ЕДИНИЦИ КРЪВ ОТ ПЪПНА ВРЪВ – НАДЕЖДЕН ПРОДУКТ ЗА КЛЕТЪЧНА ТЕРАПИЯ

В. Атанасова, А. Михайлова и Е. Наумова

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска" – София

CORD BLOOD UNITS – RELIABLE CELLULAR THERAPY PRODUCT

V. Atanasova, A. Mihaylova and E. Naumova

Department of Clinical Immunology, University Hospital "Aleksandrovska" – Sofia

Резюме:

Кръвта от пъпната връв е ценен източник на хематопоетични стволови и прогениторни клетки, необходими за лечение на широк кръг от малигнени и немалигнени заболявания. Единиците кръв от пъпна връв за неродствена алогенна трансплантация се съхраняват в публични банки, чийто брой непрекъснато нараства в резултат на динамичното развитие в областта както в клиничен, така и в технологичен и организационен аспект. Получаването на готови за употреба висококачествени единици е пряко свързано с повишаването на ефективността на всички етапи от банкирането: събиране, обработка, изследване, съхранение, селекция и предоставяне за алогенна трансплантация. Освен това употребата на стволови и прогениторни клетки от кръв от пъпна връв отвъд границите на хематопоетичната реконституция е обект на активно проучване, особено в областта на регенеративната медицина.

Ключови думи: единици кръв от пъпна връв, банкиране на кръв от пъпна връв, алогенна трансплантация на кръв от пъпна връв, клетъчна терапия

Адрес за кореспонденция: *Валентина Атанасова, ККИ, УМБАЛ „Александровска", ул. „Св. Г. Софийски" № 1, 1431 София, тел. 02 9230 690, e-mail: v_atanasova2008@abv.bg*

Summary:

Cord blood is a valuable source of haematopoietic stem and progenitor cells applicable for the treatment of a wide variety of malignant and non-malignant diseases. Umbilical cord blood units intended for an unrelated allogeneic transplantation are stored in public banks, whose number is constantly growing due to the rapid development in both clinical and technological, as well as in organizational aspects. Obtaining of ready to use high-quality units is related directly to the high efficiency of all stages of cord blood banking: collection, processing, testing, storage, selection and releasing for transplantation. Furthermore, the use of cord blood stem and progenitor cells beyond the haematopoietic reconstitution is an objective of active research, especially in the field of regenerative medicine.

Key words: cord blood units, cord blood banking, allogeneic cord blood transplantation, cellular therapy

Address for correspondence: *Valentina Atanasova, M.D., Department of Clinical Immunology, University Hospital "Aleksandrovska", 1, Sv. G. Sofiyski St., 1431 Sofia, tel. +359 2 9230 690, e-mail: v_atanasova2008@abv.bg*

КРЪВ ОТ ПЪПНА ВРЪВ – ПЪРВИ ПРИЛОЖЕНИЯ

Първите публикации за колекция на кръв от пъпна връв (КПВ) се появяват през 50-те год. на XX в. и описват събирането на пробите кръв с диагностична цел. В тези проучвания кръвта е била изследвана за съдържание на аминокиселини, хематологични характеристики, нива на фибриноген и за проучване на имунитета към дифтерия [3, 9, 11, 28]. През 1979 г. е публикуван доклад, който обсъжда вземане на кръв от пъпна вена в хепаринизирана спринцовка [24]. Събраната кръв е култивирана и е изследван коагулационният статус за демонстриране безопасността на КПВ за лечение на ятрогенна загуба на кръв. През 1981 г. КПВ е използвана за откриване и диагностициране на неонатална бактериемия [25], а Molloy описва колекцията на КПВ в момента на раждането [21].

Наличието на сравнително зрели хематопоетични прогениторни клетки (ХПК) в кръвта на

човешката пъпна връв е демонстрирано от Knudtzon през 1974 г. [13]. Около десет години по-късно екипът на Ogawa документира примитивни ХПК в КПВ [15, 22]. Въпреки това до 1989 г. няма публикувани експериментални и клинични проучвания, показващи значимо клинично приложение на човешката КПВ.

