

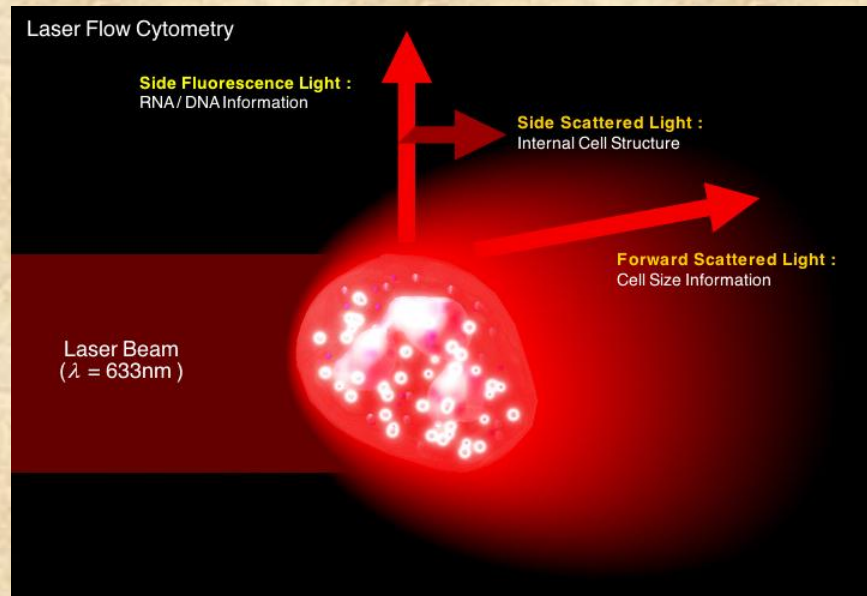
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ) ΑΘΗΝΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΜΠΥΡΗΝΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ
ΣΕ ΜΟΝΑΔΕΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ
ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ**



Σάρρου Ευγενία (Α.Μ. 08035)

Εισηγητής: Δρ. Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Καθηγητής εφαρμογών Αιματολογίας-Αιμοδοσίας

ΑΘΗΝΑ, Μάιος 2013

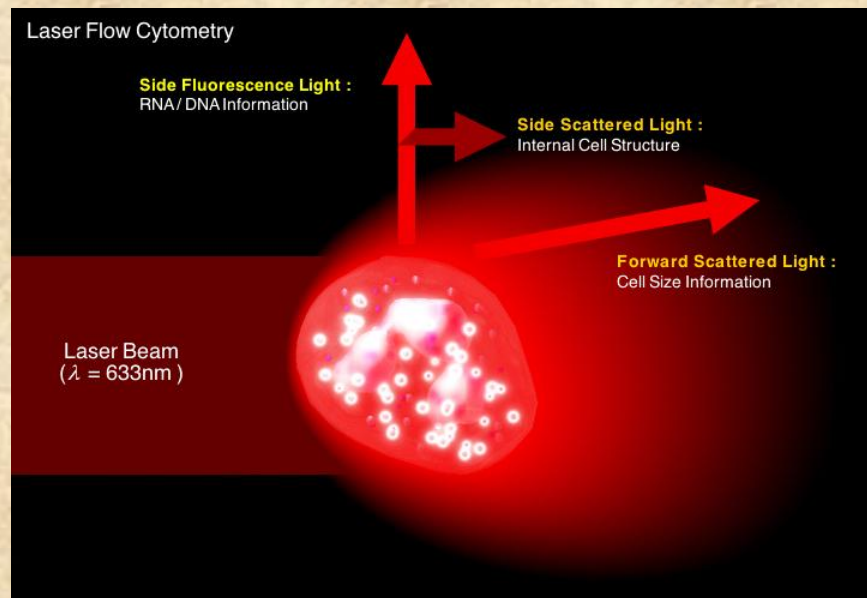
TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE (TEI) OF ATHENS

FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS

DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

GRADUATION THESIS

**STUDY OF NUCLEATED RED BLOOD CELLS IN UMBILICAL
CORD BLOOD UNITS BEFORE AND AFTER VOLUME
REDUCTION PROCESS**



Sarrou Evgenia (R.N. 08035)

Supervisor: Dr. Kriempardis Anastasios

Lecturer of Haematology and Transfusion Medicine

ATHENS, May 2013

Εικόνα εξωφύλλου: Κυτταρομετρική απεικόνιση ερυθροκυττάρου. Η ανάλυση γίνεται με βάση την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter) (προσδιορισμός μεγέθους) και την πλάγια σκέδαση (Side Scatter) (προσδιορισμός κοκκίωσης) (ανατύπωση από <https://www.sysmex.com/us/en/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>, access in 24/04/2013)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α), κ. Σταυροπούλου Αικατερίνη, και τον Διευθυντή του Εργαστηρίου, κ. Παπασάββα Ανδρέα, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Παναγούλη Έφη, τον κ. Μιχαλόπουλο Στάθη και τον κ. Χατζησταματίου Φάνη για την πολύτιμη βοήθειά τους, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή, κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, δίχως τις οποίες θα ήταν αδύνατη η εκτέλεση της παρούσας εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, τους συμφοιτητές και φίλους μου για τη στήριξή τους.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α	Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος
IT	Ισοθερμική Τσάντα
ΜΟ	Μέσος Όρος
ΟΠ.Α	Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα
<hr/>	
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythrocytes (<i>Μονοδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ερυθρά σειρά</i>)
BMI	Body Mass Index (<i>Δείκτης σωματικού βάρους</i>)
CBU	Cord Blood Unit (<i>Μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος</i>)
CD	Cluster of Differentiation (<i>Σύμπλεγμα διαφοροποίησης</i>)
CFU	Colony Forming Unit (<i>Μονάδα Σχηματιζόμενων Αποικιών</i>)
CFU-GEMM	Colony Forming Unit-Granulocytes Erythrocytes Monocytes Megakaryocytes (<i>Πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιάδη, ερυθρά, μονοκυτταρική και μεγακαρυωτική σειρά</i>)
CFU-GM	Colony Forming Unit-Granulocytes Monocytes (<i>Ωριμότερο διδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιάδη και τη μονοκυτταρική σειρά</i>)
CV	Coefficient of Variation (<i>Συντελεστής μεταβλητότητας</i>)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (<i>Διμεθυλοσουλφοξείδιο</i>)
FS	Forward Scatter (<i>Πρόσθια σκέδαση</i>)
HES	Hydroxy Ethyl Starch (<i>Άμυλο υδροξυαιθυλίου</i>)
HLA	Human Leukocyte Antigen (<i>Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας</i>)

HPCs	Hematopoietic Progenitor Cells (<i>Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα</i>)
MSCs	Mesenchymal Stem Cells (<i>Μεσεγγυματικά Κύτταρα</i>)
NRBC	Nucleated Red Blood Cells (<i>Εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια</i>)
RBC	Red Blood Cells (<i>Ερυθρά αιμοσφαίρια</i>)
SD	Standard Deviation (<i>Τυπική απόκλιση</i>)
SS	Side Scatter (<i>Πλάγια σκέδαση</i>)
TNC	Total Nucleated Cells (<i>Συνολικός αριθμός εμπύρηνων κυττάρων</i>)
UCB	Umbilical Cord Blood (<i>Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα</i>)
WBC	White Blood Cells (<i>Λευκά αιμοσφαίρια</i>)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	-9-
ABSTRACT.....	-11-
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	-13-
A1. ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ.....	-13-
A1.1. Ορισμός.....	-13-
A1.2. Περίοδοι αιμοποίησης.....	-13-
A1.3. Προέλευση κυττάρων αίματος.....	-14-
A1.4. Αιμοκυτοβλάστη.....	-14-
A1.5. Αρχέγονα πολυδύναμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.....	-15-
A2. ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ.....	-18-
A2.1. Ορισμός.....	-18-
A2.2. Σύσταση ομφαλοπλακουντιακού αίματος.....	-18-
A2.3. Εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	-25-
A2.4. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα ως μόσχευμα.....	-29-
A3. ΑΛΛΟΓΕΝΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	-33-
A3.1. Ορισμός και σκοπός.....	-33-
A3.2. Σύντομη ιστορική αναδρομή.....	-33-
A3.3. Συλλογή, επεξεργασία και κρυοκατάψυξη μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος.....	-34-
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	-48-
B1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	-48-
B2. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΣΚΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ.....	-49-
B3. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΗ ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	-50-
B4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ.....	-52-
B5. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	-61-
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	-62-
Γ1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	-62-
Γ2. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	-63-
Γ3. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	-77-
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	-80-
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	-84-

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠ.Α) είναι το αίμα που κυκλοφορεί μεταξύ του ομφάλιου λώρου, του πλακούντα και του εμβρύου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και παραμένει μέσα στον ομφάλιο λώρο και τον πλακούντα μετά τον τοκετό. Κύριος ρόλος του είναι η μεταφορά του οξυγόνου και των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών από τον πλακούντα στο έμβρυο για τη φυσιολογική ανάπτυξη αυτού. Το ΟΠ.Α, εκτός από ερυθρά (RBC) και λευκά αιμοσφαίρια (WBC) και αιμοπετάλια (PLT), περιέχει διαφορετικούς τύπους προγονικών κυττάρων, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και τα μη-αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, υποσύνολο των οποίων είναι και τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση του ΟΠ.Α στο χώρο της μεταμόσχευσης, για τη θεραπεία μεγάλου εύρους αιματολογικών και μη νοσημάτων, γίνεται ολοένα και πιο συχνή. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν οι Τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος και ένα πλήθος προτύπων και κανονισμών που βοηθά στη σωστή λειτουργία αυτών. Το πλήθος των κυττάρων CD34 αποτελούν την καθοριστική παράμετρο για τη μελλοντική μεταμόσχευση ή όχι μιας μονάδας ΟΠ.Α. Τα εμπύρνηνα ερυθρά αιμοσφαίρια (NRBC) φέρουν στην επιφάνειά τους το δείκτη CD71 και ουσιαστικά πρόκειται για άωρες μορφές ερυθρών αιμοσφαιρίων. Φυσιολογικά ανευρίσκονται στο ΟΠ.Α και το μυελό των οστών ενώ ο αριθμός τους στο ΟΠ.Α είναι μεν μικρός αλλά σημαντικός. Σε παθολογικές καταστάσεις, τόσο των νεογνών όσο και των ενηλίκων, ο αριθμός τους αυξάνεται και ανευρίσκονται και στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Μελέτες δείχνουν ότι η ύπαρξή τους στις μονάδες ΟΠ.Α λειτουργεί βοηθητικά στην εγκατάσταση του μοσχεύματος ενώ άλλες συνδέουν τον αυξημένο αριθμό τους με κακή πρόγνωση της ασθένειας ή/και με τη θνησιμότητα. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μέτρηση των εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε δείγματα που λήφθηκαν πριν και μετά τη διαδικασία μείωσης όγκου των μονάδων ΟΠ.Α, καθώς και η πιθανή συσχέτιση του αριθμού τους με διάφορες παραμέτρους. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μείωση του όγκου των μονάδων ΟΠ.Α με τη χειροκίνητη μέθοδο της διπλής φυγοκέντρωσης (μέθοδος του Rubinstein) και λήψη δειγμάτων από τις μονάδες ΟΠ.Α, πριν και μετά τη μείωση όγκου τους. Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών με τη μέθοδο της

κυτταρομετρίας ροής. Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα και φθορίζουσες χρωστικές ουσίες για τη σήμανση αντιγονικών καθοριστών (CD45, CD34 και CD71) που χαρακτηρίζουν τους υπό μελέτη κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων συσχετίστηκαν με τις παρακάτω παραμέτρους: εβδομάδες κύησης της μητέρας-δότριας, τύπος τοκετού, βάρος και φύλο νεογνού. Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (καθώς και όλων των υπόλοιπων εξεταζόμενων κυτταρικών πληθυσμών) ήταν μεγαλύτερος στα δείγματα ΟΠ.Α που προήλθαν από κύηση περισσότερων εβδομάδων, φυσιολογικό τοκετό και νεογνό αρσενικού φύλου και βάρους μεγαλύτερου από 3500 kg.

ABSTRACT

Umbilical cord blood (UCB) is the blood that remains in the placenta and the umbilical cord after the birth of a child. It supplies the developing fetus with the important nutrition elements and oxygen required for proper fetal development. UCB contains an heterogeneous mixture of cells. This mixture includes hematopoietic cells including red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs) and platelets (PLT). Moreover, it contains two types of stem cells, the hematopoietic progenitor cells (HPCs) and the non-hematopoietic progenitor cells which include the mesenchymal stem cells (MSCs). Recently, the use of cord blood units (CBUs) in transplantation has become more frequent. For that reason, the development of Cord Blood Banks and standards for their proper function was essential. The number of CD34 cells is the most crucial factor for a CBU to be transplanted or not. Nucleated red blood cells (NRBCs) are the immature RBCs that have not lost their nuclei yet, expressing the CD71 marker on their surface. The small but important number of NRBCs in cord blood and bone marrow is a normal phenomenon but it could be increased in several hematological or non-hematological diseases, in which they appear in peripheral blood as well. Studies have shown that their existence in CBUs could lead to a quicker engraftment of the HPCs into host's targeted tissues. On the other hand, a few studies support that the increased number of NRBCs is connected with poor prognosis of a disease and increased mortality. The purpose of this study is the enumeration of NRBC in cord blood samples, before and after volume reduction of CBUs, using a flow cytometry protocol, and the potential correlation of NRBCs with several factors. Firstly, the volume reduction of all CBUs, using the manual Rubisnstein method of double centrifugation, and the sampling were performed. The cell enumeration was carried out using a flow cytometry protocol. This protocol uses several monoclonal antibody reagents and fluorescent viability dyes, in order to mark the clusters of differentiation (CD45, CD34 and CD71) that characterize the examined cell populations. A number of factors, such as gestational age, route of delivery, infant's weight and sex, were correlated with the concentration of each examined cell population. A positive correlation was found between the above factors and the number of NRBCs.

Cord blood-derived NRBCs' cell concentration was higher in vaginal deliveries, male infants of birth weight 3500 kg or more and newborns of longer gestational age.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

A1.1. Ορισμός

Με τον όρο αιμοποίηση εννοούμε το σύνολο των μηχανισμών που εξασφαλίζουν τη συνεχή αναγέννηση των έμμορφων στοιχείων του αίματος, δηλαδή την παραγωγή, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ωρίμανση και την είσοδο των κυττάρων του αίματος στην κυκλοφορία. Τα όργανα στα οποία τελείται ονομάζονται αιμοποιητικά όργανα και είναι όλα τα λεμφοκυτογόνα όργανα για την παραγωγή των λεμφοκυττάρων και ο ερυθρός μυελός των οστών για την παραγωγή των υπόλοιπων στοιχείων του αίματος. (*Mehta and Hoffbrand, 2005 και Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003*).

A1.2. Περίοδοι αιμοποίησης

Η αιμοποίηση διακρίνεται σε δύο περιόδους: την εμβρυϊκή και τη μετεμβρυϊκή αιμοποίηση (*Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003*).

A1.2.1. Εμβρυϊκή αιμοποίηση

Η εμβρυϊκή αιμοποίηση εμφανίζεται πολύ νωρίς και διακρίνεται σε τρία στάδια ή περιόδους (*Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003*):

1. Τη μεσοβλαστική ή προηπατική περίοδο
2. Την ηπατοσπληνική περίοδο (ηπατοσπληνοθυμική)
3. Τη μυελική περίοδο.

A1.2.2. Μετεμβρυϊκή αιμοποίηση (αιμοποίηση ενηλίκου)

Κατά τη μετεμβρυϊκή περίοδο, το κύριο αιμοποιητικό όργανο είναι ο ερυθρός μυελός των οστών, όπου παράγονται όλα τα έμμορφα στοιχεία του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, πολυμορφοπύρηνα, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια), εκτός από τα λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα που προέρχονται από αυτά, που στην πλειονότητά τους

παράγονται στα λεμφοκυτογόνα ή λεμφικά όργανα (Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003).

