

Обзор литературы

МЕТОДЫ БАНКИРОВАНИЯ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Куртова А.В., Зуева Е.Е., Фрегатова Л.М.

Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П.Павлова
Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ:

Пуповинная кровь является богатым источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и может быть использована для трансплантации при лечении многих генетических, гематологических и наследственных заболеваний. В течение последних десяти лет использование пуповинной крови в качестве источника ГСК для трансплантаций, особенно для детей, значительно возросло. К настоящему времени по всему миру проведено более 5000 трансплантаций пуповинной крови. По сравнению с другими источниками ГСК пуповинная кровь имеет ряд преимуществ, среди которых простая и безболезненная процедура сбора, возможность хранения полностью тестированных и HLA-типированных образцов, готовых к немедленному использованию, что сокращает время подготовки к трансплантации. В мире заготовлено уже более 175000 образцов пуповинной крови, но единого протокола обработки пуповинной крови для подготовки к долгосрочному хранению пока не принято. В данном обзоре представлены позитивные и негативные особенности различных методов уменьшения объема, удаления эритроцитов и подготовки к криоконсервации, применяемые при банкировании пуповинной крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пуповинная кровь, банкирование, сепарация, криоконсервация.

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

д.м.н., в.н.с. Зуева Екатерина Евгеньевна,
Научно-методический центр МЗ РФ по молекулярной медицине,
СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, ул. Льва Толстого, 6/8, Санкт-Петербург, 197089,
Тел. (812) 499-71-94, e-mail: dinzu@mail.ru, kurtov@sbor.net

CORD BLOOD BANKING METHODS

A.V.Kurtova, Ye.E.Zueva, L.M.Fregatova

Pavlov State Medical University

Saint-Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT:

Umbilical cord blood is a rich source of hematopoietic stem cells (HSC) and could be used in clinical settings for transplantation to treat a variety of genetic, hematologic and oncologic disorders. In the last decade, HSC transplantation using umbilical cord blood grafts has increasingly been utilized, especially for pediatric patients. To date, it is estimated that more than 5000 umbilical cord blood transplantation have been performed worldwide. UCB has the advantage over other HSC sources in that it can be relatively easily collected, tested, HLA-typed and then banked for immediate use, allowing shorter times to transplantation. Despite of more than 175000 banked cord blood units no standart protocol for cord blood processing for long-term storage was adopted. The aim of this review is to enumerate and to discuss advantages and disadvantages of different methods for sample volume reduction, erythrocytes removal and cryopreservation, using in banking process.

KEY WORDS: cord blood, banking, separation, cryopreservation.

CORRESPONDING AUTHOR:

Zueva Ye.E., M.D.,

Federal Center for molecular medicine,

Pavlov State Medical University,

6/8 Leo Tolstoy str., St-Petersburg, 197089, Russia.

Tel: +7 (812) 499-71-94, dinzu@mail.ru, kurtov@sbor.net

Трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) успешно применяют уже в течение 30 лет для лечения пациентов с гематологическими и негематологическими заболеваниями, среди которых: острые и хронические лейкозы, миелодиспластический синдром, миеломная болезнь, болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, солидные опухоли (нейробластома, ретинобластома), остеопетроз, липосаркома, гемоглобинопатии, тяжелые комбинированные иммунодефициты, врожденные нарушения метаболизма и аутоиммунные заболевания [1]. Аутологичные трансплантации ГСК обычно применяют для лечения лимфом и миеломной болезни. Для пациентов с лейкозами, некоторыми наследственными заболеваниями и нарушениями метаболизма во многих случаях предпочтительнее проведение аллогенных трансплантаций

Основными источниками ГСК для трансплантации являются костный мозг, мобилизованная периферическая кровь и пуповинная кровь человека. Выбор аллогенного донора обычно ограничен членами семьи (родственные трансплантации), добровольными донорами ГСК или неродственными образцами пуповинной крови. Несмотря на значительное развитие международных регистров добровольных доноров, пока менее 50% потенциальных реципиентов могут найти подходящего неродственного донора [2]. Кроме того, поиск донора – это достаточно длительный и дорогостоящий процесс [3].