През 1988 г. в Париж Gluckman и сътр. извършват първата трансплантация на КПВ. Реципиентът е младо момче с анемия на Fanconi, което е получило HLA съвместима умбиликална кръв от сестра си. В момента той е здрав и е излекуван от хематологичните прояви на анемията на Fanconi. Екипът на E. Gluckman съобщава за тази трансплантация през 1989 г. и същата година Broxmeyer и сътр. показват експериментални данни, че КПВ е богат източник на хемопоетични стволови/прогениторни клетки (ХСПК) [4]. Оттогава значително нараства интересът към употребата на КПВ като източник на ХСПК за трансплантация.

В сравнение с другите източници на хемопоетични стволови клетки за алогенна трансплантация кръвта от пъпна връв предлага значителни логистични и клинични предимства, като: 1) значително по-бързо осигуряване с налични съхранени криоконсервирани единици КПВ в сравнение с пациенти, получаващи трансплантат от неродствен костен мозък; 2) по-лесно намиране на съвместими единици КПВ поради толерантност от 1 до 2 HLA несъвместимости; 3) по-ниска честота и тежест на болестта на присадката срещу приемателя (Graft versus Host Disease, GVHD); 4) по-нисък риск от предаване на инфекции с латентни вируси, например CMV и EBV; 5) липса на риск за донора, 6) по-висока честота на редки хаплотипи в сравнение с регистрите за костен мозък, което е благоприятно в посока на етническите малцинства. Въпреки това основният проблем за използване на КПВ за трансплантация е ниският брой на хемопоетични стволови и прогениторни клетки в умбиликалната кръв в сравнение с костния мозък или мобилизирана периферна кръв, което води до забавено хемопоетично присаждане, забавяне на имунната реконституция и по-висок риск от инфекции в посттрансплантационния период.

Трансплантация на кръв от пъпна връв – актуално състояние

Към момента в световен мащаб са направени над 20 000 трансплантации на КПВ за лечение на същите видове малигнени и немалигнени заболявания, лекувани с трансплантация на костен мозък [5]. В рамките на злокачествените заболявания това са: остра и хронична миелоидна и лимфоидна левкемия, миелодиспластични синдроми [6,12], както и различни солидни тумори, наред с други малигнени заболявания. Немалигнените заболявания, които включват, но не са били ограничени до лечение с КПВ, са: увреждане на костния мозък, хемоглобинопатии [17], метаболитни нарушения [26], левкодистрофии [23] и първични имунодефицитни състояния [29]. Първата трансплантация на КПВ [10] и следващите [6] са били възможни благодарение на биологичните лабораторни проучвания, предложили кръвта от пъпна връв като потенциален източник на трансплантируеми хемопоетични стволови и прогениторни клетки [4]. Кръвта от пъпната връв е използвана за трансплантация на HLA съвместими и частично съвместими сиблинги, както и за родствени и неродствени HLA съвместими и частично съвместими алогенни трансплантации.

Публично банкиране – основни аспекти

Броят на публичните банки за кръв от пъпна връв непрекъснато нараства и в резултат на това броят на наличните единици КПВ за неродствена трансплантация се увеличава в световен мащаб. В допълнение към наличните почти 600 000 единици КПВ, съхранявани в над 30 страни (http://www.bmdw.org), е важно да се отбележи, че през 2009 г. броят на трансплантации на единици КПВ надвиши броя на трансплантациите на костен мозък. Въпреки това е необходима още много експериментална работа, за да се постигне по-голяма ефикасност на трансплантацията на КПВ. В тази връзка динамичното развитие в областта както в клиничен, така и в технологичен и организационен аспект, изисква непрекъснато обновяване на международните стандарти за събиране, преработка, изследване, банкиране, селекция и освобождаване на единици КПВ. Фондацията за акредитация на клетъчната терапия (Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, FACT), съвместно с Netcord имат за цел да насърчават качествени медицински и лабораторни практики в областта на клетъчната терапия и ежегодно публикуват измененията към Международните стандарти за КПВ. Основана през 1998 г., Netcord е международната банкова мрежа на Eurocord (Международен регистър за Европейската група за трансплантация на кръв и костен мозък), с мисия за насърчаване на висококачествено банкиране и клинично приложение на КПВ за алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки. С помощта на онлайн виртуален офис (http://www.netcord.org) единиците са на разположение за неродствена трансплантa-

