle, et al.* // *Curr. Eye Res.* – 2011. – **Vol. 36, № 3**. – P. 247 – 255.



СТАТЬЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Авторы подтверждают отсутствие возможных конфликтов интересов.

Поступила в редакцию 19.03.2015 г.

Принята к печати 06.05.2015 г.