Использование пуповинной крови в качестве источника ГСК для трансплантаций получило значительное распространение в последние десять лет, особенно в практике лечения педиатрических пациентов. В настоящее время в мире проведено более 5000 трансплантаций пуповинной крови [1], 6 трансплантаций проведено в России [4].

Пуповинная кровь как источник ГСК обладает рядом преимуществ, среди которых:

- быстрая и безболезненная процедура сбора;
- возможность получения и длительного хранения аутологичных, родственных и неродственных аллогенных образцов, тестированных и HLA-типированных, непосредственно готовых к использованию;
- сниженная вероятность развития острой и хронической формы реакции-трансплантат-против-хозяина;
- возможность проведения трансплантаций с неполной HLA-совместимостью;
- сниженная вероятность вирусной контаминации трансплантата;
- возможность получения образцов от представителей редких этнических меньшинств и детей от смешанных браков.

Повышение частоты использования пуповинной крови в качестве источника ГСК привело к необходимости создания специальных хранилищ - банков пуповинной крови, в которых образцы сохраняют в течение длительного времени без потери

трансплантационного потенциала. В отличие от регистров типированных добровольных доноров костного мозга, в которых есть только информация о потенциальных донорах, банки пуповинной крови содержат реальные образцы, готовые к трансплантации непосредственно после размораживания. Необходимо отметить также, что важной особенностью банкирования является отсутствие риска отказа доноров, тогда как в регистрах ежегодная потеря доноров составляет около 7% [1].

К началу 2005 года в мире заготовлено более 175000 образцов пуповинной крови в 35 банках в 21 стране [1,5]. Процедура банкирования состоит из трех основных этапов: получение информированного согласия матери, сбор и подготовка к хранению образца пуповинной крови.

1. Получение информированного согласия матери на сбор пуповинной крови.

Мать дает информированное согласие на сбор пуповинной крови ребенка обычно до родов или в течение 24 часов после сбора пуповинной крови. В США в некоторых банках практикуют трехэтапную процедуру получения информированного согласия: до родов, после родов и через шесть месяцев после родов [6].

2. Сбор пуповинной крови

Сбор пуповинной крови осуществляют после срочных родов естественным путем или кесарева сечения. В большинстве центров пуповинную кровь собирают после отхождения последа (ex utero), такой сбор может быть осуществлен вне родовой палаты специально обученным персоналом. Возможно проведение сбора пуповинной крови при нахождении плаценты в полости матки (in utero). Данный способ позволяет собрать больше лейкоцитов, но требует присутствия дополнительного персонала при родах. В основном для сбора предпочитают использовать закрытые стерильные контейнеры для донорской крови с внесенным антикоагулянтом и дренажной иглой [7].

3. Подготовка образца к хранению

Перед помещением на хранение полученный образец пуповинной крови и кровь матери тестируют на стерильность, проводят серологические исследования на наличие антител к *Treponema pallidum* и *Toxoplasma gondii*, а также проводят исследования на присутствие вирусов гепатита В и С, иммунодефицита человека, Т-клеточного лейкоза, цитомегаловируса и вируса Эпштейна-Барр, т.е. выполняют все требования приказа МЗ и СР Российской Федерации №325. Возможно проведение скрининга образца пуповинной крови для выявления гемоглинопатий и других заболеваний крови, а также некоторых генетических патологий при отягощенном семейном анамнезе. Затем проводят HLA-типирование образца и учет содержания лейкоцитов, ГСК и КОЭ-ГМ. На следующем этапе подготовки проводят удаление плазмы и эритроцитарной фракции из образца, позже

к выделенной фракции лейкоцитов добавляют необходимые криопротекторы и помещают в жидкий азот.

