

Slovenska javna banka popkovnične krvi

Slovenian public cord blood bank

Metka Krašna, Janez Jazbec, Peter Černelč, Dragoslav Domanović

Povzetek: Javna banka popkovnične krvi je nepridobitna organizacija, ki obdeluje in shranjuje darovano nesorodno popkovnično kri (PK), iz katere zagotavlja celične pripravke za zdravljenje nekaterih krvnih in metabolnih bolezni, pri katerih bolniki potrebujejo presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC). V slovensko banko je v prvem letu in pol darovalo PK 833 žensk, glede na standardne kriterije pa smo shranili 267 (32%) enot PK. V zadnjih treh mesecih je PK darovalo približno 80 oseb na mesec, v povprečju pa smo od teh mesečno shranili 24 enot. Mediana števila levkocitov v pripravkih PK pred zamrzovanjem je bila 977×10^6 ($n = 125$; od 507×10^6 - 2631×10^6). Učinkovitost zbiranja levkocitov z aparatom Sepax pa je bila v povprečju 74% ($n = 44$; 38 - 94%). V bližnji prihodnosti nameravamo delovanje javne banke PK akreditirati pri mednarodnem registru EuroCord in s tem zagotoviti učinkovite pripravke, ki bodo dosegali standarde NetCord-FACT.

Ključne besede: Popkovnična kri; krvotvorne matične celice; zamrzovanje celic; javna banka popkovnične krvi

Abstract: The public cord blood bank is a non-profit organization that processes and stores donated unrelated cord blood for haematopoietic stem cell transplantations. In the past year and half, 833 women donated cord blood to our bank, of which 267 units (32%) were stored. In the past three months, an average of 80 parents per month donated cord blood and 24 units per month were cryopreserved. The median number of leukocytes per cord blood unit prior cryopreservation was 977×10^6 ($n = 125$; 507×10^6 - 2631×10^6). The mean recovery of leukocytes after processing the cord blood with the Sepax cell separation system was 74% ($n = 44$; 38 - 94%). We are planning to start the accreditation process at the international registry EuroCord to achieve consistent production of high quality cord blood products that will comply with NetCord-FACT standards.

Keywords: Cord blood, haematopoietic stem cells, cell freezing, public cord blood bank

1 Uvod

Slovensko banko popkovnične krvi smo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino ustanovili aprila 2008 v okviru Enot za shranjevanje popkovnične krvi. V njej shranjujemo nesorodno PK, po naročilu zdravnikov pa tudi sorodno PK, ki jo pridobijo s tako imenovanim usmerjenim odvzemom. Prvič smo v Sloveniji shranili sorodno PK 15.11.1999, ki so jo po naročilu Pediatrične klinike v Ljubljani odvzeli novorojencu za morebitno zdravljenje sorojenca z aplastično anemijo.

Delovanje banke smo zasnovali po mednarodnem standardu NetCord-FACT, ki predpisuje načine zbiranja, obdelave, testiranja, shranjevanja, izbiranja in sproščanja PK (1). V prihodnjih letih nameravamo pridobiti ta standard in s tem potrditi kakovost in učinkovitost pripravkov. Slovenska zakonodaja od leta 2007 ureja to področje z Zakonom o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (ZKVČTC) in pripadajočimi pravilniki (2). Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke pa je uradni organ, ki to področje nadzira.