Εμβρυϊκή ζωή	Αρχικά στο λεκιθικό ασκό (μεσοβλαστική ή προηπατική περίοδος). Αργότερα, σε ήπαρ, σπλήνα, θύμο (ηπατοσπληνοθυμική περίοδος) και τελευταία στο μυελό των οστών (μυελική περίοδος).
Μετεμβρυϊκή ζωή	Αποκλειστικά στον ερυθρό μυελό των οστών, εκτός των λεμφοκυττάρων, που στην πλειονότητά τους παράγονται στα λεμφοκυτογόνα όργανα (περιφερικά λεμφικά όργανα).

Πίνακας 1: Φυσιολογική προέλευση έμμορφων στοιχείων του αίματος (ανατύπωση από Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003).

A1.3. Προέλευση κυττάρων αίματος

Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από διαφοροποίηση ενός αρχικού, αρχέγονου μεσεγγυματικού κυττάρου, το οποίο είναι πολυδύναμο αδιαφοροποίητο κύτταρο του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ). Από αυτό το αδιαφοροποίητο μεσεγγυματικό κύτταρο προέρχεται αρχικά το κοινό αρχέγονο πολυδύναμο βλαστικό αιμοποιητικό κύτταρο, η «αιμοκυτοβλάστη» (hemocytoblast, HCB), από την οποία με διαφοροποίηση παράγεται το αρχέγονο πολυδύναμο προγονικό αδέσμευτο αιμοποιητικό κύτταρο ή προγονικές αιμοποιητικές προβαθμίδες. Με περαιτέρω διαφοροποιήσεις από το κύτταρο αυτό παράγονται τα «δεσμευμένα» καθορισμένα προγονικά μητρικά κύτταρα κάθε σειράς, που διεγείρονται από ειδικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και στη συνέχεια δίνουν μόνο τα αντίστοιχα για αυτά ώριμα κύτταρα (Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003).

A1.4. Αιμοκυτοβλάστη

Η αιμοκυτοβλάστη είναι αρχέγονο αδιαφοροποίητο πολυδύναμο «βλαστικόάωρο» αιμοποιητικό κύτταρο (παντοδύναμο, γενάρχη) και παριστά τον πρόγονο των μητρικών κυττάρων των έμμορφων στοιχείων του αίματος. Ο αριθμός της

στο μυελό των οστών εξαρτάται από την ηλικία. Στο έμβρυο και το νεογνό αποτελεί το 70-90% των κυττάρων του μυελού των οστών, αλλά με την πάροδο των χρόνων το ποσοστό της ελαττώνεται. Αντίθετα, παρατηρείται αύξησή της σε παθολογικές καταστάσεις. Πλησιέστερος απόγονός της είναι το αρχέγονο πολυδύναμο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο (Pluripotent Hematopoietic Stem Cell, P-HSC), που είναι το μητρικό κύτταρο των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών (Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003).

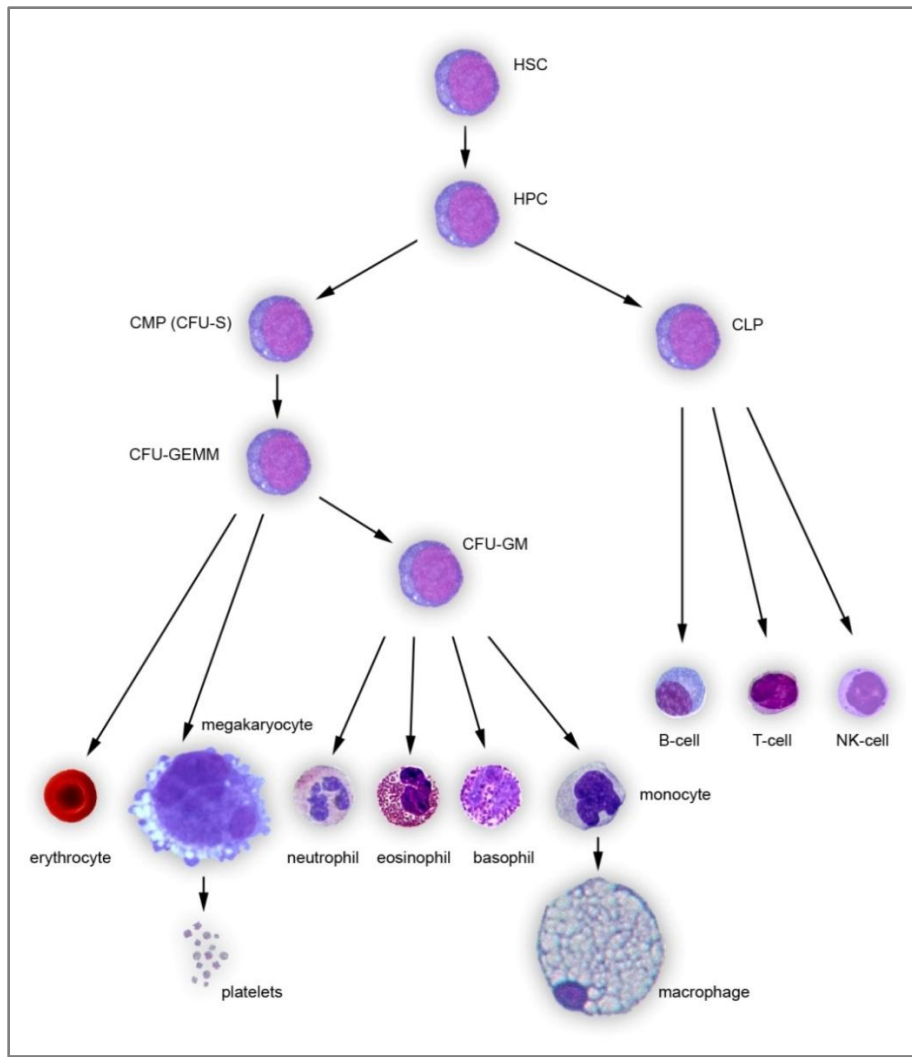
A1.5. Αρχέγονα πολυδύναμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα

Ο όρος «αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο» (Hematopoietic Stem Cell, HSC) αναφέρεται σε μια ομάδα πολυδύναμων κυττάρων που δίνουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αίματος, τόσο της μυελικής σειράς (πολυδύναμο μυελικό αρχέγονο κύτταρο, pM-HSC, προς παραγωγή των ερυθροκυττάρων, αιμοπεταλίων, βασεόφιλων, ηωσινόφιλων και μονοκύτταρων-ουδετερόφιλων), όσο και της λεμφικής σειράς (πολυδύναμο λεμφικό αρχέγονο κύτταρο, L-HSC, προς παραγωγή των T- και B-λεμφοκυττάρων και NK κυττάρων) (Lensch, 2012; Laurenti and Dick, 2012 και Doulatov et al., 2012). Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εντοπίζονται στο μυελό των οστών, το περιφερικό αίμα και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Αντιπροσωπεύουν περίπου το 0.05% του συνόλου των αιμοποιητικών κυττάρων και μόλις το 0.01% των κυττάρων του μυελού των οστών (περίπου 106 έως 107 αρχέγονα κύτταρα). Η διατήρηση μιας σταθερής δεξαμενής τέτοιων κυττάρων επιτυγχάνεται με τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους σε διαφορετικά επίπεδα. Παρ' όλο που ένα ποσοστό των κυττάρων αυτών παραμένει σε αδράνεια στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου, για να ενεργοποιηθεί ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού, η διαίρεσή τους είναι ασύμμετρη, δίνοντας θυγατρικά αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα αλλά και θυγατρικά κύτταρα, δεσμευμένα είτε προς τη μυελική είτε προς τη λεμφική σειρά (Smith, 2006). Τα κύτταρα αυτά διακρίνονται σε:

1. Μυελικά και σε λεμφικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, βάσει της δέσμευσης για δημιουργία κυτταρικών σειρών

2. Πολυδύναμα, ολιγοδύναμα, διδύναμα, μονοδύναμα (μυελικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα) και σε διδύναμα, μονοδύναμα (λεμφικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα), βάσει της ικανότητας διαφοροποίησης σε όλες, ορισμένες ή μια κυτταρική σειρά (*Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, 2003*).

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα μοιάζουν ιστολογικά με τα λεμφοκύτταρα. Έχουν μικρό μέγεθος και μεγάλο πυρήνα, ενώ το κυτταρόπλασμά τους είναι περιορισμένο. Για το λόγο αυτό είναι αναγνωρίσιμα με τις συνήθεις τεχνικές δοκιμασίες. Συγκεκριμένα, χρειάζεται η συνδρομή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, που στηρίζονται στην αναγνώριση των κυττάρων αυτών από τους αντιγονικούς καθοριστές τους. Οι περισσότεροι από αυτούς τους δείκτες ανήκουν στο Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης (Cluster of Differentiation, CD). Στα ανθρώπινα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα οι πιο συχνά απαντώμενοι δείκτες είναι οι: CD133, CD34, CD33, CD38, CD45, CD90, CD117, CD31, CD61, CD62L και CD71 (*Laurenti and Dick, 2012 και Smith, 2006*).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της αιμοποίησης [HSC (Haemopoietic Stem Cell): Αρχέγονο Βλαστικό Κύτταρο, HPC (Haemopoietic Progenitor Cell): Αρχέγονο Προγονικό Κύτταρο, CMP (Common Myeloid Progenitor): Κοινό Μυελικό Προγονικό Κύτταρο, CLP (Common Lymphoid Progenitor) Κοινό Λεμφικό Προγονικό Κύτταρο, CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Megakaryocyte): Ωριμότερο Πολυδύναμο Προγονικό Κύτταρο, δεσμευμένο για την Ουδετερόφιλη Κοκκιώδη, Ερυθροκυτταρική, Μονοκυτταρική και Μεγακαρυοτική σειρά, CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte): Ωριμότερο Διδύναμο Προγονικό Κύτταρο, δεσμευμένο για την Ουδετερόφιλη Κοκκιώδη και Μονοκυτταρική/Μακροφαγική σειρά, Erythrocyte: Ερυθροκύτταρο, Megakaryocyte: Μεγακαρυοκύτταρο, Platelets: Αιμοπετάλια, Neutrophil: Ουδετερόφιλο, Eosinophil: Ηωσινόφιλο, Baseophil: Βασεόφιλο, Monocyte: Μονοκύτταρο, Macrophage: Μακροφάγο, B-cell: Β-κύτταρο, T-cell: Τ-κύτταρο, NK cell: NK-κύτταρα] (ανατύπωση από «<https://daley.med.harvard.edu/assets/Willy/willy.htm>» access in 04/02/2013).

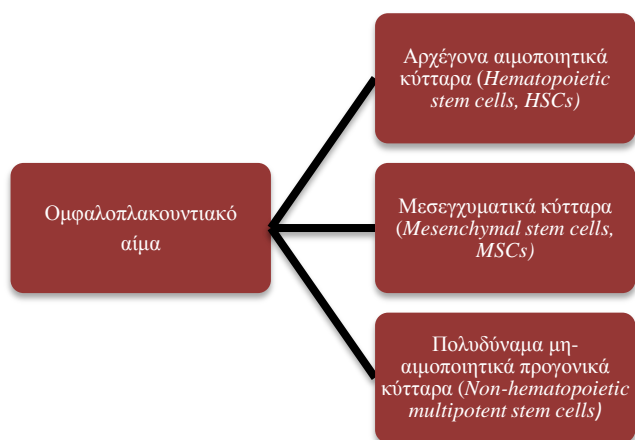
A2. ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ

A2.1. Ορισμός

Ο όρος ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠ.Α) χρησιμοποιείται για το αίμα που κυκλοφορεί μεταξύ του ομφάλιου λώρου, του πλακούντα και του εμβρύου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και παραμένει μέσα στον ομφάλιο λώρο και τον πλακούντα μετά τη γέννηση του νεογνού. Επιπλέον, είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά οξυγόνου και των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών από τον πλακούντα στο έμβρυο, με μοναδικό σκοπό τη φυσιολογική ανάπτυξη αυτού (Ali and Al-Mulla, 2012 και Mehta, 2004).

A2.2. Σύσταση ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Το ΟΠ.Α περιέχει ένα εξαιρετικά ετερογενές μείγμα αιμοποιητικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων. Ταυτόχρονα, περιέχει τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς τύπους προγονικών κυττάρων, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα και τα μη-αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (Ali and Al-Mulla, 2012 και Mehta, 2004).



Σχήμα 1: Τα είδη των προγονικών κυττάρων που περιέχονται στο ΟΠ.Α (ανατύπωση από Ali and Al-Mulla, 2012).

A2.2.1. Μεσεγχυματικά κύτταρα

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα τα οποία συναντώνται στο μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε ορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, τενοντοκύτταρα, μυοκύτταρα και αστροκύτταρα. Έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται στο πλαστικό και εκφράζουν τους αντιγονικούς καθοριστές CD105, CD73 και CD90 ενώ είναι αρνητικοί για τους δείκτες CD45, CD34, CD11a, CD19 και HLA-DR. Επιπλέον, παρέχουν στα πολυδύναμα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα το απαραίτητο υπόστρωμα για την ανανέωση και διαφοροποίησή τους. Μεσεγχυματικά κύτταρα απομονώνονται και από τον ομφάλιο λώρο και εμφανίζουν μορφολογικές και μοριακές ομοιότητες με αυτά του μυελού των οστών (*Salem and Thiemermann, 2010; Troyer and Weiss, 2008 και Dominici et al., 2006*).

A2.2.2. Πολυδύναμα προγονικά μη-αιμοποιητικά κύτταρα

Τα κύτταρα αυτά είναι μικρά σε μέγεθος, απαντώνται σε χαμηλό ποσοστό στο ΟΠ.Α και είναι αρνητικά για το κύριο αιμοποιητικό δείκτη CD45, γνωστό και ως κύριο λευκοκυτταρικό αντιγόνο. Έχει βρεθεί ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες που φυσιολογικά εντοπίζονται σε εμβρυϊκά κύτταρα, καθώς και συγκεκριμένους επιφανειακούς δείκτες (*Ali and Al-Mulla, 2012*).

A2.2.3. Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

Το ΟΠ.Α, όπως και ο μυελός των οστών, περιέχει αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα σε διαφορετικά στάδια της αιμοποίησης, τα οποία χαρακτηρίζονται από ποικιλία αντιγονικών καθοριστών (Cluster of Differentiation, CD) που εκφράζουν (Πίνακας 2) (*Ali and Al-Mulla, 2012 και Mehta, 2004*).