ция. Над 30 публични банки за КПВ, най-вече европейски, са членове на Netcord и представляват почти 50% от наличните в света съхранени единици КПВ. Основната цел на стандартите е във всички етапи на банкирането да се постигане последователност в производството на висококачествени единици КПВ за трансплантация. За да бъде съобразена със стандартите, една банка за КПВ трябва да използва валидирани методи, консумативи, реактиви и оборудване. Трябва да се води всеобхватна, надлежно документирана програма за управление на качеството и проследяване на клиничните резултати при пациенти, които получават единици от тази банка. Процесът на акредитация включва представяне на писмена документация и проверка на място на събирането, обработката и складовите помещения. Акредитираните от Netcord-FACT банки се проверяват на всеки три години.

Всички практически аспекти на банкирането на КПВ, като например необходимостта да се получи информирано съгласие от майката, техники за колекция, етикетиране и идентифициране, изследвания за инфекциозни маркери, HLA типизиране, криоконсервация, транспорт и предоставяне, се обсъждат и публикуват активно. За разлика от това са проведени малко клинични проучвания, които са свързани с лабораторни аспекти на банкирането на КПВ, като например методи за редукция на обема, наличието на диметилсулфоксид и други.

Вземане на кръв от пъпна връв

Колекцията на КПВ се извършва, след като родилката е подписала информирано съгласие и е била определена като допустима за донорство чрез оценка на медицинската история, физикалното състояние и рисковите фактори. Изследване за инфекциозни заболявания се извършва на проби от майката и допълнително се тестват проби от единицата КПВ в зависимост от практиките на банката за КПВ. Изследвания за безопасност и характеризиране се извършват на проби от продуктите на КПВ, получени след обработката и преди криоконсервацията. Някои изследвания могат да се извършват върху проби, взети от единицата преди обработка. Стратегията за колекцията е първата стъпка за подобряване на качеството на единиците КПВ. Методите за колекция са се развивали с течение на времето в посока към по-безопасни продукти и по-високи добиви.

Вземането на КПВ може да се извършва *in utero* или *ex utero*. При първия метод кръвта се събира, докато плацентата все още е в матката и процедурата обикновено се извършва от акушер-гинеколог или акушерка в родилната зала. При втория кръвта се събира, след като плацентата е експулсирана от матката, като процедурата обикновено се извършва извън родилната зала. Обученият персонал изпълнява тази дейност в отделна стая, в близост до залата. Плацентата се повдига и се поставя на стойка, пъпната връв се почиства, пробожда се умбиликалната вена и кръвта се събира, като се използва гравитацията. И двете техники за събиране успешно се използват в различните банки.

Прецизиране на методите за колекция

С помощта на повишената ефективност на колекцията е възможно да се получават дози КПВ, достатъчни за трансплантация при възрастни. През годините са правени опити за редица технически подобрения в процеса на колекция. Разработена е затворена система за събиране, чиито ползи включват по-малък риск от микробно замърсяване и по-добро възстановяване на ядрените клетки, и особено на ХПК. Техниките за събиране целят оптимизиране на количеството и клетъчното съдържание на КПВ. Прилагано е комбиниране на *in utero* с последващо *ex utero* събиране, след перфузия на плацентата с физиологичен разтвор [30]. Тази перфузия измива остатъчната кръв от плацентарните съдове и увеличава общия добив на клетки, но подобни процедури са трудоемки и увеличават риска от бактериално замърсяване, поради което не се приемат като рутинна процедура.