PK, kostni mozeg in periferna kri, po predhodni farmakološki stimulaciji, so lahko viri krvotvornih matičnih celic (KMC) za zdravljenje nekaterih

bolezni, pri katerih bolniki nujno potrebujejo presaditev KMC, da bi lahko preživel. Najpomembnejša dejavnika, ki vplivata na uspešnost presaditve KMC, sta število presajenih celic CD34+ in skladnost tkivnih antigenov HLA med darovalcem in prejemnikom celic. Kostni mozeg sicer vsebuje več jedrnih celic in med njimi tudi celic CD34+ (1 do 3% vseh jedrnih celic) kot PK (0,01 do 1,0%), toda celice iz PK, zaradi svoje funkcionalne nezrelosti, redkeje povzročijo akutno bolezen presadka proti gostitelju, imajo večjo zmožnost pomnoževanja, vsebujejo več imunskega naivnih celic (3) in imajo daljše telomere (4, 5). Različne javne banke, glede na stroške delovanja, same določijo minimalno število jedrnih celic, ki jih mora vsebovati PK, da jo sprejemo v banko, nadaljujejo z obdelavo in zamrznejo. Tako na primer javna banka v Milanu shrani le tiste enote, ki vsebujejo najmanj 1000×10^6 jedrnih celic (6), v Madridu 800×10^6 celic (7), ter 500×10^6 celic v Mannheimu (8). Prav število jedrnih celic v PK omejuje njeno klinično uporabnost, ki je omejena na telesno težo bolnika. Pri tem namreč velja, da je za uspešno zdravljenje potrebno presaditi najmanj 2×10^7 živih jedrnih celic na kilogram telesne teže prejemnika (9). Zato lahko s PK, ki ima veliko jedrnih celic, zdravimo tudi bolnike z večjo telesno maso.

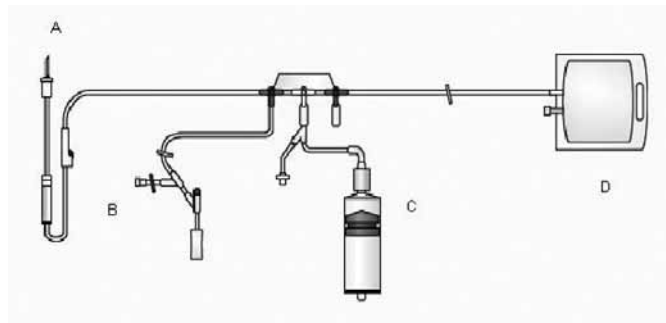
Dr. Metka Krašna, univ.dipl.mikr., Enota za shranjevanje popkovnične krvi, Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana
Doc.dr. Janez Jazbec, dr.med.,spec.ped., Služba za hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana
Prof. dr. Peter Černelč, dr.med.spec.hema., Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana
Dr. Dragoslav Domanović, dr. med., spec.trans., Enota za shranjevanje popkovnične krvi, Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Italijansko združenje bank popkovnične krvi (GRACE) poroča, da v povprečju za zdravljenje letno izdajo 1 do 2% shranjenih enot PK (10), prodajna cena posamezne enote pa je 17.000 EUR (11). Višina slednje je razumljiva, saj zaradi velikih stroškov obdelave, testiranja, shranjevanja in razvoja, javne banke le na takšen način lahko pokrivajo stroške svojega delovanja (12). Tako je Pediatrična klinika v Ljubljani za zdravljenje dveh svojih bolnikov plačala PK, ki so ju prejeli iz bank v tujini, po 16.060 EUR in 30.560 USD.

Na področju pomnoževanja celic iz PK poteka več raziskav, saj bi želeli povečati klinično uporabnost pripravkov (13-15), pri čemer nekateri že poročajo o dobrih kliničnih rezultatih (16).

2 Odvzem, obdelava in shranjevanje popkovnične krvi

Nosečnice približno v 34. tednu nosečnosti izpolnijo prijavnico in podpišejo privolitev za darovanje PK. Babice ali porodničarji ob porodu, še pred porodom posteljice, odvzamejo in zberejo popkovnično kri v vrečko z 21 mL antikoagulantom CPD (citrat, fosfat, dekstroza). PK odvzamejo tako pri vaginalnem kot pri porodu s carskim rezom. Kurir jo nato pri temperaturi od 2 do 24°C dostavi v našo banko, kjer jo analiziramo, obdelamo in shranimo.