CD αντιγόνο	Μοριακό βάρος	Συνώνυμα	Κυτταρική έκφραση	Λειτουργία
CD13	150 kDa	Αμινοπεπτιδάση N	Πρώιμα προγονικά κύτταρα κοκκιοκυττάρων (CFU-GM), ώριμα κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα, στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών, οστεοκλάστες, μικρός αριθμός μεγάλων κοκκιωδών λεμφοκυττάρων	Μεταλλοπρωτεΐνάση του ψευδαργύρου
CD18	95 kDa	β2 αλυσίδα ιντεγκρίνης	Όλα τα λευκοκύτταρα	Προσκόλληση και μεταγωγή μηνυμάτων στο αιμοποιητικό σύστημα
CD19	>120 kDa		Θυλακιακά δενδριτικά κύτταρα, B-κύτταρα που προέρχονται από τις πιο πρώιμα αναγνωρίσιμες σειρές B-κυττάρων κατά την ανάπτυξη B-κυτταρικών βλαστών, αλλά η εκφρασή του χάνεται κατά την ωρίμανση σε πλασματοκύτταρα	Σημαντικό μόριο για τη διαδικασία μεταγωγής μηνυμάτων που ρυθμίζει την ανάπτυξη, ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B-κυττάρων
CD31	130-140 kDa	Μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων (PECAM)	Ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, NK κύτταρα, υποπληθυσμοί T-κυττάρων	Μόριο προσκόλλησης
CD33	67 kDa		Μονοκύτταρα, πρόδρομα κύτταρα μυελικής σειράς	Μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που εξαρτάται από το σιαλικό οξύ
CD34	90-120 kDa		Πρώιμα λεμφοαιμοποιητικά αρχέγονα και προγονικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα μικρών αγγείων, εμβρυϊκοί ινοβλάστες, μερικά κύτταρα του	Μόριο προσκόλλησης κυττάρου με κύτταρο

			νευρικού ιστού των εμβρύων και των ενηλίκων	
CD38	45 kDa		Πρώιμου σταδίου B- και T- κύτταρα, B- κύτταρα βλαστικών κέντρων, πλασματοκύτταρα	NAD γλυκοϋδρολάση
CD45	210, 220, 180, 200 kDa	Κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (LCA)	Λευκοκύτταρα	Βασικός ρόλος στην ενεργοποίηση των T- και B- κυττάρων
CD49a	200 kDa	VLA-1	Ενεργοποιημένα T- κύτταρα, μονοκύτταρα	Ιντεγκρίνη που συνδέεται με το CD29, δεσμεύει κολλαγόνο και λαμινίνη-1
CD51	125 kDa		Αιμοπετάλια, μεγακαρυοκύτταρα	Ιντεγκρίνη αν, συνδέεται με το CD61, τη βιτρονεκτίνη, τον παράγοντα von Willebrand, το ινωδογόνο και τη θρομβοσπονδίνη
CD54	75-115 kDa	Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1)	Αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα	Συνδέτης του CD11a/CD18 ή CD11b/CD18, υποδοχέας ρινοϊών
CD58	55-70 kDa	Σχετιζόμενο με τη λεμφοκυτταρική λειτουργία αντιγόνο 3 (LFA-3)	Αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης
CD61	110 kDa		Αιμοπετάλια, μεγακαρυοκύτταρα, μακροφάγα	Υπομονάδα ιντεγκρίνης, συνδέεται με το CD41 ή με το CD51 (υποδοχέας βιτρονεκτίνης)
CD62L	65 kDa	L-σελεκτίνη, LAM-1, LECAM-1	B- και T- κύτταρα, μονοκύτταρα, NK κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης, μεσολαβεί στην κύληση των ουδετεροφίλων επί του ενδοθηλίου
CD71	190 kDa	T9	Όλα τα πολλαπλασιαζόμενα	Υποδοχέας της τρανσφερίνης

			κύτταρα	
CD90	25-35 kDa	Thy-1	Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, θυμοκύτταρα, περιφερικά T- κύτταρα, HEV ενδοθήλιο ανθρώπινων λεμφαδένων	Πιθανή συμμετοχή στη συνδιέγερση των λεμφοκυττάρων, πιθανή παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
CD117	145 kDa	c-kit	Αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, ιστιοκύτταρα	Υποδοχέας του παράγοντα αρχέγονων κυττάρων (SCFR), υποδοχέας αυξητικού παράγοντα
CD133	120 kDa		Αρχέγονοι κυτταρικοί πληθυσμοί	
CD135	130 kDa	FLT-3	Πολυδύναμα, μυελομονοκυτταρικά και αρχέγονα προγονικά B-κύτταρα	Υποδοχέας αυξητικού παράγοντα πρώιμων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων
CD164	80 kDa	MUC-24, πολυ-γλυκοζυλιωμένη πυρηνική πρωτεΐνη 24 (MGC-24v)	Άγνωστη	Άγνωστη
CD184	40 kDa	CXCR4, LESTER	Αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα	Συνδεδεμένος με G πρωτεΐνη υποδοχέας χημειοκίνης. Συνυποδοχέας για τον ιό HIV

Πίνακας 2: Τα διαφορετικά αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που εμπεριέχονται στο ΟΠ.Α (ανατύπωση από *Pelosi et al., 2012; Bhattacharya and Stubblefield, 2009; Kubby et al., 2007* και *Γερμενής 2000*).

A2.2.3.1. CD45

Εκφράζεται σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα αλλά συναντάται πιο έντονα στα λευκοκύτταρα και για αυτό το λόγο είναι γνωστό ως κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (Leukocyte Common Antigen, LCA). Στα λεμφοκύτταρα όμως, εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά, αφού περίπου το 10% της επιφανείας τους καταλαμβάνεται από το δείκτη CD45. Παρουσιάζει πολλές ισομορφές με διαφορετικά μοριακά βάρη (B220 CD45R, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO) (*Bhattacharya and Stubblefield, 2009*). Βασικός ρόλος του δείκτη CD45 είναι η ενεργοποίηση των T και B κυττάρων, που μεσολαβείται από το σύμπλεγμα αντιγόνου-υποδοχέα. Τέλος, πιθανολογείται ότι συμμετέχει στη μεσολαβούμενη από υποδοχείς ενεργοποίηση και σε άλλα λευκοκύτταρα (*Goldsby et al., 2007*).

A2.2.3.2. CD34

Πρόκειται για μία επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη των 90-120 kDa η οποία εκφράζεται στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ΟΠ.Α και του μυελού των οστών και λειτουργεί ως παράγοντας διακυτταρικής προσκόλλησης. Επιπλέον, μεσολαβεί στη σύνδεση των στελεχιαίων κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του μυελού των οστών ή, απευθείας, στα κύτταρα του στρώματος. Παρόλ'αυτά, λίγα είναι γνωστά για την ακριβή της λειτουργία (*Bhattacharya and Stubblefield, 2009*).

Η συχνότητα των CD34⁺ κυττάρων στο μυελό των οστών ενός ενηλίκου ανθρώπου έχει υπολογιστεί ότι είναι 1-3% όλων των εμπύρηνων κυττάρων, ενώ στο ΟΠ.Α είναι 1%. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι ο αριθμός τους μειώνεται με την πάροδο της κήσης. Συγκεκριμένα, στη 17^η εβδομάδα κήσης ο αριθμός τους είναι περίπου το 11% των μικρών μονοπύρηνων κυττάρων ενώ στην 38^η μόλις το 1% (*Mayani and Lansdorp, 1998*). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός τους σε μια μονάδα ΟΠ.Α αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για το αν αυτή θα αποτελέσει μόσχευμα για κάποιον υποψήφιο λήπτη (*Kita et al., 2011*).

A2.2.3.3. CD133

Πρόκειται για μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη των 120 kDa. Ο δείκτης αυτός εκφράζεται σε αρχέγονους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως τα CD34 αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, αλλά εντοπίζεται και σε ακόμα πιο αρχέγονες μορφές. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα CD133⁺ κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη δυνατότητα πολλαπλασιασμού και περιέχουν τα κύτταρα LTC-IC (Long-term culture-initiating cells), σε μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τα CD34⁺ κύτταρα. Τέλος, χρησιμοποιούνται και για την επιλογή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε μεταμοσχευτικές μελέτες, ως εναλλακτική λύση των CD34 κυττάρων (*Bhattacharya and Stubblefield, 2009*).

A2.2.3.4. CD33

Το μόριο CD33 εκφράζεται σε μυελικά προγονικά κύτταρα όπως το διδύναμο προγονικό κύτταρο δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη και τη μονοκυτταρική/μακροφαγική σειρά (CFU-GM), το μονοδύναμο προγονικό κύτταρο δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη σειρά (CFU-G) και το μονοδύναμο προγονικό κύτταρο δεσμευμένο για την ερυθρά σειρά (BFU-E). Επίσης εκφράζεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό ώριμων κοκκιοκυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι λιγότερο από το 30% των CD34⁺ κυττάρων εκφράζουν το δείκτη CD33 (*Bhattacharya and Stubblefield 2009*). Τέλος, λειτουργεί ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, το οποίο εξαρτάται από το σιαλικό οξύ, μία σιαλοπροσκολλητίνη (*Goldsby et al., 2007*).

A2.2.3.5. CD117 ή c-kit

Το μόριο CD117 βρίσκεται κυρίως στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και είναι ο υποδοχέας του παράγοντα των αρχέγονων κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF). Ο δείκτης αυτός εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση των CD34⁺ κυττάρων με στρωματικά και άλλα κύτταρα του μυελού των οστών και του ΟΠ.Α. Επίσης, συμβάλλει στην αυξημένη βιωσιμότητα, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε κύτταρα με φαινότυπο CD34⁺CD117^{low}, το χαμηλό ποσοστό του δείκτη CD117 εμποδίζει το κύτταρο να λάβει ερεθίσματα αλλά και να διαφοροποιηθεί. Παράλληλα, άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα CD117^{high} κύτταρα είναι εκείνα που σχετίζονται με το σχηματισμό των κυτταρικών αποικιών (*Bhattacharya and*

Stubblefield, 2009; Γερμενής, 2000). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι ο συγκεκριμένος δείκτης εμφανίζεται σε μικρό ποσοστό και στα μεσεγγυματικά κύτταρα (*Rebelatto et al., 2008*).

A2.2.3.6. CD71 ή υποδοχέας της τρανσφερρίνης

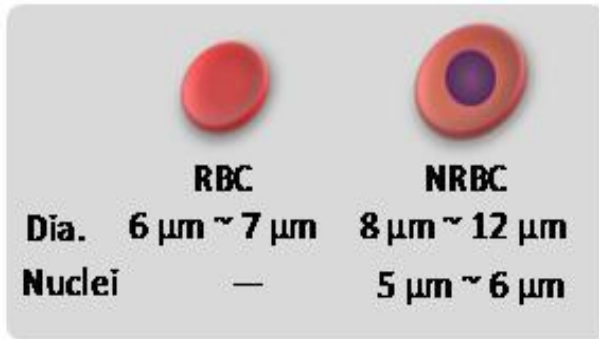
Ο CD71 δείκτης είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και εκφράζεται σε όλα τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ενώ αυξομειώνεται στα λεμφοκύτταρα, όταν αυτά έχουν ενεργοποιηθεί από κάποιο αντιγόνο. Εκφράζεται στην επιφάνεια των δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ) και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία ουσιαστικά αποτελούν τις άωρες μορφές των ερυθρών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος, ενώ χάνεται κατά την ωρίμανση αυτών. Η κύρια λειτουργία του δείκτη CD71 είναι η πρόσληψη του σιδήρου. Συγκεκριμένα, σε ουδέτερο pH, δεσμεύει τη φερροτρανσφερρίνη και «εγκολπώνει» το σύμπλοκο σε όξινο ενδοσωμικό διαμέρισμα, όπου απελευθερώνεται ο σίδηρος (*Marsee et al., 2010, Goldsby et al., 2007*).

A2.3. Εμπύρηνια Ερυθρά Αιμοσφαίρια

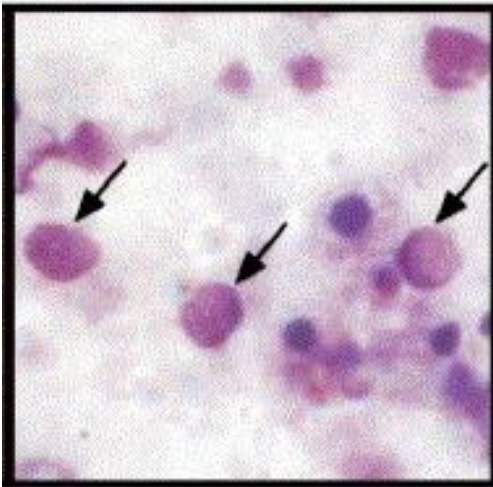
Τα εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια (Nucleated Red Blood Cells, NRBCs) παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά το 1941 από τον Anderson. Είναι άωρα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία παράγονται στο νεογνικό μυελό των οστών ως απόκριση στην ερυθροποιητίνη και αποθηκεύονται σε αυτόν ως πρόγονοι των δικτυοερυθροκυττάρων και κατ' επέκταση των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 8μm-12μm και είναι μονοπύρηνια. Ο πυρήνας τους είναι μικρός (5μm-6μm), πυκνοχρωματικός και οβάλ ή στρογγυλού σχήματος. Το μέγεθός του ελαττώνεται καθώς εξελίσσεται η ωρίμανση του ερυθροκυττάρου. Επιπλέον, διαθέτουν ροδόχροο κυτόπλασμα και στερούνται πυρηνίσκων. Έχουν γενικά μικρό χρόνο ζωής και εμφανίζονται στις φλέβες του πλακούντα κατά το πρώτο μισό της εγκυμοσύνης ενώ στο υπόλοιπο μισό εντοπίζονται σε μικρές ποσότητες. Συγκεκριμένα, σε ένα υγιές νεογνό ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων ελαττώνεται δραματικά στην κυκλοφορία του αίματός του, αμέσως μετά τη γέννηση. Σε ηλικία 12 ωρών ο αριθμός έχει μειωθεί κατά 50% ενώ σε 48 ώρες ανευρίσκονται μόνο 20-30 NRBCs/mm³. Γενικά

όμως, μετά την τρίτη ή τέταρτη μέρα, μετά από φυσιολογικό τοκετό, όπως και μετά από μία εβδομάδα, για τις περιπτώσεις των πρόωρων τοκετών, δεν ανιχνεύονται καθόλου στο αίμα των νεογνών (*Δανιηλίδης και άλλοι, 2006; Hermansen, 2012; Kumo et al., 2010; Rolfo et al., 2007 και Bryant et al., 2006*).

Αντίθετα, υψηλά ποσοστά αυτών στην κυκλοφορία ανευρίσκονται σε παθολογικές καταστάσεις, είτε νεογνών είτε ενηλίκων, όπου η ερυθροποίηση είναι αυξημένη. Αυτό παρατηρείται στη χρόνια υποξία, τη μητρική προεκλαμψία, το διαβήτη της εγκυμοσύνης, τις αιμολυτικές αναιμίες, τις λευχαιμίες, τις θαλασσαιμίες, τα μυελούπερπλαστικά σύνδρομα, την εξωμυελική αιμοποίηση, τις καταστάσεις αιμοποιητικού stress (για παράδειγμα σηψαιμία και μεγάλη αιμορραγία), το σύνδρομο Down, ενώ αυξημένα ποσοστά αυτών ενοχοποιούνται για τη νεογνική ασφυξία. Σε αυτές τις καταστάσεις, η παρουσία των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα σχετίζεται με τη πρόγνωση της νόσου. Σε χειρουργημένους ασθενείς ή σε ασθενείς που πάσχουν από μη-αιματολογικό νόσημα, το ποσοστό θνησιμότητας υπολογίζεται περίπου στο 21,1% για αυτούς που παρουσιάζουν ποσοστό εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα ενώ στο 1,2% για αυτούς που δεν παρουσιάζουν. Παράλληλα, η επίμονη παρουσία αυτών στο αίμα ασθενών που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων δεν αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη αλλά και σε αυτή την περίπτωση η θνησιμότητα εξαρτάται από το πόσο αυξημένο είναι το ποσοστό των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (πολύ μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας σε ασθενείς με συγκέντρωση NRBCs μεγαλύτερη από $0.2 \times 10^9/L$). Σε άλλες περιπτώσεις, η συγκέντρωσή τους αποτελεί χρήσιμο δείκτη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεταμοσχευτικής θεραπείας όπως ακριβώς γίνεται στην περίπτωση των θαλασσαιμιών (η συγκέντρωση των NRBCs να είναι μικρότερη από 5/100 λευκά αιμοσφαίρια) (*Buttarelo and Plebani, 2008*).



Εικόνα 2: Διαφορά μεγέθους μεταξύ των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC) (ανατύπωση από *Kumo et al., 2010*).