Влияние на други фактори върху качеството на събраната кръв

В процеса на събиране на кръв от пъпна връв в световен мащаб са оценени някои променливи и не винаги се постига консенсус относно това дали и до каква степен различни фактори могат да повлияят качеството на продукта. Обсъжда се ролята на начина на раждане, теглото на плацентата, дължината на пъпната връв, неонаталното тегло и пол, възрастта на майката и гестационната седмица в контекста на получаване на по-високи добиви клетки в единица КПВ. Наше проучване [1] потвърждава данните на друга група, оценяваща променливите в единици КПВ, събрани при вагинални раждания и цезарово сечение, които сочат, че теглото на КПВ и броят на ядрените клетки значително нарастват при вагинални раждания и от бебета, по-тежки от 3100 g [18, 20]. Според някои доклади, концентрациите на хемопоетични стволови и прогениторни клетки корелират с пола на бебето, но резултатите са противоречиви [2, 18, 19]. Нашите изследвания показаха, че добивът клетки, теглото на събраната КПВ и броят на

CD34+ клетки не зависят от пола [1]. Данните са противоречиви и сравненията често са трудни, поради различия в оперативните процедури, модели за обучение на персонала, извършващ колекцията, и околната среда, в която продуктът се събира. Задължително условие е стандартизиране на колекцията и всички останали процедури, както и коректно събиране на данните, които ще се включват в проучването, за да могат да бъдат успешно приложени в анализа.

ОБРАБОТКА НА КРЪВ ОТ ПЪПНА ВРЪВ

Обработката на единици КПВ се извършва чрез мануални и автоматизирани методи. Мануалният метод обикновено се състои от изчерпване на червените кръвни клетки с хидроксиетил скорбяла (hydroxyethyl starch, HES) и на плазмата чрез центрофугиране. Тези методи отнемат много време и ако се извършат в открита система, могат да доведат до контаминация по време на обработката.

Една от първите платформи е PrepaCyte-CB система за обработка (BioE, Inc, Сейнт Пол, Минесота), използваща едноетапен процес за изолиране на мононуклеарни клетки. Технологията обединява седиментация чрез използване на гравитацията, заедно с центрофугиране. Докладвано е 87% възстановяване на ядрените клетки [16].

Няколко производители са разработили автоматизирани платформи за обработка на КПВ чрез използване на клетъчни сепаратори, контролирани с микропроцесор. Автоматизираните методи изискват по-малко технологично време и се осъществяват в затворена система, което намалява възможността за замърсяване на продукта и улеснява ефективните лабораторни операции. Автоматизираните методи също така гарантират и плътен обем на продукта за по-ефективно съхранение в течен азот.

Банкирането на КПВ започва през 1993 г. в Нюйоркския кръвен център, където е разкрита и първата публична банка за кръв от пъпна връв. По това време се е замразявал целият събран обем КПВ, включително червените кръвни клетки и плазмата. Големият обем на тези единици, състоящи се предимно от червени кръвни клетки, плазма и криопротектор, е проблем за банкирането, тъй като ресурсите за дългосрочно съхранение в течен азот са ограничени и скъпи. През 1995 г. Националната академия на науките на САЩ съобщава, че почти всички хемопоетични клетки, образуващи колонии, налични в единиците КПВ, могат да бъдат възстановени в обем от 20 ml с помощта на HES и центрофугиране за намаляване на по-голямата част от еритроцитите и плазмата [27]. След това концентрираните левкоцити бавно се смесват с криопротектор. Този метод скоро е приет от повечето други банки за кръв от пъпна връв. Резултатът е увеличение с до десет пъти на броя на единиците, които могат да се съхраняват в същото пространство, в зависимост от използваната система. През 1997 г. Pall Medical въвежда комплект със сакове за обработка, който опростява мануалния метод за намаляване на обема. Този комплект за обработка е улеснил работата и подобрил качеството на асептичните трансфери на КПВ от сака за колекция, през обработката, до крайния сак за замразяване. Автоматизираното намаляване на обема с Optipress (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) е въведено през 1999 г.