Slika 1: Sterilni sistem za enkratno uporabo za ločevanje celic v popkovnični krvi z aparatom Sepax. A - vbojna igla za vrečko s popkovnično krvjo; B - priključek za zamrzovalno vrečko, kjer se zberejo jedrne celice; C - centrifuga; D - vrečka, kjer se zbere plazma.

Figure 1: A Sterile single-used system for cord blood cell separation with Sepax machine. A - spike for cord blood bag; B - connection port for freezing bag for collection of nucleated cells; C - centrifuge; D - plasma collection bag.

Najprej določimo volumen PK in preverimo, da ni minilo več kot 48 ur od poroda. S hematološkim analizatorjem (Cell-DYN 3200, Abbott) določimo krvno sliko in preverimo skupno število jedrnih celic. Če je PK vsebuje več kot 750×10^6 levkocitov (skupaj z retikulociti), oziroma je od njenega odvzema minilo več kot 48 ur, nadaljujemo z obdelavo, drugače pa kri uničimo. 750 milijonov levkocitov zadošča za zdravljenje vsaj 25 kg osebe, oziroma zdravi se lahko tudi težje, če vsebuje PK še več celic. S prvim aprilom 2009 smo zvišali minimalno, še sprejemljivo število levkocitov na 900×10^6 , ker smo uvedli nov postopek obdelave PK, ki vsebuje ločevanje celic in koncentriranje levkocitov z aparatom Sepax (Slika 1) (Biosafe, Švica). Pri tem uporabljamo program UCB, ki nam omogoča pripravo levkocitnega



Slika 2: Računalniško voden zamrzovalnik za programirano zamrzovanje s pomočjo tekočega dušika.

Figure 2: Programmable freezer for controlled - rate liquid nitrogen freezing.



Slika 3: Zamrzovalnik na tekoči dušik, kjer so shranjeni zamrznjeni pripravki popkovnične krvi.

Figure 3: Liquid nitrogen freezer for storage of cryopreserved cord blood products.

Preglednica 1: Analiza popkovnične krvi.**Table 1:** Analysis of cord blood.

Vrsta analize
1. volumen pripravka
2. št. levkocitov, retikulocitov
3. št. celic CD34+
4. hematokrit
5. krvna skupina ABO, RhD
6. abnormalni hemoglobini
7. št. klonogenih krvotvornih celic (CFC)
8. genotipizacija HLA (A,B, DRB1)
9. živost celic
10. rast anaerobnih in aerobnih mikroorganizmov

Preglednica 2: Seznam potencialno prisotnih patogenov, ki jih preverimo v materini krvi.**Table 2:** List of potentially present pathogens determined in maternal blood.

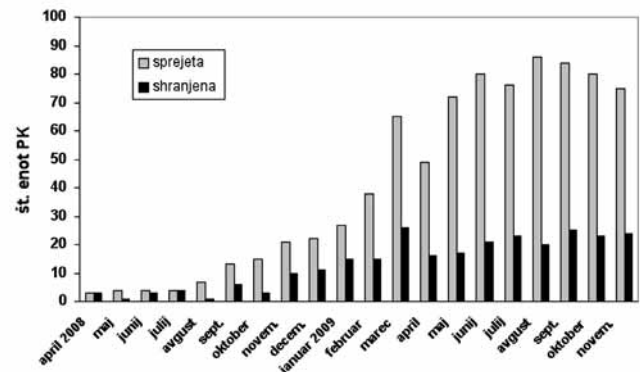
Vrsta označevalca
1. anti-HIV1/2 in p24 Ag (virus HIV)
2. HBsAg, anti-HBc (virus hepatitisa B)
3. anti-HTLV I / II (humani T limfotropni virus)
4. anti-HCV (virus hepatitisa C)
5. anti- <i>Treponema pallidum</i>
6. anti-CMV IgM in IgG (citomegalovirus)
7. NAT testiranje HBV DNA, HCV RNA in HIV 1 RNA (NAT- nucleic acid amplification technology)