Εικόνα 3: Εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια από δείγμα ΟΠ.Α, χρησιμοποιώντας χρώση Giemsa (ανατύπωση από *Kim et al., 2002*).



Εικόνα 4: Εμπύρηννο ερυθρό αιμοσφαίριο σε επίχρισμα περιφερικού αίματος (ανατύπωση από http://imagebank.hematology.org/Content%5C852%5C4103%5C4103_full.JPG», access in 09/03/2013).

A2.3.1. Τα εμπύρνηνα ερυθρά αιμοσφαίρια στις μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Τα εμπύρνηνα ερυθρά αιμοσφαίρια καταλαμβάνουν σημαντικό ποσοστό των συνολικών εμπύρνηνων κυττάρων (Total Nucleated Cells, TNCs) που εμπεριέχονται στο ΟΠ.Α, το οποίο ανέρχεται περίπου στο 8%. Ακόμα και μετά τη διαδικασία της μείωσης όγκου των μονάδων ΟΠ.Α ένα μεγάλο ποσοστό τους παραμένει, με αποτέλεσμα ο αριθμός των συνολικών εμπύρνηνων κυττάρων των μονάδων που θα οδηγηθούν σε μελλοντική μεταμόσχευση να μην αντιπροσωπεύει με ακρίβεια τον αριθμό των CD34⁺ κυττάρων και κατ' επέκταση των λευκών αιμοσφαιρίων, ο οποίος αποτελεί και τον πιο ξεκάθαρο δείκτη για τη μεταμοσχευτική ικανότητα μιας μονάδας (*Larghero et al., 2006* και *Mehta, 2004*).

Τα υψηλά ποσοστά των εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων που παρατηρήθηκαν σε αρκετές μονάδες οδήγησαν σε αρκετούς προβληματισμούς. Αρχικά, τα εμπύρνηνα ερυθρά αιμοσφαίρια λύνονται ευκολότερα σε σχέση με τα λευκοκύτταρα κατά τη διαδικασία απόψυξης. Αυτό έχει ως συνέπεια να παρατηρείται μεγάλη μείωση στον αριθμό των εμπύρνηνων κυττάρων στις μονάδες που είχαν μεγάλο αριθμό εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων πριν την κρυοκατάψυξη. Δεύτερον, υπήρξε ανησυχία από κλινικούς γιατρούς ότι ο συνυπολογισμός του αριθμού των εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε αυτόν των εμπύρνηνων κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη εκτίμηση της αποτελεσματικής κυτταρικής δόσης για μεταμόσχευση. Διάφορες μελέτες ωστόσο, έχουν δείξει ότι η παρουσία των κυττάρων αυτών σε μονάδες ΟΠ.Α δε μειώνει τη μεταμοσχευτική ικανότητα αυτών. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι μονάδες με υψηλά ποσοστά εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων μεταμοσχεύονται γρηγορότερα σε σχέση με τις μονάδες που έχουν ίδιο αριθμό συνολικών εμπύρνηνων κυττάρων αλλά στερούνται εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (*Larghero et al., 2006; Mehta 2004* και *Stevens et al. 2002*).

Όσον αφορά στη δοκιμασία ελέγχου δυναμικότητας των κυττάρων, η Salge-Bartels και η ομάδα της παρατήρησαν ότι η κυτταρική δυναμικότητα δεν επηρεάζεται από το ποσοστό των εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (*Salge-Bartels et al., 2009*). Παράλληλα, μελέτη του Robin και της ομάδας του έδειξε ότι ασθενείς που μεταμοσχεύθηκαν με υψηλά ποσοστά εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων είχαν υψηλότερη ανάκτηση κυττάρων προερχόμενων από τη μυελική σειρά, σε μικρότερο

χρονικό διάστημα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι υψηλή κυτταρική δόση εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων και CD34⁺ κυττάρων, σχετίζονται με μειωμένα περιστατικά θνησιμότητας που σχετίζονται με τη μεταμόσχευση. Τέλος, αναφέρουν ότι η μέτρηση των κυττάρων αυτών θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως ποιοτικός έλεγχος μιας μονάδας ΟΠ.Α αλλά και ως δείκτης για τη γρήγορη ανασύσταση της ερυθράς σειράς (*Robin et al., 2008*).

A2.4. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα ως μόσχευμα

Το ΟΠ.Α αποτελεί πηγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και πολυδύναμων προγονικών κυττάρων και χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για την ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος και για την αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος σε ένα μεγάλο εύρος παθήσεων (Πίνακας 3). Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη μεταμόσχευση ως εναλλακτική λύση των αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος, ανοίγοντας έτσι νέους ορίζοντες στην αντιμετώπιση αιματολογικών νοσημάτων, δυσλειτουργιών του μυελού των οστών, κληρονομικών μεταβολικών νοσημάτων, ανοσολογικών ανωμαλιών και άλλων γενετικών παθήσεων τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες (*Butler and Menitove, 2011 και Rubinstein, 2009*).

Ασθένειες που θεραπεύονται με μεταμόσχευση ΟΠ.Α	
<u>A. Κακοήθη νοσήματα</u>	
Οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία	Πολλαπλό μυέλωμα
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	Λεμφώματα
Οξεία μυελοειδής λευχαιμία	Κοινές ανοσοανεπάρκειες
Χρόνια μυελοειδής λευχαιμία	Νευροβλάστωμα
Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο	
<u>B. Μη-κακοήθη νοσήματα</u>	
Νόσος του Krabbe	Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Ασθένειες που θεραπεύονται με μεταμόσχευση ΟΠ.Α	
<u>B. Μη-κακοήθη νοσήματα</u>	
Ιστικοκυττάρωση των κυττάρων Langerhans	Νόσος Gunter
Νόσος Lesch-Nyhan	Σύνδρομο Hunter
Αναιμία Blackfan-Diamond	Σύνδρομο Hurler
Οστεοπόρωση	Σύνδρομο Wiskott-Aldrich
Θαλασσαιμία	Σύνδρομο Kostmann
Αναιμία Fanconi	Διαβήτης τύπου I
Απλαστική αναιμία	

Πίνακας 3: Νοσήματα που θεραπεύονται με μεταμόσχευση ΟΠ.Α (ανατύπωση από Ali and Al-Mulla, 2012 και Armson, 2005).

Το ΟΠ.Α παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος (Πίνακας 4). Αρχικά, αν αναλογιστεί κανείς ότι το ποσοστό των γεννήσεων σε παγκόσμιο επίπεδο είναι περίπου 140.000.000 το χρόνο, σύμφωνα με στατιστικά του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), θα καταλάβει ότι το ΟΠ.Α είναι μια άφθονη πηγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Επιπλέον, ο τρόπος συλλογής του είναι ακίνδυνος τόσο για τη μητέρα όσο και για το νεογνό αφού γίνεται μετά το τέλος του τοκετού και κατ' αυτόν τον τρόπο δεν εναντιώνεται σε ηθικές ή θρησκευτικές αρχές. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα έναντι του μυελού των οστών αφορά την ιστοσυμβατότητα δότη-λήπτη. Ενώ για τη μεταμόσχευση μυελού των οστών αναζητούμε σχεδόν πλήρη συμβατότητα (100%), με το ΟΠ.Α η μεταμόσχευση απαιτεί μικρότερου βαθμού συμβατότητα (65-70%). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το σύστημα των HLA (Human Leucocyte Antigens) αντιγόνων δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένο στο ΟΠ.Α. Αυτό εξασφαλίζει ευκολότερη εύρεση μοσχεύματος και χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης αντίδρασης μοσχεύματος κατά του ξενιστή (Graft-versus-Host Disease, GvHD). Παράλληλα, σημαντικό πλεονέκτημα έναντι του μυελού των οστών αποτελεί ο μειωμένος κίνδυνος μετάδοσης λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού της λοιμώδους μονοπυρήνωσης (EBV).

Ταυτόχρονα, όμως, μειονεκτεί στον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται στην εκάστοτε μονάδα ΟΠ.Α με αποτέλεσμα την καθυστερημένη εγκατάσταση αυτών των κυττάρων στους στοχευμένους ιστούς του λήπτη (Πίνακας 5). Το εμπόδιο αυτό ξεπεράστηκε με τη μεταμόσχευση πολλαπλών μονάδων στον ίδιο λήπτη με σκοπό την αύξηση της τελικής κυτταρικής δόσης που θα μεταμοσχευθεί, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιβίωση των κυττάρων στον οργανισμό του ξενιστή (*Ali and Al-Mulla, 2012; Badowski and Harris, 2012; Koo and Ahn, 2012; Alkindi and Dennison, 2011; Tse and Laughlin, 2005 και Armson, 2005*).

Πλεονεκτήματα του ΟΠ.Α ως πηγής αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση
1. Το ΟΠ.Α είναι μία άφθονη πηγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και μπορεί να συλλεχθεί εύκολα και χωρίς κανένα κίνδυνο για τη μητέρα ή το νεογνό.
2. Απουσία ηθικών, θρησκευτικών και πολιτικών εναντιοτήτων.
3. Μειωμένος κίνδυνος μετάδοσης ιικών λοιμώξεων.
4. Δυνατότητα αποθήκευσης μονάδων ΟΠ.Α σε τράπεζες ΟΠ.Α.
5. Απουσία κινδύνου σχηματισμού τερατώματος.
Πλεονεκτήματα του ΟΠ.Α ως πηγής αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση
6. Μονάδες ΟΠ.Α που έχουν κρυοκαταψυχθεί μπορούν εύκολα να αποσταλλούν και να αποψυχθούν όταν χρειαστεί, σε αντίθεση με το μυελό των οστών, ο οποίος έχει μικρό χρόνο ζωής.
7. Μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης αντίδρασης μοσχεύματος κατά του ξενιστή.
8. Ανεκτικότητα σε μερική συμβατότητα δότη-λήπτη.
9. Τα κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με αυτά του μυελού των οστών.

Πίνακας 4: Πλεονεκτήματα του ΟΠ.Α ως πηγής αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση (*ανατύπωση από Ali and Al-Mulla, 2012; Koo and Ahn, 2012; Alkindi and Dennison, 2011; Tse and Laughlin, 2005 και Armson, 2005*).

Μειονεκτήματα του ΟΠ.Α ως πηγής αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση

- 1. Ο περιορισμένος αριθμός αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που περιέχονται στις μονάδες ΟΠ.Α μπορεί να συμβάλλουν στην αποτυχία και στην καθυστερημένη κινητικότητα του μοσχεύματος, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ενήλικες λήπτες.**
- 2. Η περίπτωση πιθανής εμφάνισης διαφόρων παθήσεων κατά την ενήλικη ζωή του εμβρύου-δότη και οι επιδράσεις τους στο λήπτη είναι άγνωστες.**
- 3. Δεν είναι εφικτή η συλλογή επιπλέον αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από το δότη σε περίπτωση αποτυχίας του μοσχεύματος αλλά ούτε και η συλλογή λεμφοκυττάρων για τους λήπτες που υποτροπίασαν μετά από αρχική αλλομεταμόσχευση ΟΠ.Α.**

Πίνακας 5: Μειονεκτήματα του ΟΠ.Α ως πηγής αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση (ανατύπωση από *Ali and Al-Mulla, 2012; Koo and Ahn, 2012; Alkindi and Dennison, 2011; Tse and Laughlin, 2005; Armson, 2005*).

A3. ΑΛΛΟΓΕΝΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

A3.1. Ορισμός και σκοπός

Ως «τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος» ορίζεται εκείνη η υπηρεσία που αποθηκεύει το αίμα για μελλοντική χρήση. Ο βασικός σκοπός της είναι η παροχή αποτελεσματικών και ασφαλών μοσχευμάτων στους πιθανούς μελλοντικούς λήπτες. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί οργανισμοί προτύπων, κανονισμών και πιστοποίησης/διαπίστευσης που αποσκοπούν στην εφαρμογή κατάλληλων συστημάτων ποιότητας σε κάθε τράπεζα (*Lecchi et al., 2009*).

A3.1.1. Δημόσια τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Οι δημόσιες τράπεζες αποθηκεύουν μονάδες ΟΠ.Α που δωρίζουν οι μητέρες-δότες με γραπτή συγκατάθεσή τους και που εφόσον πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις μετά τον εργαστηριακό έλεγχο είναι διαθέσιμες για μελλοντική χρήση από τον οποιοδήποτε πιθανό λήπτη. Αυτές οι μονάδες καταγράφονται και τα στοιχεία τους είναι προσβάσιμα από αρμόδιους εθνικούς και παγκόσμιους οργανισμούς υγείας προς αναζήτηση κατάλληλης μονάδας για τον εκάστοτε ενδιαφερόμενο λήπτη. Αυτός ο τύπος της μεταμόσχευσης ονομάζεται «αλλογενής» (*Butler and Menitove, 2011*).

Πέρα από την αλλογενή μεταμόσχευση υπάρχει και η «κατευθυνόμενη». Σε αυτή τη περίπτωση οι γονείς, που το πρώτο τους παιδί πάσχει από κάποιο νόσημα, για το οποίο απαιτείται μεταμόσχευση, καταφεύγουν στην τράπεζα και ζητούν συλλογή και κρυοκατάψυξη της μονάδας ΟΠ.Α του επόμενου παιδιού τους. Σκοπός της κατευθυνόμενης μεταμόσχευσης είναι η θεραπεία του άρρωστου παιδιού ή άλλου μέλους της οικογένειας που μπορεί να νοσήσει (*McKenna and Sheth, 2011 και Armson, 2005*).

A3.2. Σύντομη ιστορική αναδρομή

Η πρώτη προσπάθεια για μεταμόσχευση ΟΠ.Α αναφέρεται το 1972. Ωστόσο, η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση έγινε το 1988 από την Eliane Gluckman και την ομάδα της στο Παρίσι. Ο λήπτης ήταν ένα παιδί που έπασχε από αναιμία Fanconi και ο

δότης ήταν ο HLA-συμβατός αδερφός του. Εξαιτίας της επιτυχίας αυτής το 1992 δημιουργείται η πρώτη δημόσια τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος στη Νέα Υόρκη των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής ενώ τον Αύγουστο και το Σεπτέμβρη του 1993 μεταμοσχεύονται δύο μονάδες σε παιδιά με οξεία λευχαιμία στο Πανεπιστήμιο του Duke. Έκτοτε, περισσότερες από 100 δημόσιες τράπεζες έχουν συλλέξει περισσότερες από 500.000 μονάδες ενώ έχουν μεταμοσχευθεί πάνω από 25.000 μονάδες σε παγκόσμιο επίπεδο (*Gluckman et al., 2011; Rubinstein, 2009 και Navarrete and Contreras 2009*).

A3.2.1. Στατιστικά στοιχεία στον ελληνικό χώρο

Σύμφωνα με στοιχεία του Εθνικού Οργανισμού Μεταμοσχεύσεων (ΕΟΜ) οι μονάδες ΟΠ.Α που μεταμοσχεύθηκαν από το 2007 ως το 2011 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6).

Χρονολογία	Μονάδες ΟΠ.Α
2007	15
2008	10
2009	8
2010	13
2011	4
Σύνολο	50

Πίνακας 6: Αριθμός μονάδων ΟΠ.Α που μεταμοσχεύθηκαν στην Ελλάδα τα έτη 2007-2011 (*Εθνικός Οργανισμός Μεταμοσχεύσεων 2011*).