Системата Sepax (Biosafe, Eysins, Швейцария) е известна отскоро и е въведена в много банки за КПВ. Включва центрофужна система, състояща се от пневматична верига, вентилна система, микрокомпютър и LCD дисплей; комплект от тръбички, сакове и разделителна камера за еднократно използване, която служи едновременно като центрофужен контейнер и бутало за трансфер. Сепарираните течности (плазма, червени кръвни клетки и клетъчен концентрат) се придвижват през тръбичките до съответните сакове. Добавянето на HES към първичния материал улеснява автоматизираното концентриране и разделянето на фракции. Съобщава се възстановяване 80% за ядрените клетки и 86% за CD34+ клетки [14].

Системата AutoXpress (ThermoGenesis Corp, Rancho Cordova, Калифорния) е друг инструмент, използван за автоматизирана обработка. Това е компактно устройство, работещо с набор за еднократна употреба, който извършва намаляване на обема в стандартна центрофужна чаша, използвана в кръвните банки. Dobrila и сътр. описват 85% възстановяване на общите ядрени клетки [7].

Около 80% от съхранените до момента единици КПВ са обработени чрез мануални методи. Банките за кръв от пъпна връв по света започват да пренасочват обработката от мануални към автоматизирани методи. Преминаването към автоматизирана обработка се очаква да се увеличи, тъй като банките се стремят да изпълнят изискванията за безопасност, чистота и ефективност. Целта на автоматизираното обработване е да се стандартизират методите, за да се гарантира последователно и оптимално клетъчно възстановяване в рамките на стерилна обработка с набори за еднократна употреба, като същевременно се намалява манипулирането на продукта и времето за работа.

Криоконсервация и криопротективни разтвори

Способността за консервиране на продуктите за клетъчна терапия е от съществено значение за клиничната им полезност. Добър пример за необходимостта от криоконсервация е кръвта от пъпна връв, която може да се събира по всяко време на деня и нощта и се изпраща в течно състояние до банката за КПВ, където се преработва и замразява. Когато е необходима за клинична употреба, замразената единица може да се транспортира в замразено състояние до трансплантационния център, където се размразява и прилага на реципиента.

Профилите на контролирано стъпково замразяване са насочени към намаляване образуването на ледени кристали. Важно е да се отбележи, че оптималните протоколи за замразяване на култивирани клетки се различават от тези, отнасящи се до прясно изолирани клетки (култивираните клетки показват значителни промени във водния пермеабилитет). Увеличението на осмотичното налягане и резултатът от това увеличение върху клетките се контролират чрез добавяне на криопротективни разтвори към единицата кръв от пъпна връв, преди криоконсервация. Криопротективните разтвори обикновено съдържат три различни вида компоненти: хранителна среда или балансиран солеви разтвор, криопротективни агенти и протеини. Криопротективните агенти влияят както на клетките, така и на структурата на водата по начин, който защитава клетките. Глицеролът е често използван криопротективен агент, но най-широка употреба има диметилсулфоксид (ДМСО). Оптималната концентрация на ДМСО за криопротекция на хемопоетични стволови клетки е приблизително 10% [8]. Замразяването на единици кръв от пъпна връв с помощта на фризер за контролирано стъпково замразяване е широко приет метод от банките за КПВ с оглед осигуряване на максимална защита на хемопоетичните стволови клетки. Криосакът се защитава от счупване чрез затваряне в метална касета преди замразяването. Фризерът за стъпково замразяване се програмира в съответствие с желания протокол. Замразените проби обикновено се съхраняват в течен азот – в течната фаза или в азотните пари. Условията на съхранение оказват влияние върху стабилността на продукта и неговия срок на годност.