pripravka z izbranim končnim volumnom 27 mL. Polno PK ali pa levkocitni pripravek zamrzujemo v raztopini krioprotektorja, sestavljeno iz 10% DMSO (WAK-Chemie) in 5% humanega albumina (Octapharma) v računalniško vodenem zamrzovalniku (Slika 2) (Nicool plus, Air Liquide), ki je v določenih temperaturnih intervalih zamrzuje s hitrostjo: -1°C/min od 0 do -5,5°C, -2°C/min od -5,5 do -40°C in -10°C/min od -40 do -130°C. Zamrznjene pripravke trajno shranjujemo pri temperaturi od -150°C do -196°C v parah tekočega dušika ali v samem tekočem dušiku (Slika 3) in jih nameravamo shranjevati neomejeno dolgo. Vsem shranjenim pripravkom PK določimo biološke lastnosti, ki jih prikazuje Preglednica 1, poleg tega pa preverimo tudi pripadajočo materino kri (Preglednica 2).

3 Delovanje javne banke popkovnične krvi

V prvem letu in pol delovanja (april 2008 - november 2009) je v Slovensko javno banko darovalo popkovnično kri 833 mater iz vseh porodnišnic v Sloveniji. Od teh smo, skladno s kriteriji, shranili 267 enot (32%), ostale pa smo zaradi premajhnega števila levkocitov, prisotnosti mikroorganizmov ali pa prekoračitve časovnega intervala 48 ur od odvzema do zamrzovanja, uničili. Le dva vzorca od 267 (0,7%) sta bila pozitivna na prisotnost bakterij, kar govori o dobri aseptični tehniki zbiranja in obdelave PK. V okuženih vzorcih smo izolirali *Bacteroides vulgatus*, *Escherichia coli* in *Enterococcus faecalis*. Iz drugih bank poročajo, da imajo približno 2% takih vzorcev (17). Šestinsitideset

vzorcem smo določili genotipe HLA, vendar nimamo v svetovni register vpisanega še nobenega vzorca, saj nam to preprečujejo težave pri vpeljavi novega informacijskega sistema, ki bo povezal slovenski register s svetovnim BMDW (Bone Marrow Donors Worldwide). Povprečno število levkocitov v enoti PK po obdelavi in pred zamrzovanjem je bilo 1061×10^6 , mediana 977×10^6 ($n = 125$; od 507×10^6 do 2631×10^6). Učinkovitost zbiranja levkocitov z aparatom Sepax je bila v povprečju 74% ($n = 44$; od 38% do 94%). V enem od 267 pregledanih vzorcev PK smo odkrili abnormalni hemoglobin (HbH,

**Slika 4:** Prikaz števila darovalcev popkovnične krvi za javno banko in število shranjenih enot po mesecih.**Figure 4:** Number of mother who donated cord blood to the Slovenian public cord blood bank and number of cryopreserved units, per month.

0,3%). Matere vseh novorojencev, katerih PK smo shranili, so imele ustrezne virusne označevalce (negativne rezultate testov za okužbo z HIV 1/2, HTLV I/II, hepatitis B in C) ter negativen izvid za bakterijo *Treponema pallidum*.

Kljub odsotnosti načrtnega obveščanja širše javnosti o naši dejavnosti, kar je posledica prostorske, finančne in kadrovske stiske, se je število darovalk iz meseca v mesec povečevalo. V zadnjih treh mesecih je v povprečju darovalo 80 oseb na mesec, shranili pa smo jih v povprečju 24 na mesec (Slika 4). Zasebne pridobitne banke, ki delujejo v Sloveniji, so v preteklem letu v različnih medijih pogosto oglaševale svoje storitve, zato se je verjetno tudi zanimanje za krvotvorne matične celice in darovanje povečevalo. Delovanje banke podpira računalniški program StemLab (StemSoft Software Inc.), ki vsaki sprejeti enoti PK dodeli identifikacijsko številko in omogoča sledljivost darovalcev (novorojencev), njihovih mater in pripravkov.