A3.3. Συλλογή, επεξεργασία και κρυοκατάψυξη μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος

A3.3.1. Συλλογή

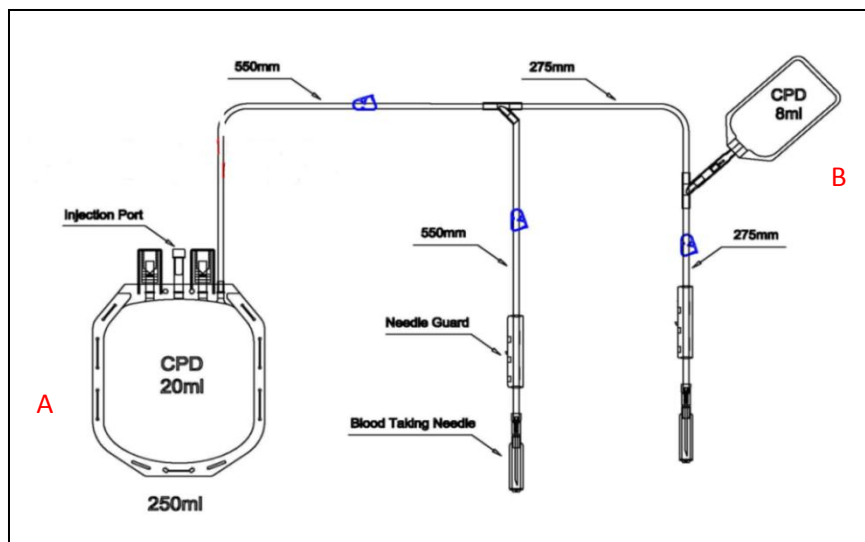
Βασική παράμετρος στη συλλογή ΟΠ.Α είναι η μεγιστοποίηση του όγκου συλλογής σε συνάρτηση με την ελαχιστοποίηση μόλυνσής του από βακτήρια, μύκητες, παθογόνους παράγοντες στο αίμα της μητέρας και διάφορες άλλες εκκρίσεις κατά την διάρκεια του τοκετού. Για να επιτευχθεί αυτό, το σύστημα των ασκών συλλογής ΟΠ.Α πρέπει να είναι «κλειστό». Το ΟΠ.Α συλλέγεται από τον πλακούντα, μετά από φυσιολογικό τοκετό ή καισαρική τομή, κυρίως με δύο μεθόδους: τη μέθοδο η οποία

πραγματοποιείται στην αίθουσα τοκετών όταν ακόμα ο πλακούντας δεν έχει αποκολληθεί (ενδομήτριος συλλογή, *in utero*) και τη μέθοδο ή οποία πραγματοποιείται μετά την αποκόλληση του πλακούντα σε ειδική αίθουσα, δίπλα σε αυτή του τοκετού (εξωμήτριος συλλογή, *ex utero*) (*Rubinstein, 2009*).

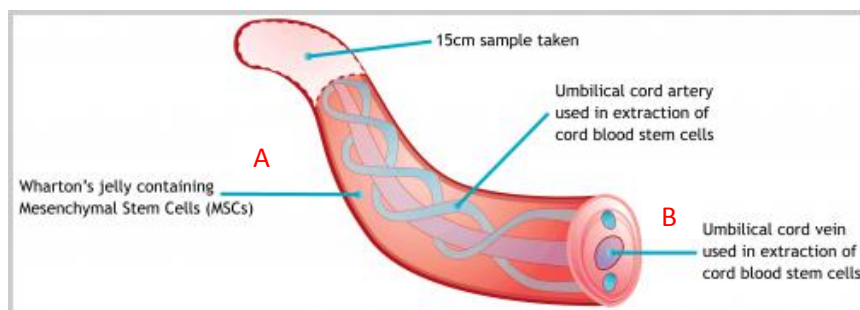
Η ενδομήτρια συλλογή πραγματοποιείται μέσα στην αίθουσα τοκετών από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό όταν ακόμα ο πλακούντας δεν έχει αποκολληθεί από την μήτρα. Μετά την γέννηση του νεογνού γίνεται απολίνωση του ομφάλιου λώρου όσο το δυνατόν πιο κοντά στο νεογνό, γεγονός που διευκολύνει τη μέγιστη συλλογή αίματος. Στην συνέχεια, πριν τρυπηθεί η ομφαλική φλέβα, αποστειρώνεται η περιοχή με ειδικό υγρό για την αποφυγή μολύνσεων. Το αίμα από τον ομφάλιο λώρο συλλέγεται, με τη βοήθεια της βαρύτητας, σε ασκό συλλογής, ο οποίος περιέχει αντιπηκτικό. Στο τέλος της συλλογής ο ασκός ανακινείται με προσοχή έτσι ώστε να γίνει καλύτερη ανάμειξη του αίματος με το αντιπηκτικό. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη ποσότητα αίματος που συλλέγεται, δηλαδή μέχρι και 200ml (*Harris, 2008 και Armson 2005*).

Η εξωμήτριος συλλογή πραγματοποιείται μετά την αποκόλληση του πλακούντα σε χώρο εκτός της αίθουσας τοκετών. Ο πλακούντας τοποθετείται σε αποστειρωμένη ειδική υποδοχή (χοάνη) ύψους 80 εκατοστών περίπου πάνω από τον πάγκο συλλογής και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την ενδομήτριο συλλογή. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι λαμβάνει χώρα εκτός της αίθουσας τοκετού ενώ τα μειονεκτήματα είναι η ταχεία πήξη του αίματος του πλακούντα και η αυξημένη πιθανότητα μολύνσεων. Γι' αυτό το λόγο η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται εντός 5-10 λεπτών και με ιδιαίτερη προσοχή (*Armson, 2005*).

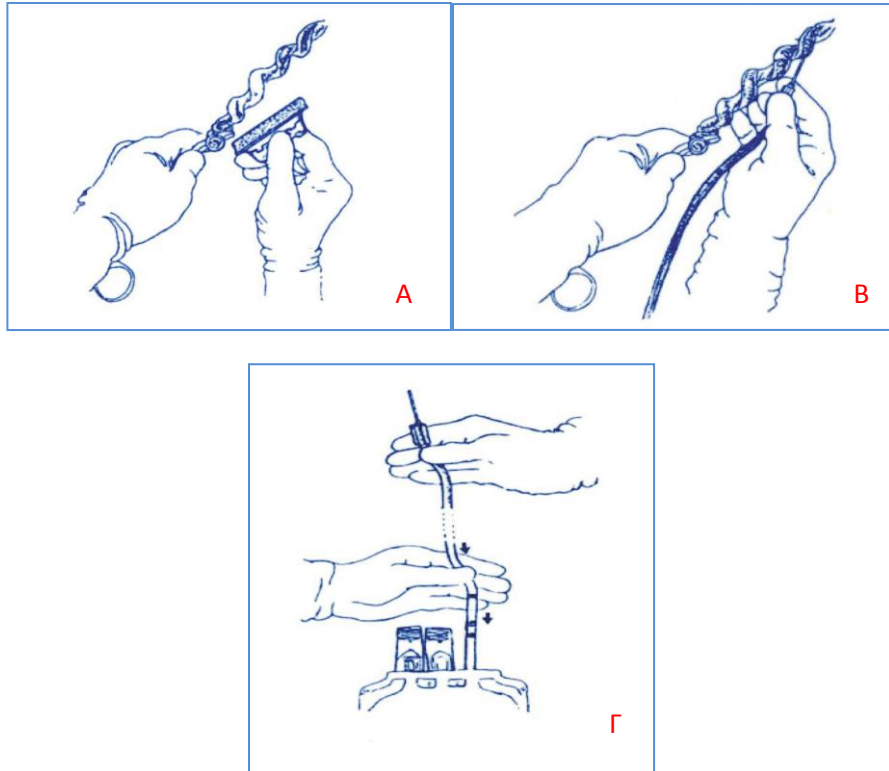
Μετά το πέρας της συλλογής της μονάδας ΟΠ.Α πραγματοποιείται και συλλογή δειγμάτων από τη μητέρα-δότρια, τα οποία θα οδηγηθούν σε ποιοτικό έλεγχο. Όταν ολοκληρωθεί όλη η διαδικασία, η μονάδα και τα δείγματα διατηρούνται στους 6-8°C και παραδίδονται στην τράπεζα μέσα σε εικοσιτέσσερις έως σαρανταοκτώ ώρες (*Koliakos et al., 2007*).



Εικόνα 5: Ασκός συλλογής μονάδας ΟΠ.Α (A: Ασκός συλλογής μονάδας ΟΠ.Α που περιέχει 20 ml αντιπηκτικό CPD, B: Ασκός πρόσθετου αντιπηκτικού 8 ml) (ανατύπωση από «www.pall.com» access in 03/02/2013).



Εικόνα 6: Ανατομία του ομφάλιου λώρου (A: Η βαρτόνεις γέλη, από όπου γίνεται η απομόνωση των μεσεγγυματικών κυττάρων, B: Η ομφαλική φλέβα, από όπου συλλέγεται η μονάδα ΟΠ.Α) (ανατύπωση από «<http://www.cells4life.co.uk/cord-information-guide>» access in 17/02/2013).



Εικόνα 7: Διαδικασία συλλογής ΟΠ.Α [Α: ο μαιευτήρας τοποθετεί μια αιμοστατική λαβίδα στον ομφάλιο λώρο όσο πιο κοντά γίνεται στο νεογνό και μία δεύτερη όσο πιο κοντά γίνεται στην πρώτη. Ύστερα αποστειρώνεται κατά 4 εκ. ο ομφάλιος λώρος κατευθείαν πάνω από τη δεύτερη λαβίδα χρησιμοποιώντας γάζα εμποτισμένη με ιωδιούχο ποβιδίνη (Betadine) ή βάμμα ιωδίου. Β: αφαιρείται το προστατευτικό κάλυμμα της βελόνας και εισάγεται στο προετοιμασμένο τμήμα του ομφάλιου λώρου ενώ στην συνέχεια τοποθετείται ο ασκός συλλογής σε χαμηλότερη θέση από το σημείο παρακέντησης και η συλλογή επέρχεται μέσω της βαρύτητας. Γ: αφαίρεση της βελόνας όταν η ροή του αίματος σταματήσει] (Armson, 2005).

A3.3.2. Επεξεργασία

A3.3.2.1. Μείωση όγκου

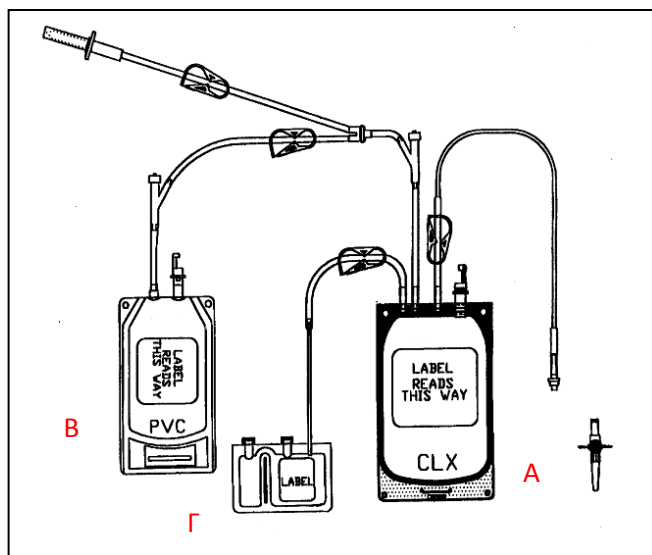
Σκοπός της μείωσης όγκου των μονάδων ΟΠ.Α και της αφαίρεσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων από αυτές είναι αρχικά η εξοικονόμηση χώρου κατά την αποθήκευσή τους. Παράλληλα, συμβάλλουν στην αποφυγή ασυμβατότητας ABO και Rhesus μεταξύ δότη και λήπτη, ενώ προσφέρουν υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης και ζωτικότητας των κυττάρων μετά την απόψυξη των μονάδων. Εξίσου σημαντική η συμβολή της μείωσης

όγκου είναι ότι το δείγμα επιδέχεται άμεση χρήση στο πλαίσιο της γονιδιακής θεραπείας, στην κυτταρική επέκταση καθώς και στην κλασματοποίηση του υλικού για μελλοντική πολλαπλή χρήση (*Harris, 2008 και Alonso et al., 2001*).

Η διαδικασία της μείωσης όγκου πραγματοποιείται είτε με χειροκίνητες είτε με ημι-αυτοματοποιημένες μεθόδους. Στις χειροκίνητες συγκαταλέγεται η μέθοδος της φυγοκέντρησης μετά από προσθήκη του αντιδραστήριου HES (Hydroxy-ethyl starch, άμυλο υδροξυαιθυλίου) ενώ στις ημι-αυτοματοποιημένες, οι μέθοδοι SEPAX και AXP. Και οι τρεις μέθοδοι καταλήγουν σε «συμπυκνωμένο» παράγωγο ΟΠ.Α που περιέχει όλους τους εμπύρηνους κυτταρικούς πληθυσμούς που συναντώνται στο αρχικό δείγμα (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και ορισμένα εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια) (*Harris, 2008*).

Η χειροκίνητη μέθοδος της φυγοκέντρησης με το αντιδραστήριο HES περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα. Αρχικά, συλλέγονται τα δείγματα για τον ποιοτικό έλεγχο, προστίθεται στον ασκό το αντίδραστήριο HES, σε κατάλληλη αναλογία και τοποθετείται ανάποδα για περίπου 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την καθίζηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στη συνέχεια, η στιβάδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μεταφέρεται σε έναν συνδεδεμένο ασκό αφήνοντας το πλάσμα και τη στιβάδα των εμπύρηνων κυττάρων (buffy coat) στον ασκό. Το υπερκείμενο πλάσμα μαζί με τα εμπύρηνια κύτταρα φυγοκεντρούνται. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, ο όγκος έχει μειωθεί σημαντικά ενώ στον ασκό μένουν μόνο τα εμπύρηνια κύτταρα (*Takanashi, 2010 και Koliakos et al., 2007*).

Η αρχή λειτουργίας των ημι-αυτόματων μεθόδων είναι ίδια. Σε αυτές, η συλλεχθείσα μονάδα ΟΠ.Α διανέμεται σε ειδικούς ασκούς «κλειστού τύπου» (Εικόνα 7) με αυτοματοποιημένο τρόπο. Η όλη διαδικασία αποτελείται από δύο φυγοκεντρήσεις. Με άλλα λόγια, ένα μηχάνημα αναλαμβάνει το διαχωρισμό των στιβάδων του αίματος και τη διανομή τους σε μικρότερους ασκούς, με τελικό προϊόν τη στιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων (buffy coat), όπως και στη χειροκίνητη μέθοδο (*Solves et al., 2012*).



Εικόνα 8: Σύστημα ασκών επεξεργασίας μονάδας ΟΠ.Α (Α: Ασκός επεξεργασίας, Β: Ασκός πλάσματος, Γ: ασκός κρυοκατάψυξης εμπύρηνων κυττάρων) (ανατύπωση από «www.pall.com», access in 02/03/2013).

A3.3.2.2. Ποιοτικός έλεγχος

Ο ποιοτικός έλεγχος των μονάδων ΟΠ.Α αποτελείται από ποικίλες διαδικασίες και αφορά τα δείγματα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των διαδικασιών μείωσης όγκου και κρυοκατάψυξης καθώς και τα δείγματα της μητέρας. Οι διαδικασίες που πραγματοποιούνται συνήθως είναι: τυποποίηση των HLA αντιγόνων, αιματολογικός, μικροβιολογικός και ιολογικός έλεγχος, έλεγχος δυναμικότητας κυττάρων και μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (Navarrete and Contreras, 2011 και Rubinstein 2009).

I. Τυποποίηση HLA-αντιγόνων¹

Η τυποποίηση των HLA-αντιγόνων αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα βήματα του ποιοτικού ελέγχου της μονάδας που προορίζεται για μελλοντική μεταμόσχευση. Σύμφωνα με μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι ιδιαίτερη σημασία στη μεταμόσχευση

¹ Τα HLA-αντιγόνα (Human Leucocyte Antigens) είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται, με διαφορετική κατανομή, στην επιφάνεια όλων σχεδόν των εμπύρηνων κυττάρων. Το σύνολο των γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή των HLA αντιγόνων ονομάζεται μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Τα HLA-αντιγόνα, καθώς και τα γονίδια που τα κωδικοποιούν, κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, που φέρονται ως τάξεις I, II και III (Kubby et al., 2007).