Валидиране на методите

Параметри като виталност, общи ядрени клетки, CD34+ и съдържание на колонии-образуващи единици (CFU) могат да бъдат анализирани чрез използване на различни техники и протоколи, което предполага вариации в характеристиката на продуктите от различни банки за КПВ. Например резултатите от броенето на ядрените клетки може да са различни, когато се извършват от автоматичен хематологичен анализатор или мануално. Анализът на CD34+ клетки може да се извършва по флоуцитометричен протокол за единична или двойна платформа и може да оцени само виталните клетки, или да се включат и невиталните. Резултатът от диференциалното броене може да се различава в зависимост от решението на специалиста, който го изпълнява. От друга страна, автоматичният инструмент може да извършва неточно отчитане, тъй като използваният алгоритъм се базира на морфологията на нормална периферна кръв. Изследването на виталността е от съществено значение за оценка на приложимостта на продукта. Тя може да изглежда по-висока, когато е оценена чрез използване на трипаново синьо, в сравнение с флоуцитометричния анализ и флуоресцентното оцветяване. Затова всички аналитични процедури, използвани в производствения процес на единици КПВ за трансплантация, изискват валидиране. Валидирането е процес на демонстриране, че процедурите са подходящи за тяхното предназначение и представя документирано доказателство, осигуряващо висока степен на сигурност, че определен процес неизменно произвежда продукт с определени спецификации и качествени характеристики. Валидирането се отнася и за всички асептични процеси на манипулация и за спомагателните системи, поддържащи процеса. В допълнение трябва да се извърши оценка на условията за пренасяне, включително на процедурата по предоставяне на единиците за трансплантация.

Единици кръв от пъпна връв – продукт за клетъчна терапия

Основните процедури и приложения, отнасящи се до производствения клиничен процес на продуктите за клетъчна терапия, и в частност – на единиците КПВ за трансплантация, включват общи положения при обработка и производство. Крайният произведен продукт трябва да бъде на разположение в обем, който е допустим за реципиента и следва да съдържа концентрации на антикоагулант, криопротектор или други добавки, които също са допустими. Целта на производителя или преработвателната секция следва да бъде предоставяне на продукт с възможно най-високо качество. Като минимум такъв продукт трябва да отговаря на изискванията за безопасност, чистота и ефективност. Контролираната среда е от съществено значение, в съответствие с приложимите регламенти и стандарти. Продуктът трябва да

се манипулира индивидуално, за да се предотврати замърсяване или объркване. Всички консумативи трябва да са стерилни и да е налице режим за проследяване, подходящ за тяхното предназначение. Използваните реагенти по време на обработката следва да бъдат качествени и годни за употреба. Отворените манипулации трябва да се извършват в класифицирана околна среда, като биологично безопасен кабинет.

От друга страна, всеки източник на материал за клетъчна терапия представя индивидуален профил на преработка. Описаните по-горе процедури на вземане, обработка, криоконсервация и съхранение в рамките на банкирането показват, че единиците КПВ са уникални сред продуктите, съдържащи хемопоетични стволови/прогениторни клетки за трансплантация, защото те не са събрани и обработени за конкретен получател, а са "складирани" и следователно могат да бъдат идентифицирани и осигурени за по-кратко време в сравнение с други източници на ХСПК.

Получаването на кръв от пъпна връв играе важна роля за предоставяне на ценен източник на клетки за лечение от материал, който някога е бил считан за биологичен отпадък. Доказаните предимства на този източник на стволови клетки и увеличаването на броя алогенни трансплантации на КПВ в световен мащаб допринасят за развитието и усъвършенстването на технологичните и клиничните аспекти на банкирането на КПВ. Освен това употребата на клетките от кръв от пъпна връв отвъд границите на хемопоетичната реконституция е обект на активно проучване, особено в областта на регенеративната медицина. Оптимизирането на процеса за получаване на най-много и най-качествени клетки продължава да е цел на много новатори в областта.