Po naročilu zdravnikov shranjujemo tudi sorodno PK (t. i. usmerjeni odvzem). Trenutno imamo shranjenih 14 enot, od leta 1999 do danes pa smo jih shranili 19. Najpogostejši naročnik te storitve je bila Pediatrična klinika, sledi Hematološka klinika v Ljubljani in drugi. Indikacije za usmerjen odvzem so bile različne rakave bolezni pri sorojencih. Ker je zdravljenje s PK v Sloveniji razmeroma novo področje, je potrebno izdelati smernice za usmerjeni odvzem PK. Otroški onkologi zagovarjajo stališče, da je usmerjen odvzem PK indiciran v primeru, da se sorojenec novorojenega otroka, katerega PK bi shranili, zdravi zaradi bolezni, za katero je po trenutnih smernicah

EBMT (Evropska skupina za presajanje krvotvornih matičnih celic) alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic rutinska metoda zdravljenja (18,19). V takih primerih, bi torej morale biti zbiranje in shranjevanje PK za bolnikovo družino brezplačno. Zaenkrat ostaja nerešeno tudi vprašanje trajanja shranjevanja za ta namen zbrane PK. Ena od možnih rešitev bi bila, da je shranjevanje take enote PK za družino in druge potencialne uporabnike brezplačno za obdobje do pet let po zaključenem zdravljenju bolezni sorojenca, za katerega je bila enota PK zbrana. Po preteku tega obdobja pa bi se družina lahko odločila ali prevzame stroške nadaljnjega shranjevanja ali pa se enoto PK uniči, saj zaradi krvnih bolezni v ožji družini, ni primerna za prenos in javno banko PK.

4 Klinične izkušnje pri presaditvi popkovnične krvi

Prvo nesorodno PK smo v Sloveniji presadili leta 2004 pri enoletnem dečku z mielodisplastičnim sindromom (MDS). Do danes smo v Sloveniji presadili dve nesorodni PK, ki sta jih priskrbeli tuji javni banki, in nobene avtologne. V obeh primerih je presaditev potekala brez nepričakovanih zapletov. Podaljšan čas do vzpostavitve trombopoze, ki smo ga opazovali v obeh primerih, je posebnost, ki je znana in opisana značilnost presaditve PK. Kljub uspešni presaditvi, je v obeh primerih prišlo razmeroma zgodaj do ponovitve bolezni. V prvem primeru je MDS hitro napredoval v akutno mieloblastno levkemijo. Pri drugem dečku, ki je imel v osnovi akutno limfoblastno levkemijo z visokim tveganjem za relaps, pa je do ponovitve bolezni prišlo znotraj prvih šestih mesecev po presaditvi. Ponovitve osnovne bolezni v obeh dosedanjih primerih, je lahko povezan z dejstvom, da je imunski učinek presadka, ki ga imenujemo tudi učinek presadka proti levkemiji, pri presaditvi PK manj izražen, kot pri presaditvi krvotvornih matičnih celic, pridobljenih s standardnimi postopki, od sorodnih in nesorodnih dajalcev. Podatki EuroCorda kažejo, da je preživetje bolnikov po presaditvi odvisno od vrste osnovne bolezni in stanja bolnikov ob presaditvi in je v povprečju od 27 do 100% (20).