μονάδων ΟΠ.Α έχουν τα HLA-A και HLA-B αντιγόνα της τάξης I και το HLA-DRB1² της τάξης II. Η τυποποίηση αυτών των αντιγόνων γίνεται σε απομονωμένο DNA από δείγμα της μητέρας αλλά και από δείγμα που λήφθηκε από τη μονάδα πριν τη διαδικασία μείωσης όγκου. Οι τύποι των μεθόδων που χρησιμοποιούνται είναι δύο: αυτές της χαμηλής ανάλυσης (low resolution) και αυτές της υψηλής (high resolution). Χαμηλής ανάλυσης είναι η μέθοδος SSO³ (Sequence-Specific Oligonucleotide) ενώ η μέθοδος SSP⁴ (Sequence-Specific Primer) προσφέρει και υψηλή ανάλυση. Σε πρώτο στάδιο η τυποποίηση των αντιγόνων γίνεται με τη μέθοδο SSO και όταν η μονάδα ζητηθεί για μεταμόσχευση με τη μέθοδο SSP (*Dunckley, 2012; Picardi and Arcese, 2010 και Moise, 2005*).

II. Αιματολογικός έλεγχος

Ο αιματολογικός έλεγχος περιλαμβάνει δύο επιμέρους δοκιμασίες, τον καθορισμό της ομάδας αίματος και τον έλεγχο των αιμοσφαιρινοπαθειών σε δείγματα που λήφθηκαν από τον ασκό συλλογής που απομονώνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια (*Picardi and Arcese, 2010*).

Ο προσδιορισμός των ομάδων αίματος του συστήματος ABO και Rhesus αποτελεί καθοριστικό παράγοντα επιλογής ενός μοσχεύματος ανάμεσα σε δύο όταν αυτά είναι συμβατά με το λήπτη και έχουν και ίδιες ποσότητες εμπύρηνων κυττάρων. Εξάλλου, ασυμβατότητα στις ομάδες αίματος μεταξύ δότη και λήπτη οδηγεί σε καθυστερημένη εμφύτευση του μοσχεύματος καθώς και σε χρόνια αιμόλυση μετά τη μεταμόσχευση. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως ανοσολογικού τύπου καθώς βασίζονται στη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος που φαίνεται με τη μορφή

² Η τάξης II περιοχή περιέχει τους στενά συνδεδεμένους τόπους των α- και β- αλυσίδων των HLA-DR, -DP και -DQ αντιγόνων. Η DR-υποπεριοχή περιλαμβάνει ένα μη πολυμορφικό γονίδιο α-αλυσίδας (DRA) και εννέα γονίδια β-αλυσίδας (DRB1-9). Από αυτά το DRB1 είναι το πιο πολυμορφικό (*Kubby et al., 2007*).

³ Η μέθοδος περιλαμβάνει κυρίως δύο στάδια: την ενίσχυση του DNA-στόχου με PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) και τον υβριδισμό του προϊόντος ενίσχυσης με ειδικής αλληλουχίας ολιγονουκλεοτίδια (probes), που ανιχνεύουν άμεσα τις πολυμορφικές αλληλουχίες. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι: η δυνατότητα τυποποίησης μεγάλου αριθμού δειγμάτων, η δυνατότητα προσθήκης νέων ανιχνευτών για την τυποποίηση κάθε νέου αλληλομόρφου και η ύπαρξη θετικού και αρνητικού μάρτυρα για κάθε δείγμα (*Nunes et al. 2011*).

⁴ Στη μέθοδο SSP χρησιμοποιούνται πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών. Η ειδικότητα των εκκινητών προσδιορίζει τα αλληλόμορφα γονίδια ή την ομάδα αλληλομόρφων ώστε να γίνει η τυποποίηση. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ταχύτητα, η εύκολη εφαρμογή και η υψηλή διακριτική ικανότητα (*Nunes et al., 2011*).

κροκκίδωσης ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και μοριακές μέθοδοι (Westhoff, 2006).

Ο έλεγχος των αιμοσφαιρινοπαθειών είναι απαραίτητος για την αποφυγή μετάδοσης παθολογικών αιμοσφαιρινών μέσω της μεταμόσχευσης. Οι αιμοσφαιρίνες για τις οποίες ελέγχεται η εκάστοτε μονάδα είναι οι: A, A2, S, C, F και H. Αν υπάρχει ιστορικό οποιασδήποτε αιμοσφαιρινοπάθειας ή αν βρεθούν άλλες αιμοσφαιρίνες εκτός των HbA και HbF συνιστάται περαιτέρω έλεγχος. Μονάδες ομόζυγες ως προς τη δρεπανοκυτταρική αναιμία ή τη θαλασσαιμία ή ακόμα και ετερόζυγες ως προς αυτές απορρίπτονται (Barker et al., 2011).

III. Μικροβιολογικός έλεγχος

Η μικροβιολογική μόλυνση των μονάδων ελέγχεται σε δείγματα που προέρχονται από αυτές πριν ή μετά τη μείωση όγκου με εγκεκριμένες μεθόδους. Ο έλεγχος γίνεται με τη μεταφορά των δειγμάτων σε ειδικές φιάλες αιμοκαλλιέργειών για την ανίχνευση αερόβιων/αναερόβιων μικροοργανισμών και μυκήτων. Η οποιαδήποτε ανάπτυξη μικροβίου ελέγχεται περαιτέρω με βιοχημικές μεθόδους (Rubinstein, 2009 και M-Reboredo et al., 2000).

IV. Ορολογικός έλεγχος νοσημάτων

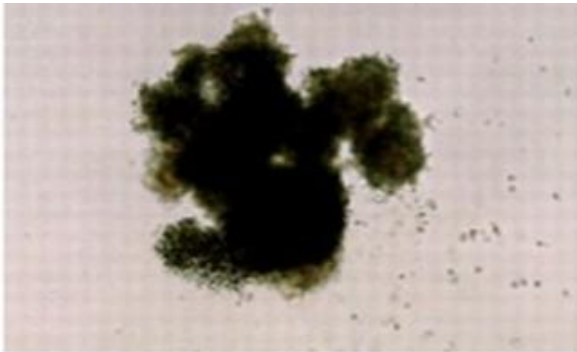
Δείγμα της μητέρας και της μονάδας εξετάζονται για τις παρακάτω μολυσματικές ασθένειες: HIV1-2 (Human Immunodeficiency Virus, Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας), HBV (Hepatitis B Virus, Ιός της Ηπατίτιδας Β), HCV (Hepatitis C Virus, Ιός της Ηπατίτιδας Γ), HTLV1-2 (Human T-cell Lymphotropic Virus, Ανθρώπινος Λεμφοτρόπος Ιός), CMV (Cytomegalovirus, Κυτταρομεγαλοϊός) West Nile Virus (Ιός του Δυτικού Νείλου), *Trypanosoma cruzi* (ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου Chagas) και *Treponema pallidum* (σύφιλη). Ανάλογα όμως με τις διάφορες επιδημίες που παρουσιάζονται κατά καιρούς, προσαρμόζεται ανάλογα και το εύρος των ασθενειών που ελέγχεται (Picardi and Arcese, 2010).

V. Έλεγχος δυναμικότητας κυττάρων (Colony Forming Unit Assay, CFU Assay)

Η κλωνογόνος in vitro καλλιέργεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων επιτρέπει τη μελέτη ενδιάμεσων πληθυσμών μεταξύ αρχέγονων και τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων, καθώς και της επίδρασης διαφόρων εξωγενών παραγόντων (κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων) στην αιμοποίηση. Η δοκιμασία CFU

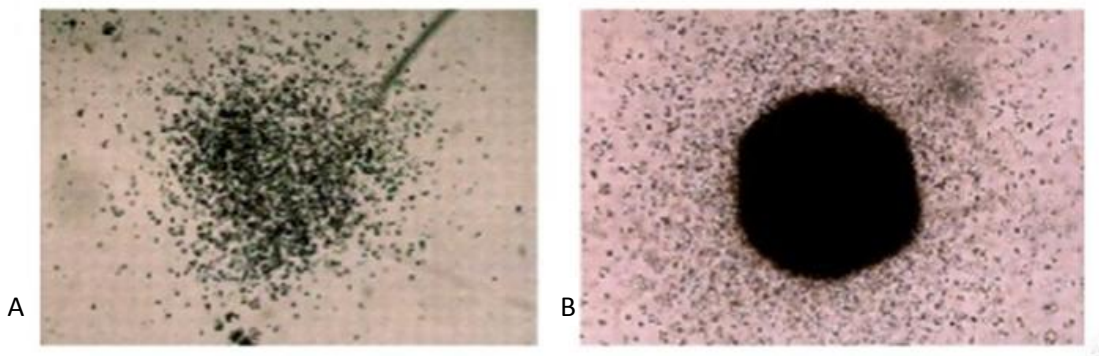
συνίσταται σε καλλιέργεια των κυττάρων σε ημιστερέο καλλιεργητικό υλικό όπως μεθυλοκυτταρίνη, κολλαγόνο ή άγαρ παρουσία συνδυασμού κυταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Η χρήση ημιστερεού υλικού εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα παραμένουν σε ένα συγκεκριμένο σημείο του τρυβλίου στο οποίο αρχικά ενοφθαλμίζονται, με αποτέλεσμα οι κυτταρικές διαιρέσεις μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (περίπου 14 ημέρες) να οδηγούν στο σχηματισμό διακριτής αποικίας γύρω από το αρχικό κύτταρο (*Wognum et al., 2013 και Page et al., 2011*).

Το μέγεθος και η μορφολογία των αποικιών επιτρέπει το χαρακτηρισμό του αρχικού κυττάρου από το οποίο προήλθε η κάθε αποικία (Colony Forming Cell, CFC), ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησής του. Οι αποικίες διαφορετικής μορφολογίας που αναγνωρίζονται στη δοκιμασία αυτή είναι οι: BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid, μονοδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ερυθρά σειρά) (Εικόνα 8), CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte, ωριμότερο διδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη και τη μονοκυτταρική σειρά) (Εικόνα 9A), CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Monocyte, Megakaryocyte, πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη, ερυθρά, μονοκυτταρική και μεγακαρυωτική σειρά) (Εικόνα 9B) (*Adami et al., 2005*).



Εικόνα 9: Παράδειγμα αποικίας BFU-E⁵, η οποία είναι σύνολο μικρότερων κυττάρων της ερυθράς σειράς και αναπτύσσονται μετά από 10-15 μέρες καλλιέργειας (ανατύπωση από <http://imagebank.hematology.org/>, access in 02/03/2013).

⁵ Οι αποικίες BFU-E έχουν πορφυρό χρώμα λόγω παρουσίας της αιμοσφαιρίνης και μπορεί να εμφανίζονται ως μεγάλες μεμονωμένες αποικίες ή ως μεγάλες αποικίες που αποτελούνται από μικρότερα συσσωματώματα (*Nissen-Druey et al., 2005*).



Εικόνα 10Α: Παράδειγμα αποικίας CFU-GM⁶ με την τυπική μορφολογία της διασποράς των κυττάρων από το κέντρο προς την περιφέρεια (ανατύπωση από «<http://imagebank.hematology.org/>», access in 02/03/2013).

Εικόνα 10Β: Παράδειγμα αποικίας CFU-GEMM⁷ η οποία περιέχει τουλάχιστον δύο ευδιάκριτες κυτταρικές σειρές (ανατύπωση από «<http://imagebank.hematology.org/>», access in 02/03/2013).

VI. Μέτρηση κυττάρων αίματος

Αφού συλλεχθούν δείγματα πριν και μετά τη διαδικασία μείωσης όγκου, γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων με αιματολογικό αναλυτή. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων καθορίζει το αν η μονάδα περνάει στο επόμενο στάδιο του ποιοτικού ελέγχου, δηλαδή στην καταμέτρηση των εμπύρηνων κυττάρων και της ζωτικότητας αυτών με κυτταρομετρία ροής (*Basford et al., 2010*).

VII. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

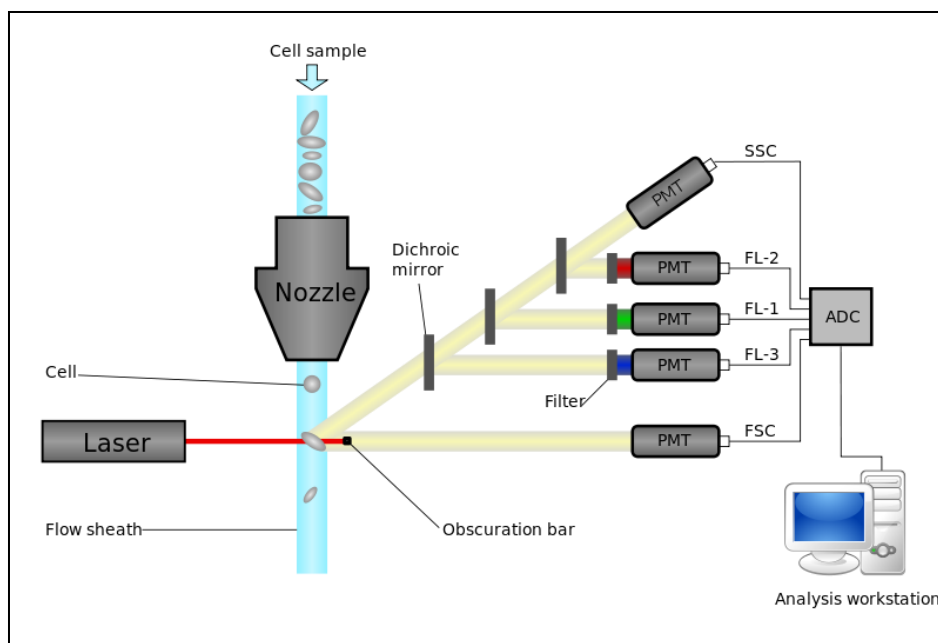
Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λ.π.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει ακτίνα laser. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και

⁶ Οι αποικίες CFU-GM συντίθενται από σφαιρικά ή οβάλ κύτταρα μεγάλου μεγέθους και με γκρίζο κυτόπλασμα. Χαρακτηριστικό αυτών των αποικιών είναι η διασπορά των κυττάρων με κατεύθυνση από το κέντρο προς την περιφέρεια (*Nissen-Druey et al., 2005*).

⁷ Οι αποικίες CFU-GEMM έχουν μορφή «τηγανητού αυγού» και περιέχουν τουλάχιστον δύο ευδιάκριτες κυτταρικές σειρές. Είναι αποικίες μεγάλες που συνήθως περιέχουν περισσότερα από 500 κύτταρα και σε ορισμένες, ένας μικρός αριθμός κοκκιοκυττάρων, μακροφάγων και/ή μεγκαρυοκυττάρων μπορεί να εμφανίζεται γύρω από την περιφέρεια μιας σφαιρικής μάζας κυττάρων της ερυθράς σειράς (*Nissen-Druey et al., 2005*).

σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Οι κυτταρομετρητές ροής λειτουργούν με ακτίνα φωτός από πηγές laser, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Η σκεδαζόμενη από κάθε κύτταρο ακτινοβολία συλλέγεται από κατάλληλους ανιχνευτές και αξιολογείται μέσω λογισμικού, προσφέροντας πληροφορίες για το σχετικό μέγεθος, την κοκκίωση, την πολυπλοκότητα δομής, την παρουσία επιφανειακών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων, το περιεχόμενο γενετικό υλικό (DNA) και την ένταση φθορισμού ταυτόχρονα (*Krishan et al., 2011 και Kalodimou et al., 2011*).