Объем крови, которую получают из пуповины, в среднем составляет не более 100 мл. [3]. Многие центры, осуществляющие банкирование пуповинной крови, предпочитают выделять для дальнейшего замораживания только фракцию лейкоцитов, уменьшая таким образом объем пробы (в среднем до 20 мл) и расход криопротектора, что значительно снижает стоимость хранения образца в жидком азоте [7]. Удаление эритроцитов позволяет снизить риск развития реакции несовместимости по эритроцитарным антигенам [3]. Известно также, что криоконсервация вызывает разрушение эритроцитов, продукты лизиса которых могут быть токсичными для реципиента, поэтому на длительное хранение обычно помещают только ядросодержащие клетки [7]. Querol et al. исследовали две группы образцов пуповинной крови: с уровнем гематокрита выше 45% и менее 23% и выявили, что клоногенная активность и жизнеспособность ГСК образцов первой группы после размораживания значительно ниже, чем образцов второй группы, что подтверждает необходимость удаления эритроцитов перед долгосрочным хранением [8].

Фракции плазмы и эритроцитов, удаленные в процессе сепарации, в дальнейшем могут быть использованы для серологических исследований, позволяя не отбирать для этого aliquоты цельной пуповинной крови, что важно, учитывая ограниченный объем образцов.

При планировании подготовки пуповинной крови к криоконсервации особое внимание уделяют следующим факторам:

- Процедуры удаления эритроцитов и редукции объема не должны приводить к значительным потерям ГСК;
- сепарированные образцы затем будут трансплантированы пациенту, поэтому необходимо свести к минимуму токсичность агентов, используемых для сепарации;
- образцы после сепарации помещают на длительное хранение, поэтому агенты, используемые для сепарации, не должны негативно влиять на ГСК при криоконсервации;
- при проведении сепарации количество используемых емкостей, с которыми контактируют образцы, должно быть минимальным, чтобы снизить риск бактериальной и фунгальной контаминации, а также снизить риск ошибки в идентификации образца.

Удаление эритроцитов можно проводить с помощью лизирующих растворов, содержащих хлорид аммония. Сохранность ГСК после лизиса эритроцитов достаточно

высока, однако данный способ не применяют при банкировании в связи с необходимостью использовать очень большие объемы реагентов. Этот метод оправдан при обработке небольших объемов крови для лабораторных и диагностических исследований [9].

Для удаления эритроцитов и плазмы образец можно фракционировать методом простого центрифугирования (эффективно при обработке непосредственно после получения) или с помощью градиентов плотности [10].

Сепарация в градиенте плотности, где в качестве основы используют фиколл (Ficoll-Нураке) с плотностью $d=1,077$ г/мл или перколл (Percoll) с плотностью $d=1,069$ г/мл, является одним из наиболее распространенных методов сепарации при лабораторных исследованиях. Сохранность ГСК после сепарации в градиенте плотности составляет 92%, а потеря клеток при использовании перколла меньше, чем при использовании фиколла [7]. Использование перколла с плотностью 1,080 г/мл позволяет уменьшить объем пробы пуповинной крови до 10 мл, а содержание ГСК в таком объеме достаточно для проведения трансплантации пациенту с весом менее 10 кг [11]. Использование градиентов плотности растительного происхождения позволяет удалить значительное число эритроцитов, однако при последующей криоконсервации вещества полисахаридной природы могут приводить к осмотическому шоку и гибели ГСК. Важными недостатками данного метода является его длительность (около 2,5 часов) и необходимость использования промежуточных емкостей, прямо контактирующих с биологическим материалом, что повышает вероятность контаминации образца.

Для седиментации и последующего удаления эритроцитов могут быть использованы такие агглютинирующие вещества, как желатин, полиглюкин и гидроксипропилкрахмал. Седиментация с помощью 3% раствора желатина позволяет сохранить до 86% ГСК и удалить 96,4% эритроцитов, эта процедура занимает меньше времени, чем сепарация в градиенте плотности: 1,5 часа вместо 2,5 [9,12]. Несмотря на значительный уровень деплеции эритроцитов и высокую сохранность ГСК, серьезной проблемой является способ получения желатина. Желатин – вещество ксеногенного происхождения, которое перед использованием не тестируют на присутствие инфекционных агентов. После криоконсервации желатин очень сложно удалить, поэтому в медицинской практике трансплантаций отказались от его использования для подготовки образцов пуповинной крови к хранению.