5 Novosti in prihodnost pri zdravljenju s popkovnično krvjo in shranjevanju KMC

Glavna pomanjkljivost PK, ki preprečuje njeno širšo uporabo, je relativno majhno število KMC, zato jih poskušajo v ustreznih gojiščih *in vitro* pomnožiti do števila, ki bo omogočilo zdravljenje tudi odraslih bolnikov z večjo telesno maso. Žal pa pri pomnoževanju *in vitro* matične celice pogosto izgubijo značilne lastnosti in se diferencirajo v potomke matičnih celic, na primer v različne prednice krvnih celic. Te imajo omejeno zmožnost pomnoževanja, vendar kljub temu doprinesejo k hitrejši obnovitvi presajenih matičnih celic (21-24). Zato zaenkrat zdravljenje s pomnoženimi matičnimi celicami *in vitro* poteka tako, da bolniku presadijo dve enoti; eno s pomnoženimi celicami in drugo z ne-pomnoženimi. Pri tem pa sta lahko enoti od enega darovalca PK (16,21,25) ali pa od dveh (26). Prav zaradi možnosti pomnoževanja celic je pomembno, da posamezno enoto PK shranimo v več vrečkah ali vialah.

Nov pristop k učinkovitejšemu sprejemanju in delovanju presadka KMC nekateri vidijo v uporabi haploidentičnih (polovično tkivno skladnih) mezenhimske matične celice, ki jih osamijo iz kostnega mozga in pomnožijo *in vitro* ter presadijo hkrati s KMC iz nesorodne PK (27). Mezenhimske matične celice naj bi po presaditvi pospešile sprejetje KMC zaradi svojega imunsko supresivnega učinka (28). Ugotovili so tudi, da lahko na hitrejše sprejetje presajenih KMC vpliva tudi neposreden vnos KMC preko črevnice v kostni mozeg (direct intra bone transplantation) (29,30).

Shranjevanje KMC v zamrzovalnikih s tekočim dušikom je velik strošek, zato poskušajo razviti nove načine dolgotrajnega shranjevanja celic. Postopek liofilizacije KMC, ki jih nato shranjujejo pri 2 – 8°C, je patentirala in objavila izraelska skupina strokovnjakov (31). Poročajo o dobrih rezultatih *in vitro*, na izsledke kliničnih raziskav pa bo potrebno še počakati.

6 Zaključek

Nesorodna popkovnična kri se že vrsto let uspešno uporablja za zdravljenje nekaterih malignih in nemalignih krvnih bolezni. Raziskave, s katerimi preučujejo primernost PK za zdravljenje drugih bolezni (nevrolške bolezni, diabetes tip 1), oziroma za potrebe regenerativne medicine, zaenkrat potekajo predvsem na živalskih modelih, zato lahko pričakujemo, da bo v prihodnosti objavljenih tudi več rezultatov kliničnih aplikacij na ljudeh, iz katerih bodo lahko nastale nove smernice za zdravljenje z matičnimi celicami (32-37).

7 Literatura

1. NETCORD-FACT International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection, and release. International NetCord foundation. Foundation for the accreditation of cellular therapy. Third Edition, December 2006.
2. Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (ZKVČTC). Uradni list RS, št. 61/2007.
3. Ballen KK. New trends in umbilical cord blood transplantation. Blood. 2005; 105:3786-92.
4. De Pauw ES, Verwoerd NP, Duinkerken N, Willemze R, Raap AK, Fibbe WE, Tanke HJ. Assessment of telomere length in hematopoietic interphase cells using in situ hybridization and digital fluorescence microscopy. Cytometry. 1998;32:163-9.
5. Pipes BL, Tsang T, Peng SX, Fiederlein R, Graham M, Harris DT. Telomere length changes after umbilical cord blood transplant. Transfusion. 2006;46:1038-43.
6. Lecchi L, Perego L, Garcea F, Ratti I, Brasca M, Dotti D, Cimoni S, et al. Ten-year quality control of a semiautomated procedure of cord blood unit volume reduction. Transfusion. 2009;49:563-9.
7. Bornstein R, Flores AI, Montalbán MA, del Rey MJ, de la Serna J, Gilsanz F. A modified cord blood collection method achieves sufficient cell levels for transplantation in most adult patients. Stem Cells. 2005;23:324-34.
8. Eichler H, Meckies J, Schmut N, Kern S, Klüter H, Zieger W. Aspects of donation and processing of stem cell transplants from umbilical cord blood. Z Geburtshilfe Neonatol. 2001;205:218-23.
9. Gluckman E. Cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2006;12:808-12.
10. Sirchia G, Rebulla P, Tibaldi S, Lecchi L. Cost of umbilical cord blood units released for transplantation. Transfusion. 1999;39:645-50.
11. Recepimento dell'Accordo tra il Ministro della Salute, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano sul documento recante: "Aggiornamento del prezzo unitario di cessione del sangue e degli emocomponenti tra servizi sanitari pubblici" – 24 luglio 2003. DELIBERAZIONE N. VII / 15690 DEL 18.12.2003.
12. Rubinstein P. Why cord blood? Hum Immunol. 2006;67:398-404.