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ένα ένα, υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης, έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου, για τη διέγερσή τους, φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διαταταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουσή της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φώς (FS), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φώς (SS), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται ως μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο εξετάζονται δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο) (Εικόνα 10) (*Wilkerson, 2012 και Krishan et al., 2011*).



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα κυτταρομέτρου (Analysis workstation: ανάλυση αποτελεσμάτων, ADC, Analog to Digital Converter: μετατροπέας αναλογικού σήματος σε ψηφιακό, PMT, Photomultiplier Tube: φωτοπολλαπλασιαστής) (ανατύπωση από «http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry», access in 03/03/2013).

Τα δεδομένα που προκύπτουν αποτυπώνονται σε ιστόγραμμα μιας διάστασης ή σε διαγράμματα στιγμών δύο διαστάσεων ή ακόμα και τριών. Οι περιοχές στα διαγράμματα στιγμών διαχωρίζονται διαδοχικά με βάση την ένταση του φθορισμού δημιουργώντας μια σειρά υποσυνόλων που ονομάζονται «πύλες» (gates). Τα διαγράμματα είναι συχνά σε λογαριθμική κλίμακα. Λόγω της αλληλεπικάλυψης φασμάτων από διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, τα σήματα στους ανιχνευτές αντισταθμίζονται τόσο ηλεκτρονικά όσο και υπολογιστικά. Έτσι, τα δεδομένα αναλύονται με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα (Krishan et al., 2011).

Ένα ευρύ φάσμα φθορίζουσων ουσιών χρησιμοποιείται για σήμανση στην κυτταρομετρία ροής. Οι φθορίζουσες αυτές ουσίες τυπικά συνδέονται σε ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα χαρακτηριστικό-στόχο πάνω ή μέσα στο κύτταρο. Επίσης, μπορούν να συνδεθούν με χημική ουσία που παρουσιάζει συγγένεια με την κυτταρική μεμβράνη ή με άλλη κυτταρική δομή. Κάθε τέτοια ουσία έχει μια χαρακτηριστική κορυφή διέγερσης

και μήκος κύματος εκπομπών ενώ τα φάσματα εκπομπής μεταξύ των ουσιών συχνά επικαλύπτονται (*Krishan et al., 2011*).

A3.3.3. Κρυοκατάψυξη

Η προετοιμασία του δείγματος ΟΠ.Α για κρυοσυντήρηση είναι σχετικά απλή. Αρχικά, απαραίτητη είναι η προσθήκη κρυοπροστατευτικού διαλύματος, το οποίο είναι διαπερατό στη μεμβράνη, σε κατάλληλη αναλογία σύμφωνα με τον όγκο της εκάστοτε μονάδας. Το πιο γνωστό κρυοπροστατευτικό διάλυμα είναι το DMSO (Dimethylsulfoxide, Διμεθυλοσουλφοξείδιο). Βασικό πλεονέκτημα του DMSO είναι ότι διέρχεται εξαιρετικά γρήγορα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Επειδή κάθε είδους αραιώση του DMSO αποτελεί εξώθερμη αντίδραση, χρησιμοποιούνται διάφορα μέσα απορρόφησης της θερμότητας που απελευθερώνεται καθώς αυτό αναμειγνύεται με τη μονάδα ΟΠ.Α. Έτσι, χρησιμοποιούνται απλές «κρυο-συσκευασίες» («cold packs») με βέλτιστα ευτηκτικά σημεία από 0-4°C (*Rubinstein, 2009*).

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ελεγχόμενες διαδικασίες κατάψυξης. Δύο μέθοδοι υπάρχουν για να επιτευχθεί η συγκεκριμένη διαδικασία: η απευθείας κατάψυξη (bulk freezing) εναποθέτωντας τη μονάδα σε κατάλληλα πλαστικά δοχεία μηχανικού κρυοκαταψύκτη (-80°C) και η ψύξη ελεγχόμενου ρυθμού (controlled-rate freezing), με τη διοχεύτηση υγρού αζώτου σε θάλαμο ηλεκτρονικού συστήματος ψύξης όπου η θερμοκρασία ελαττώνεται κατά 1-2 °C/λεπτό ως τους -80 °C και κατά 5 °C/λεπτό από τους -80 °C ως τους -100 °C. Έπειτα, οι μονάδες ΟΠ.Α τοποθετούνται σε συμβατικούς κρυοκαταψύκτες υγρού αζώτου (-196°C) όπου και αποθηκεύονται για περίπου εικοσιπέντε χρόνια (*Harris, 2012 και Rubinstein 2009*).

A3.3.4. Απόψυξη

Για την απόψυξη, η μονάδα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Υπάρχουν δύο τρόποι επεξεργασίας της μονάδας μετά την απόψυξή της. Ένας τρόπος είναι η μέθοδος του Rubinstein. Σύμφωνα με αυτή, η μονάδα αραιώνεται με διάλυμα ανθρώπινης αλβουμίνης και δεξτράνης σε ποσότητα ανάλογη του όγκου της. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Ο δεύτερος τρόπος είναι το

πλύσιμο με το διάλυμα της αλβουμίνης/δεξτράνης ενώ μια άλλη προσέγγιση είναι να μη γίνει καμία περαιτέρω επεξεργασία στη μονάδα («bedside thaw») (Πίνακας 7). Τέλος, και στις τρεις μεθόδους συλλέγεται δείγμα ώστε να γίνει ποιοτικός έλεγχος για να διαπιστωθεί ο αριθμός των κυττάρων και η ζωτικότητα τους μετά την κρυοκατάψυξη (*Kudo et al., 2011 και Regan et al., 2010*).

Τύπος απόψυξης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
«bedside thaw»	Δεν εμπλέκονται εργαστηριακές τεχνικές. Παρόμοιος τρόπος απόψυξης άλλων προϊόντων.	Απαραίτητη η άμεση έγχυση του μοσχεύματος. Υψηλό φορτίο DMSO. Λύση ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων.
Πλύσιμο	Ελεγχόμενη απόψυξη. Εξισορρόπηση ωσμωτικότητας.	Μεγαλύτερος όγκος μοσχεύματος. Ίδιο φορτίο DMSO και ερυθρών αιμοσφαιρίων.
Πλύσιμο και φυγοκέντρωση (μέθοδος Rubinstein)	Απομάκρυνση 80% του DMSO και των λυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων.	Κίνδυνος κυτταρικής απώλειας με τη φυγοκέντρωση. Συσσωματώματα κυττάρων.

Πίνακας 7: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διάφορων τύπων απόψυξης μονάδων ΟΠΑ (ανατύπωση από *Regan et al., 2010*).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

B1.1. Υλικά

- Ασκός συλλογής που περιέχει 12 ml αντιπηκτικό CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose), Tianhe Pharmaceutical.
- Φιαλίδιο Falcon, 50 ml, Greiner.
- Φιαλίδιο γενικής αίματος, 4 ml, με αντιπηκτικό EDTA (Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid), Becton Dickinson.
- Δύο φιαλίδια πηγμάτων, 5 ml, Becton Dickinson.
- Πλαστικά σακουλάκια βιολογικού κινδύνου.
- Θερμομετρητής (Datalogger), Logtag.
- Ισοθερμική τσάντα.

B1.2. Διδικασία συλλογής ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Οι μητέρες που επιθυμούν να κάνουν τη δωρεά ΟΠ.Α προσέρχονται στο χώρο της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α) και αφού ενημερωθούν πλήρως και κριθούν «κατάλληλες δότριες» από το υπεύθυνο προσωπικό, ύστερα από προσωπική συνέντευξη με κάθε μητέρα, προμηθεύονται την ισοθερμική τσάντα (IT). Η IT περιέχει τον ασκό συλλογής, τα φιαλίδια (ένα φιαλίδιο Falcon, ένα φιαλίδιο γενικής αίματος και δύο φιαλίδια πηγμάτων μέσα σε πλαστικά σακουλάκια βιολογικού κινδύνου), το θερμομετρητή (Datalogger) και το έντυπο υλικό στο οποίο περιλαμβάνεται η συναίνεση της μητέρας για τη δωρεά, ερωτηματολόγια που αφορούν το ιατρικό ιστορικό των γονέων, έντυπα τοκετού που συμπληρώνονται από το μαιευτήρα καθώς και εκπαιδευτικό υλικό για τη συλλογή του ΟΠ.Α.

Μετά τον τοκετό, ο μαιευτήρας συλλέγει το ΟΠ.Α, είτε ενδομήτρια είτε εξωμήτρια, στον ειδικό ασκό συλλογής, καθώς και λίγα εκατοστά από τον ομφάλιο λώρο στο φιαλίδιο Falcon. Επιπλέον, στα φιαλίδια της γενικής αίματος και των πηγμάτων συλλέγεται περιφερικό αίμα της μητέρας για την τυποποίηση των HLA-αντιγόνων και τον ορολογικό έλεγχο λοιμωδών νοσημάτων, αντίστοιχα. Αφού ολοκληρωθεί η συλλογή,

η IT φυλάσσεται στους 6-8°C και παραδίδεται στο εργαστήριο της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α εντός 48ώρου.

B2. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΣΚΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ

B2.1. Υλικά και Εξοπλισμός

B2.1.1. Υλικά

- Σύριγγα, 5 ml, Becton Dickinson.
- Φιαλίδιο γενικής αίματος, 4 ml, που περιέχει EDTA, Becton Dickinson.
- Φιαλίδιο snap-cap, 5 ml, Greiner.
- Αιθανόλη 70%.

B2.1.2. Εξοπλισμός

- Θάλαμος νηματικής ροής (Labguard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet), Nuair.

B2.2. Διαδικασία πρώτης λήψης δειγμάτων από τον ασκό συλλογής, πριν τη μείωση όγκου

Αρχικά, γίνεται εκκίνηση της λειτουργίας του θαλάμου νηματικής ροής, όπου πραγματοποιείται η λήψη δειγμάτων κάτω από άσηπτες συνθήκες. Το στόμιο του ασκού συλλογής απολυμαίνεται με αιθανόλη 70% και στη συνέχεια πραγματοποιείται εισαγωγή της σύριγγας. Ακολουθεί λήψη 3 ml αίματος, με ταυτόχρονη ανάδευση του ασκού και μεταφορά του αίματος στα παρακάτω φιαλίδια: 0,5 ml μεταφέρεται σε φιαλίδιο snap-cap (με επικολλημένη ετικέτα «Unprocessed CBU») για τη μέτρηση των κυττάρων στον αιματολογικό αναλυτή και το κυτταρόμετρο ενώ τα υπόλοιπα 2,5 ml σε φιαλίδιο γενικής αίματος (με επικολλημένη ετικέτα «HLA typing») για εξαγωγή DNA και τυποποίηση των HLA-αντιγόνων του δότη. Τέλος, πραγματοποιείται ζύγιση του ασκού συλλογής και καταγράφεται το βάρος του μετά την πρώτη λήψη δειγμάτων.

B3. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΗ ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

B3.1. Υλικά και εξοπλισμός

B3.1.1. Υλικά

- Σύστημα ασκών επεξεργασίας (stem cell processing kit), Pall Medical Corporation.
- Αντιδραστήριο HETASTARCH (Hydroxy Ethyl Starch, HES) 6% w/v, Cooper (Lot no: 1252).
- Σύριγγα, 50 ml, Becton Dickinson.
- Βελόνα, 18 Gauge, Becton Dickinson.
- Φιαλίδιο Falcon, 15 ml, Greiner.
- Φιαλίδιο γενικής αίματος, 4 ml, που περιέχει EDTA, Becton Dickinson.
- Τρία φιαλίδια snap-cap, 5 ml, Greiner.
- Ειδικές λεπίδες για τη λειτουργία της συσκευής πλήρους απομόνωσης, Denco.

B3.1.2. Εξοπλισμός

- Θάλαμος νηματικής ροής (Labguard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet), Nuair.
- Θερμοσυγκολλητής (Rapid Seal Tube Sealer), Genesis.
- Φυγόκεντρος (Centrifuge CellSep), 6/720R, Sanyo.
- Εξαγωγέας πλάσματος (Plasma extractor), 4R4414, Fenwal Laboratories.
- Αυτόματος εξαγωγέας (Auto-Volume Expressor Operator Manual), Thermogenesis.
- Συσκευή πλήρους απομόνωσης (Total Containment Device, TCD-B40), Denco.

B3.2. Περιγραφή διαδικασίας μείωσης όγκου μονάδας ομφαλοπλακουντιακού αίματος και λήψη δειγμάτων από το σύστημα ασκών επεξεργασίας

B3.2.1. Μείωση όγκου μονάδας ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Αρχικά, υπολογίζεται ο όγκος του αντιδραστηρίου HES σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση: (βάρος μετά την πρώτη λήψη δειγμάτων - απόβαρο ασκού) x 20%. Ακολουθεί η έγχυση του αντιδραστηρίου στον ασκό συλλογής, κάτω από άσηπτες συνθήκες και πραγματοποιείται η σύνδεση του ασκού συλλογής με το σύστημα ασκών επεξεργασίας, με τη χρήση του TCD-B40. Στη συνέχεια, ο ασκός φυγοκεντρείται στις 420 rpm, για 7 λεπτά, στους 10°C. Αφού ολοκληρωθεί η πρώτη φυγοκέντρωση, απομακρύνεται το πλάσμα μαζί με τη στιβάδα των εμπύρηνων κυττάρων (buffy coat) προς τον ασκό επεξεργασίας (processing bag), με τη βοήθεια του χειροκίνητου εξαγωγέα πλάσματος ενώ το ίζημα παραμένει στον ασκό συλλογής. Γίνεται αποσύνδεση των δύο ασκών και ο ασκός επεξεργασίας φυγοκεντρείται στις 1200 rpm, για 10 λεπτά, στους 10°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο πλάσμα προς τον ασκό πλάσματος (plasma bag) με τη βοήθεια του αυτόματου εξαγωγέα ενώ το buffy coat παραμένει στον ασκό επεξεργασίας. Ακολουθεί άσηπτος διαχωρισμός των δύο ασκών με τη χρήση του θερμοσυγκολλητή και το buffy coat φυλάσσεται στους 4°C μέχρι να ολοκληρωθεί ο ποιοτικός έλεγχος της μονάδας ΟΠ.Α.

B3.2.2. Διαδικασία δεύτερης λήψης δειγμάτων, μετά τη μείωση όγκου

Από τον ασκό συλλογής, ο οποίος περιέχει το ίζημα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά την πρώτη φυγοκέντρωση, γίνεται λήψη 4 ml αίματος, τα οποία μεταφέρονται στα παρακάτω φιαλίδια: 0,5 ml σε φιαλίδιο snap-cap (με επικολλημένη ετικέτα «CBU, RBC Fraction, Cell Enumeration») για μέτρηση των κυττάρων στον αιματολογικό αναλυτή, 0,5 ml σε φιαλίδιο snap-cap (με επικολλημένη ετικέτα «CBU, RBC Fraction, ABO/Rh Determination») για τον καθορισμό των ομάδων αίματος και 3 ml σε φιαλίδιο γενικής αίματος (με επικολλημένη την ετικέτα «CBU, RBC Fraction, Hemoglobinopathy Test») για τον έλεγχο των αιμοσφαιρινοπαθειών. Αφού ολοκληρωθεί η λήψη των δειγμάτων, ο ασκός συλλογής απορρίπτεται.

Αφού ολοκληρωθεί η δεύτερη φυγοκέντρωση, πραγματοποιείται λήψη 1 ml αίματος από το buffy coat, με ταυτόχρονη ανάδευση του ασκού, το οποίο μεταφέρεται στα παρακάτω φιαλίδια: 0,5 ml σε φιαλίδιο snap-cap (με επικολλημένη την ετικέτα «CBU Volume Reduced, Cell Enumeration») για μέτρηση των κυττάρων στον αιματολογικό αναλυτή και το κυτταρόμετρο και 0,5ml σε φιαλίδιο Falcon 15ml (με επικολλημένη την ετικέτα «CFU Potency Test») για τη δοκιμασία δυναμικότητας των κυττάρων.