Полиглюкин также используют для осаждения эритроцитов в образцах пуповинной крови. При оптимальном соотношении полиглюкина и пуповинной крови 1:1 уровень

деплеции эритроцитов составляет около 97%. Важно отметить, что после использования полиглюкина нет необходимости проведения отмывок образцов [10].

Наиболее распространенный метод неавтоматической сепарации пуповинной крови, предложенный Rubinstein et al. в 1995 году [7], основан на ускорении седиментации эритроцитов при добавлении 6% гидроксиэтиленкрахмала. После удаления осевших эритроцитов получают надосадок, обогащенный лейкоцитами. Последующее центрифугирование (400×g, 15 минут) позволяет осадить клетки и удалить плазму, уменьшая объем пробы. Сохранность ГСК при использовании данного метода составляет 87,4%, а его стоимость в 2,2 и 4,1 раза ниже, чем стоимость методов, основанных на применении перколла и фиколла соответственно [13].

Современным направлением фракционирования пуповинной крови является использование систем фильтров и автоматических сепараторов. В системе StemQuick™ (Asahi Medical, Japan) в качестве фильтра используют многослойный нетканый полиэтилен терефталат, покрытый гидрофильным полимером. При фильтрации крови с внесенным антикоагулянтом эритроциты и тромбоциты проникают через поры в собирающий (стоковый) контейнер, а фильтр задерживает лейкоциты. На втором этапе потоком жидкости (раствор на основе альбумина сыворотки человека и декстрана 40 в соотношении 3:16) ядродержащие клетки смывают с поверхности фильтра в специальный контейнер. Вся система состоит из иглы для присоединения объема с пуповинной кровью, промежуточной камеры, лейкоцитарного фильтра, отверстия для поступления промывающего раствора и двух контейнеров. Данный метод позволяет выделить 79,5% лимфоцитов, средняя длительность процедуры – 30 минут [14]. В опытах с NOD/SCID мышами при исследовании приживления ГСК, полученных в результате фильтрации пуповинной крови, не было обнаружено различий по сравнению с приживлением ГСК из образцов цельной пуповинной крови [15].

Компактный автоматический клеточный сепаратор Sepax System (Biosafe, Switzerland) используют во многих банках пуповинной крови. Все этапы обработки контролирует микропроцессор. Образцы пуповинной крови помещают в сепарационную камеру, где после центрифугирования получаемые фракции поступают в разные контейнеры, причем лейкоциты поступают непосредственно в контейнер для криоконсервации [16]. Главными преимуществами автоматической сепарации являются ее закрытость и минимальная трудоемкость. Среднее время автоматической сепарации – 15-20 минут, а стандартного центрифугирования – от 60 до 80 минут. Автоматический сепаратор позволяет уменьшить объем образца в среднем на 70%, выделить более 88% лейкоцитов и более 97% CD34⁺ ГСК [17].

При криоконсервации с использованием криопротекторов основное внимание обычно уделяют следующим факторам:

- осмотическим повреждениям клеток вследствие внесения/удаления криопротектора;
- химической токсичности используемого криопротектора по отношению к ГСК, и в последующем по отношению к реципиенту;
- взаимному влиянию конечной концентрации криопротектора и скорости замораживания на сохранность ГСК.

Большинство лабораторий используют криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО является относительно нетоксичным веществом для ГСК. При хранении ГСК костного мозга с ДМСО в конечной концентрации 10% в течение 60 минут при +37°C снижения клоногенной активности клеток выявлено не было [18]. При исследовании ГСК пуповинной крови, инкубированных с ДМСО в конечной концентрации 25% в течение 60 минут при +2°C и при +20°C, в обоих случаях было выявлено достоверное ($p < 0,01$) влияние на целостность мембраны и клоногенную активность. У образцов, которые хранили при +20°C, клоногенная активность была снижена на 30% по сравнению с образцами, инкубированными при +2°C. Химическая токсичность ДМСО для ГСК, видимо, зависит от температуры, времени хранения, а также от концентрации криопротектора [19].