13. Lazzari L, Lucchi S, Montemurro T, Porretti L, Lopa R, Rebulla P, Sirchia G. Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:693-8.
14. Beshlawy AE, Metwally HG, Khalek KA, Hammoud RF, Mousa SM. The effect of freezing on the recovery and expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Exp Clin Transplant.* 2009;7:50-5.
15. Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, Gregory SA, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion.* 2008;48:2638-44.
16. De Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, Andersson BS, Hosing C, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:771-8.
17. Kurtzberg J, Cairo MS, Fraser JK, Baxter-Lowe L, Cohen G, Carter SL, Kernan NA. Results of the cord blood transplantation (COBLT) study unrelated donor banking program. *Transfusion.* 2005 Jun;45(6):842-55.
18. Smernice Evropske skupine za presajanje krvotvornih matičnih celic. <http://www.ebmt.org/1/WhatIsEBMT/whatisebmt2.html>
19. Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirev T, Dini G, Einsele H, Gratwohl A, et al; European Group for Blood and Marrow. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:439-49.
20. Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica.* 2009;94:451-454.
21. Kögler G, Nürnberger W, Fischer J, Niehues T, Somville T, Göbel U, Wernet P. Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:397-403.
22. Williams DA. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells -robbing Peter to pay Paul? *Blood.* 1993;81:3169-72.
23. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood.* 1993;82:2664-72.
24. McNiece IK, Almeida-Porada G, Shpall EJ, Zanjani E. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp Hematol.* 2002;30:612-6.
25. Jarosca J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, Howrey R, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase I trial using the AastromReplicell System. *Blood.* 2003;101:5061-7.
26. Delaney C, Brashem-Stein C, Voorhies H, Gutman J, Dallas M, Heimfeld S, Bernstein ID. Notch-Mediated Expansion of Human Cord Blood Progenitor Cells Results in Rapid Myeloid Reconstitution in Vivo Following Myeloablative Cord Blood Transplantation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2008; 112: 212.
27. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:447-54.
28. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, Locatelli F, Fibbe WE. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007;110:2764-7.
29. Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood.* 2003;101:2905-13.
30. Frasson F, Gualandri F, Podestà M, Raiola AM, Ibatici A, Piaggio G, Sessarego M, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* 2008;9:831-9.
31. Natan D, Nagler A, Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. *PLoS One.* 2009;4:e5240.
32. Meier C, Middelani J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinse HR, Dermietzel R, Jensen A. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatric Research.* 2006; 59:244-249.
33. Kuh SU, Cho YE, Yoon DH, Kim KN, Ha Y. Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat. *Acta Neurochir.* 2005; 9:985-92.
34. Nishio Y, Koda M, Kamada T et al. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine.* 2006; 5:424-33.
35. Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy.* 2005;7:368-373.
36. Haller MJ, Wasserfall CH, McGrail KM, Cintron M, Brusko TM, Wingard JR et al. Autologous Umbilical Cord Blood Transfusion in Very Young Children With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32:2041-6.
37. Harris DT. Non-haematological uses of cord blood stem cells. *Br J Haematol.* 2009; 147:177-84.