Библиография

1. Атанасова, В. К., М. Атанасова, А. Николов, В. Златков, А. Михайлова и Е. Наумова. Влияние на акушерските фактори върху качеството на единиците кръв от пъпна връв, предназначени за алогенна трансплантация. – Акуш. и гинекол., 51, 2012, 11-16.
2. Arovita, P. et al. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. – Transfusion, 45, 2005, 613-621.
3. Barr, M. A cord-blood survey of diphtheria immunity; comparison of 2 populations. – Lancet, 24, 1950, 1110-1112.
4. Broxmeyer, H. E. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1989, 3828-3832.
5. Broxmeyer, H. E. Umbilical Cord Blood Transplantation: Epilogue. J. E. Wagner. (Ed.). Seminars in Hematology, 47, 2010b, 97-103.
6. Broxmeyer, H. E. et F. O. Smith. Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation. – In: Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 4th ed., F. R. Appelbaum et al. (Eds.). West Sussex, Wiley-Blackwell, 2009, 559-576.
7. Dobrila, L. et al. ThermoGenesis AXP AutoXpress platform and bioarchive system for automated cord blood banking (abstract). Presented at the EBMT/ASBMT Tandem meeting, Honolulu, HI, February 16-20, 2006.
8. Fahy, G. M. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. – Cryobiology, 27, 1990, 247-268.
9. Gaehtgens, G. Hematology of the umbilical cord blood. – Arch. Gynakol., 178, 1950, 211-220.
10. Gluckman, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. – N. Engl. J. Med., 321, 1989, 1174-1178.
11. Halbrecht, I. et H. Brzoza. Evaluation of hepatic function in newborn infants by means of chemical study of cord blood. – Am. J. Dis .Child, 79, 1950, 988-995.
12. Hough, R. et V. Rocha. Transplant outcomes in acute leukemia. – II. Semin. Hematol., 47, 2010, 51-58.
13. Knudtzon, S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. – Blood, 43, 1974, 357-361.
14. Lapierre, V. et al. Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. A semiautomated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: A comparative study. – Cytotherapy, 9, 2007, 165-169.
15. Leary, A. G. et M. Ogawa. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. – Blood, 69, 1987, 953-956.
16. Long, G. D. et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. – Biol. Blood Marrow Transplant., 9, 2003, 772-780.
17. MacMillan, M. L., M. C. Walters et E. Gluckman. Transplant outcomes in bone marrow failure syndromes and hemoglobinopathies. – Semin. Hematol., 47, 2010, 37-45.
18. Mancinelli, F. et al. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. – Transplant. Proc., 38, 2006, 1174-1176.
19. McGuckin, C. P. et al. Cord blood revelations: the importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother! – Early Hum. Dev., 83, 2007, 733-741.
20. Mohyeddin Bonab, M. A. et al. Which factors can affect cord blood variables? – Transfusion, 44, 2004, 690-693.
21. Molloy, P. Collection of umbilical cord blood specimens at the time of delivery. – Midwives Chron, 95, 1982, 205.
22. Nakahata, T. et M. Ogawa. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. – J. Clin. Invest., 70, 1982, 1324.
23. Orchard, P. J. et J. Tolar. Transplant outcomes in leukodystrophies. – Semin. Hematol., 47, 2010, 70-78.
24. Paxson, C. L. Collection and use of autologous fetal blood. – Am. J. Obstet. Gynecol., 134, 1979, 708-710.
25. Polin, J. I. et al. Use of umbilical cord blood culture for detection of neonatal bacteremia. – Obstet. Gynecol., 57, 1981, 233-237.
26. Prasad, V. K. et J. Kurtzberg. Transplant outcomes in mucopolysaccharidoses. – Semin. Hematol., 47, 2010, 59–69.
27. Rubinstein, P. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, 10119-10122.
28. Schreier, K. et H. Stieg. Amino acid content of umbilical cord blood. – Z. Kinderheilkd., 68, 1950, 563-566.
29. Smith, A. R., T. G. Gross et K. S. Baker. Transplant outcomes for primary immunodeficiency disease. – Semin. Hematol., 47, 2010, 79-85.
30. Turner, C. W., J. Luzins et C. Hutcheson. A modified harvest technique for cord blood hematopoietic stem cells. – Bone Marrow Transplant., 10, 1992, 89-91.

Постъпил за печат на 11 март 2013 г.