Добавление ДМСО является экзотермической реакцией, поэтому внесение охлажденного криопротектора рекомендовано проводить на ледяной бане [20]. Время внесения криопротектора не оказывает существенного влияния на сохранность ГСК, что было доказано в опытах по добавлению ДМСО в течение 15-30 секунд, 5 минут и 15 минут. Обязательным условием является только постоянная скорость внесения [7, 20, 21]. Применение ДМСО не исключает возможности использования дополнительных криопротекторов и биоантиоксидантов, таких как:

- аутологичная сыворотка [22],
- бычий сывороточный альбумин [23],
- пропилен гликоль [21],
- гидроксиэтиленкрахмал [24],
- трегалоза, естественный криопротектор для криофильных организмов [25],
- мембранный стабилизатор таурин [26],
- биоантиоксиданты: α -токоферол ацетат, аскорбиновая кислота и каталаза [26].

Конечная концентрация ДМСО 10% признана наиболее эффективной для защиты ГСК при криоконсервации [12]. Снижение концентрации ДМСО до 2,5-5% приводит к

значительным потерям ГСК после размораживания [24]. Внесение ДМСО в конечной концентрации выше 10% (20% и более) не приводит к повышению сохранности ГСК, но может оказывать отрицательное влияние на реципиента [19].

Существуют коммерческие разработки, позволяющие автоматизировать процесс подготовки лейкоцитарной фракции к криоконсервации. Например, Coolmix Device – система для охлаждения и смешивания лейкоцитов образца, полученных после сепарации с использованием Seraх, с криопротекторами. Лейкоциты, помещенные непосредственно в контейнер для замораживания, охлаждают до +4°C в течение 10 минут и вносят смесь ДМСО/декстран, что позволяет сократить время и минимизировать клеточные потери на этапе подготовки к криоконсервации [27].

Скорость замораживания может оказывать существенное влияние на восстановление ГСК после криоконсервации. Очень быстрое замораживание (100°C/мин) приводит к гибели более 95% клеток. При очень медленном замораживании (0,1°C/мин) доля жизнеспособных клеток составляет около 25%. Наиболее оптимальной признана скорость 1-2,5°C/мин [19]. Также было показано отсутствие достоверных различий по жизнеспособности ГСК, замороженных со скоростью 1°C/мин и 5°C/мин [24]. В связи с этим, в большинстве лабораторий и во многих банках замораживание проводят по следующей схеме: 1°C/мин до -20°C (-40°C), 4°C/мин до -50°C или -80 °C, после чего образцы помещают в жидкий азот (-196°C) [7, 28].

Наиболее востребованной коммерческой системой для долгосрочного хранения пуповинной крови является BioArchive®System (Thermogenesis Corp., USA), которая рассчитана на одновременное хранение 3626 образцов. Основным преимуществом данной системы можно считать закрытость процедур помещения образцов на хранение, собственно хранения и извлечения образцов, что исключает поступление внешнего тепла к уже находящимся в жидком азоте образцам. Известно, что кратковременные повышения температуры, которые возникают при открытии обычного сосуда для хранения жидкого азота, могут значительно снижать жизнеспособность клеток в помещенных на хранение образцах. Благодаря наличию в BioArchive®System специальных автоматических рук, оснащенных крюком для захвата и устройством для считывания идентификационного кода, образец можно помещать сначала в специальный переходный модуль, а затем, изолировав от других образцов, извлекать из аппарата.

Современным направлением исследований в области длительного хранения ГСК является разработка методов лиофильной сушки (freeze-drying). Поливинилпирролидон (PVP) в конечной концентрации 40% добавляют во фракцию моноклеаров пуповинной крови. Данное вещество обладает мощным гигроскопическим действием. Затем

добавляют сахарозу в конечной концентрации 20% и маннитол или бычий сывороточный альбумин в конечной концентрации 10%. Полученную смесь замораживают до температуры -30°C и проводят первый этап вакуумной сушки. Второй этап проводят при температуре 15°C . Вся процедура занимает около 52 часов. Высушенные образцы перед использованием разводят в растворе на основе изотонического фосфатно-солевого буфера. Жизнеспособность мононуклеаров после подобной обработки составляет около 75% при использовании маннитола и около 98% при использовании БСА, сохранность ГСК - около 69% [29].

Перед размораживанием контейнеры с образцами рекомендуют оставлять в течение 15 минут в парах азота, а затем в течение 5 минут держать при комнатной температуре, чтобы пластик приобрел эластичность [7]. Непосредственно размораживание образцов проводят на водяной бане при температуре $+37$ - $+40^{\circ}\text{C}$ в течение 2-3 минут. Данная процедура может приводить к агрегации и повреждению клеток, особенно гранулоцитов, что вызывает высвобождение ДНК, поэтому некоторые авторы рекомендуют при размораживании вносить ДНКазу [22].

Отмывку от гипертонического криопротектора и лизированных эритроцитов, не удаленных при сепарации, проводят сразу после размораживания поэтапно с использованием растворов на основе фосфатно-солевого буфера, декстрана-40 и сорбитола [7, 30], а также с использованием среды RPMI [31]. По данным Laroche et al. [32], отмывка вносит основной вклад в потерю лейкоцитов после криоконсервации, но не приводит к значительным потерям CD34^{+} ГСК.

Банкирование пуповинной крови успешно развивается во многих странах, в том числе и в России. Банки пуповинной крови работают как на добровольной (non-for-profit), так и на коммерческой (for-profit) основе [33]. Первые предоставляют материал в основном для неродственных аллогенных трансплантаций по запросам различных медицинских центров, а вторые за плату заготавливают и хранят кровь конкретного человека для осуществления аутологичной или родственной аллогенной трансплантации в случае необходимости.

Создание банка пуповинной крови требует значительных финансовых вложений, и даже коммерческие банки не всегда могут позволить себе закупку автоматизированных систем для заготовки пуповинной крови. Поэтому, несмотря на распространение и постоянную разработку новых технических средств, предназначенных для совершенствования технологии банкирования пуповинной крови, например, AXP™ System (Thermogenesis Corp, USA), методы не/полуавтоматической сепарации и криоконсервации остаются достаточно востребованными.

Исследование частично поддержано грантом Конкурсного Центра
Фундаментального Естествознания № М05-2.6Д-71.

Благодарности.

Авторы выражают признательность директору НМЦ по молекулярной медицине МЗ РФ д.м.н., профессору А.А.Тоголяну и сотрудникам Клиники трансплантации костного мозга (руководитель д.м.н., профессор Б.В.Афанасьев) Е.В. Бабенко и М.А.Эстриной за научное консультирование и высказанные критические замечания.

Литература.

1. Watt S.M., Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential // *Seminars in fetal and neonatal medicine.*-2005.-Vol.10.-P.209-220.
2. Grewal S.S., Barker J.N., Davies S.M., Wagner J.E. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord? // *Blood.*-2003.-Vol.101, №11.-P.4233-4244.
3. Стрижаков А.Н., Мхеидзе Д.М., Тимохина Е.В., Гришина В.В. Пуповинная кровь – источник стволовых клеток // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.*-2003.-Т.2, №4.-С.33-37.
4. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Дышлевая З.М., и др. Трансплантация пуповинной крови у детей с различными заболеваниями // *Материалы конференции “Биотехнология и онкология”,* СПб, 29-31 мая, 2005.- С.59-60.
5. Ballen K. New trends in umbilical cord blood transplantation // *Blood.*-2005.-Vol.105, №10.-P.3786-3792.
6. Broxmeyer H.E. (editor) *Cord blood biology, immunology, banking and clinical transplantation* // AABB Press,-Bethesda, MD, -2004.
7. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E., Adamson J.W. Processing and cryopreservation of placental/umbilical blood for unrelated bone marrow reconstitution// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1995.-Vol.92.- P.10119-10122.
8. 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.*
9. Denning-Kendall P., Donaldson C., Nicol A. et al. Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking // *Exp Hematol.*- 1996.-Vol.24(12).-P.1394-1401.
10. Гришина В.В., Тимохина Е.В., Андреева Л.Ю. Система сбора и фракционирования стволовых клеток пуповинной крови // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.*-2004.-Т.3, №6.-С.50-54.
11. Newton I., Charbord P., Schaal J.P., Herve P. Toward cord blood banking: density-separation and cryopreservation of cord blood progenitors // *Exp Hematol.*- 1993.-Vol.21(5).-P.671-674.
12. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови // *Вопросы онкологии.*-2000.-№46(5).-С.513-520.
13. Regidor C., Posada M., Monteagudo D., et al. Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation: evaluation of cell separation and storage methods // *Exp Hematol.*-1999.-Vol. 27(2).-P.380-385.

14. Yasutake M., Sumita M., Terashima S., et al. Stem cell collection filter system for human placental/umbilical cord blood processing // *Vox Sang.*-2001.-Vol.80(2).-P.101-105.
15. Eichler H., Kern S., Beck C., et al. Engraftment capacity of umbilical cord blood cells processed by either whole blood preparation and filtration // *Stem Cells.*-2003.-Vol.21.-P.208-216.
16. Tichelli A., Gubelmann A., Schmolck C., et al. Automated volume reduction of cord blood using the Sepax system // *Materials of symposium on PBSC transplantation, Mulhouse,*-1999.
17. Thoma S.J., Bosse R., Schultz J., et al. Stem cell processing with an automated system // *Abstracts of EBMT Conference, Montreux,*-2002.
18. Rowley S.D., Anderson G.L. Effect of exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells // *Bone Marrow Transplantation.*-1993.-Vol.11.-P.389-393.
19. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34⁺ cells to multimolar dymethyl sulphoxide and effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // *Cryobiology.*-2003.-Vol.46.-P.76-87.
20. Alonso J.M. 3rd, Regan D.M., Johnson C.E., et al. Simple and reliable procedure for cord blood banking, processing, and freezing: St Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences // *Cytherapy.*-2001.-Vol.3(6).-P.429-433.
21. Woods E., Liu J., Pollok K., et al. A theoretically optimized method for cord blood stem cell cryopreservation // *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research.*-2001.-Vol.12(3).-P.341-350.
22. Dushez P., Dazey B., Douay L., et al. An efficient large-scale thawing procedure for cord blood cells destined for selection and ex vivo expansion of CD34⁺ cells // *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research.*-2003.-Vol.12.-P.587-589.
23. Cairo M.S., Wagner J.E. Placental and/or umbilical cord blood an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation // *Blood.*-1997.-P.4665-4678.
24. Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A., et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // *Bone Marrow Transplant.*-1996.-Vol.18(4).-P.725-773.
25. Zhang X.B., Li K., Yau K.H., Tsang K.S., et al. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUs, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells // *Transfusion.*-2003.-Vol.43(2).-P.265-272.
26. Limaye L.S., Kale V.P. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium// *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research.*-2001.-Vol.10(5).-P.709-718.

27. Theunissen K., Boogaerts M., Lauweryns L., et al. Fully automated and reproducible cord blood processing using the Biosafe Sepax and Coolmix Devices // Abstracts of ASH Conference, San Diego,-2003.
28. Фрегатова Л.М., Головачева А.А., Эстрина М.А., и др. Получение стволовых клеток периферической крови для ауто- и аллогенных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток // Терапевтический архив.-2002.-№7.-С.27-30.
29. Xiao H.H., Hua T.C., Li J., et al. Freeze-drying of mononuclear cells and whole blood of human cord blood // Cryoletters.-2004.-Vol.25(2).-P.111-120.
30. Зуева Е.Е., Молчанова И.В., Комарова Л.С., и др. Особенности количественного определения гемопоэтических стволовых клеток методом проточной цитометрии // Молекулярная медицина.-2005, (in print)
31. Keethesan N., Whiteman C., Malczewski A., et al. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells // Transfusion and Apheresis Science.-2004.-Vol.30.-P.47-54.
32. Laroche V., McKena D., Moroff G., et al. To wash or not to wash?: an analysis of standard umbilical cord blood processing methods // Abstracts of ISCT conference,-Dublin,-2004.
33. Oh W., Cairo M.S., Desposito F., et al. Cord blood banking for potential future transplantation: subject review.//Pediatrics.-1999.- Vol.104.-№1.-P.116-118.