B4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ

B4.1. Υλικά και εξοπλισμός

B4.1.1. Υλικά

- Μονοκλωνικά αντισώματα:
 - CD45-FITC, Beckman-Coulter (Lot no: 22).
 - CD34-PE, Beckman-Coulter (Lot no: 21)
 - CD45-PC5, Beckman-Coulter (Lot no: 76).
 - CD71-PE, Beckman-Coulter (Lot no: 71).
- Χρωστικές ουσίες για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων:
 - 7-AAD Viability Dye, Beckman-Coulter (Lot no: 28).
 - SYTO[®] 16 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain, Invitrogen (Lot no: 1147841).
- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysing Solution), 1x, Beckman-Coulter (Lot no: 33).
- Μικροσφαιρίδια μέτρησης απόλυτου αριθμού κυττάρων (FLOW-COUNT Fluorospheres), Beckman-Coulter (Lot no: 7548119).
- Υγρό περιροής κυτταρομετρητή ροής (ISO-Flow Sheath), Beckman-Coulter (Lot no: 000712K).
- Υγρό καθαρισμού κυτταρομετρητή ροής (CLENZ), Beckman-Coulter (Lot no: 002703K).

- Αντιδραστήριο ελέγχου ευθυγράμμισης (FLOW-CHECK Fluorospheres), Beckman-Coulter (Lot no: 9434034).
- Απιονισμένο νερό (ddH₂O).
- Υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη) 25%.
- Ορολογική πιπέττα μιας χρήσεως, με φίλτρο, 10 ml, Greiner.
- Πλαστικά ρύγχη για αυτόματη πιπέττα Gilson 200, 1000 μl, Greiner.
- Φιαλίδια Falcon, 50 ml, Greiner.
- Φιαλίδια πολυπροπυλενίου (RIA), 5 ml, Beckman-Coulter.

B4.1.2. Εξοπλισμός

- Κυτταρομετρητής ροής: Beckman-Coulter Epics XL Flow Cytometer and Analysis Section with CD34 Analysis Template (Procount).
- Αιματολογικός αναλυτής: Automated Hematology Analyzer, model MEK-6318K, NIHON-KODEN.
- Πιπέττες 20, 200 and 1000 μl, Gilson.
- Βοηθητικός προσαρμογέας αναρρόφησης για ορολογικές πιπέτες (Pipetting Aid), Gilson.
- Αναδευτήρας (Vortex), Hei dolph.

B4.1.3. Παρασκευή διαλυμάτων

- Παρασκευή διαλύματος λύσης κυττάρων 10%, από το διάλυμα λύσης κυττάρων 1x και ddH₂O.
- Παρασκευή διαλύματος χρώσης Syto 16, 10x, από το αντιδραστήριο Syto 16 (αρχικής συγκέντρωσης 1 mM σε DMSO) και PBS.
- Παρασκευή διαλύματος χλωρίνης 25% με προσθήκη ddH₂O.

B4.2. «Πλύσεις» κυτταρομέτρου

Πρίν την εκκίνηση του κυτταρομέτρου ελέγχεται η στάθμη των αντιδραστηρίων CLENZ και Sheath για το αν επαρκεί η ποσότητά τους. Στη συνέχεια, ακολουθούν δύο διαδοχικές «πλύσεις» του κυτταρομέτρου, για τις οποίες χρειάζονται χλωρίνη 25% και ddH₂O. Πρίν την πρώτη πλύση επιλέγεται το πρόγραμμα «Cleaning Panel», ως εξής:

1. Επιλογή «Panel».
2. Επιλογή «XL\PRO2».
3. Επιλογή «Cleaning Panel», «OK» και «RUN».

Πρίν τη δεύτερη πλύση επιλέγεται η φωτεινή ένδειξη εξωτερικά του κυτταρομέτρου «AUTO/CLEANSE».

B4.3. Έλεγχος ευθυγράμμισης κυτταρομετρητή

Σε φιαλίδιο προπυλενίου προστίθεται μικρή ποσότητα του αντιδραστηρίου ελέγχου ευθυγράμμισης (FLOW-CHECK Fluorospheres) και επιλέγεται το παρακάτω πρόγραμμα:

1. Επιλογή «Protocol», «Select» και «Select Dir».
2. Επιλογή «Routine» και «OK».
3. Επιλογή «FLOW-CHECK», «OK» και «RUN».

B4.4. Παρασκευή δειγμάτων προς μέτρηση

B4.4.1. Προετοιμασία φιαλιδίων

Για τη μέτρηση κυττάρων μίας μονάδας ΟΠ.Α χρησιμοποιούνται τέσσερα φιαλίδια προπυλενίου, δύο για το πρωτόκολλο μέτρησης των κυττάρων CD34⁺ και δύο για το πρωτόκολλο μέτρησης των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η «σήμανση» των φιαλιδίων γίνεται ως εξής:

- Κωδικός μονάδας ΟΠ.Α, CD34 και ένδειξη «ΠΙΝ» (1^ο φιαλίδιο).
- Κωδικός μονάδας ΟΠ.Α, CD71 και ένδειξη «ΠΙΝ» (2^ο φιαλίδιο).
- Κωδικός μονάδας ΟΠ.Α, CD34 και ένδειξη «ΜΕΤΑ» (3^ο φιαλίδιο).
- Κωδικός μονάδας ΟΠ.Α, CD71 και ένδειξη «ΜΕΤΑ» (4^ο φιαλίδιο).

Σημειώνεται ότι η ένδειξη «PIN» αντιστοιχεί στα δείγματα που συλλέχθηκαν πριν τη μείωση όγκου, με την ετικέτα «Unprocessed CBU», ενώ η ένδειξη «META» σε αυτά που συλλέχθηκαν μετά τη μείωση όγκου, με την ετικέτα «CBU Volume Reduced, Cell Enumeration».

B4.4.2. Παρασκευή δειγμάτων

Στο 1^ο και 3^ο φιαλίδιο προστίθενται 20μl από τα: CD45-FITC, CD34-PE και 7-AAD Viability Dye. Στο 2^ο και 4^ο φιαλίδιο προστίθενται 20μl από τα: CD45-PC5, CD71-PE και SYTO 16. Στη συνέχεια, στο 1^ο και 2^ο φιαλίδιο προστίθενται 100μl αίμα από το δείγμα που λήφθηκε από τον ασκό συλλογής πριν τη μείωση όγκου ενώ στο 3^ο και 4^ο 100μl αίμα από το δείγμα που λήφθηκε από τον ασκό επεξεργασίας μετά τη μείωση όγκου της μονάδας. Ακολουθεί ανάδευση στο Vortex και πρώτη επώαση για 15-20 λεπτά. Μετά την πρώτη επώαση, προστίθενται 2ml lysing solution 10% σε κάθε φιαλίδιο, ανάδευση στο Vortex και ακολουθεί δεύτερη επώαση 10 λεπτών. Ύστερα, προστίθενται 100μl FLOW-COUNT Fluorosperes σε όλα τα φιαλίδια και ακολουθεί ανάδευση στο Vortex. Τέλος, τα φιαλίδια τοποθετούνται στην ειδική βάση του κυτταρομετρητή (carousel) και αυτή στον ειδικό θάλαμο (*πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων της StemKit*).

B4.5. Ρύθμιση του κυτταρομέτρου για μέτρηση των δειγμάτων και ανάλυση των δεδομένων

B4.5.1. Επιλογή προγράμματος

Η επιλογή του προγράμματος γίνεται ως εξής:

1. Επιλογή «Panel».
2. Επιλογή «SELECT DIR» και στη συνέχεια «C:\XL\PRO2».
3. Επιλογή «ROUTINE», «C:\XL\PRO2\ROUTINE» και στη συνέχεια «OK».
4. Επιλογή «STEM 2»⁸ και «OK».

⁸ Το panel STEM 2 *απαρτίζεται* από δύο επιμέρους πρωτόκολλα: το πρωτόκολλο μέτρησης των κυττάρων CD34 και το πρωτόκολλο μέτρησης των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων.

B4.5.2. Καταχώρηση των κωδικών των μονάδων ΟΠ.Α

Η καταχώρηση των κωδικών γίνεται ως εξής:

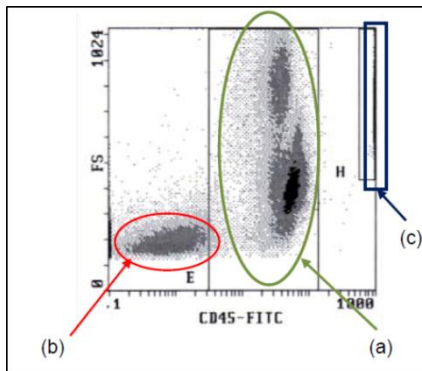
1. Επιλογή «Setup screen».
2. Επιλογή «Worklist».
3. Εισαγωγή κωδικών των μονάδων ΟΠ.Α στην στήλη «Specimen ID».
4. Εισαγωγή του προγράμματος «STEM 2» στη στήλη «Panel».
5. Επιλογή «Setup screen» και «RUN» για να επιστρέψει στην κυρίως οθόνη.

B4.5.3. Εκκίνηση μέτρησης δειγμάτων

Αφού τοποθετηθεί η ειδική βάση στον θάλαμο του κυτταρομετρητή, επιλεγεί το πρόγραμμα «STEM 2» και καταχωρηθούν οι κωδικοί των μονάδων ΟΠ.Α, γίνεται επιλογή της πράσινης ένδειξης «RUN», ώστε να αρχίσουν οι μετρήσεις.

B4.5.4. Ανάλυση δεδομένων

B4.5.4.1. Διαγράμματα για το πρωτόκολλο μέτρησης και βιωσιμότητας των κυττάρων CD34

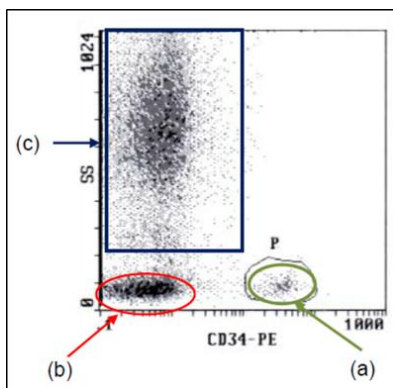


Εικόνα 12: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος CD45-FITC:

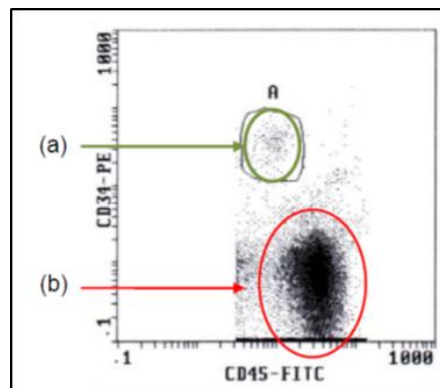
-12(a): Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺ (λευκά αιμοσφαίρια).

-12(b): Πληθυσμός λυθέντων ερυθρών αιμοσφαιρίων.

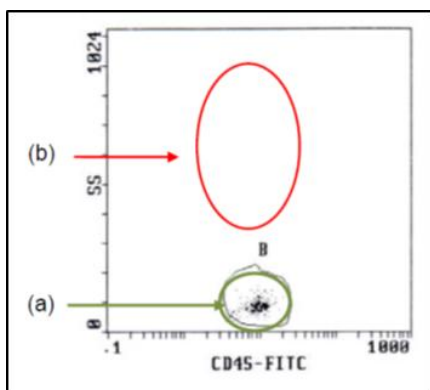
-12(c): Μικροσφαιρίδια (Beads).



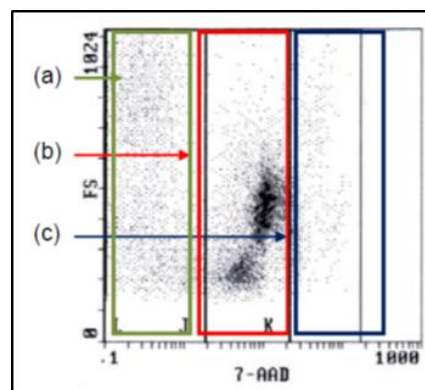
Εικόνα 13: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης⁹ (SS) και σήματος CD34-PE:
 -13(a): Πληθυσμός κυττάρων CD34⁺.
 -13(b): Πληθυσμός λυθέντων ερυθρών αιμοσφαιρίων.
 -13(c): Πληθυσμός εμπύρηνων κυττάρων, CD34⁻.



Εικόνα 14: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει σήματος CD34-PE και σήματος CD45-FITC:
 -14(a): Πληθυσμός διπλά θετικών κυττάρων CD45⁺CD34⁺.
 -14(b): Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺CD34⁻.



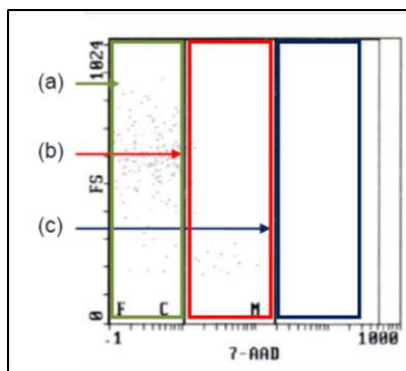
Εικόνα 15: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD45-FITC:
 -15(a): Πληθυσμός των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.
 -15(b): Δεν εμφανίζεται κάποιος κυτταρικός πληθυσμός με το τρέχον πρωτόκολλο.



Εικόνα 16: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος 7-AAD¹⁰:
 -16(a): Πληθυσμός ζωντανών κυττάρων CD45⁺.
 -16(b): Πληθυσμός αποπτωτικών κυττάρων CD45⁺.
 -16(c): Πληθυσμός νεκρωτικών κυττάρων CD45⁺.

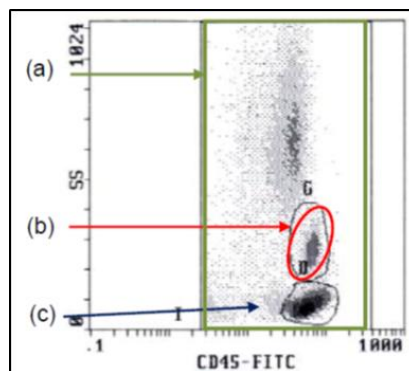
⁹ Η πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FS) χαρακτηρίζει το μέγεθος ενός κυττάρου ενώ η πλάγια (Side Scatter, SS) την κοκκίωση.

¹⁰ Η αυξημένη ένταση του σήματος της χρωστικής 7-AAD αντιστοιχεί σε μειωμένη βιωσιμότητα του κυττάρου.



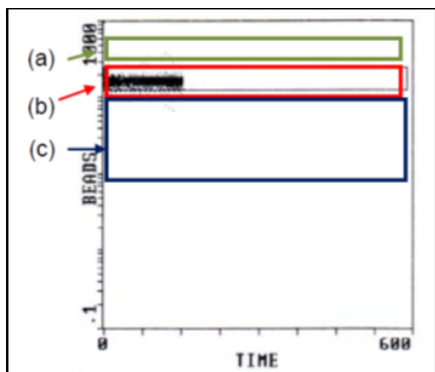
Εικόνα 17: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος 7-AAD:

- 17(a): Πληθυσμός ζωντανών κυττάρων CD34⁺.
- 17(b): Πληθυσμός αποπτωτικών κυττάρων CD34⁺.
- 17(c): Πληθυσμός νεκρωτικών κυττάρων CD34⁺.



Εικόνα 18: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD45-FITC:

- 18(a): Πληθυσμός ζωντανών κυττάρων CD45⁺.
- 18(b): Πληθυσμός μονοκυττάρων.
- 18(c): Πληθυσμός λεμφοκυττάρων¹¹.

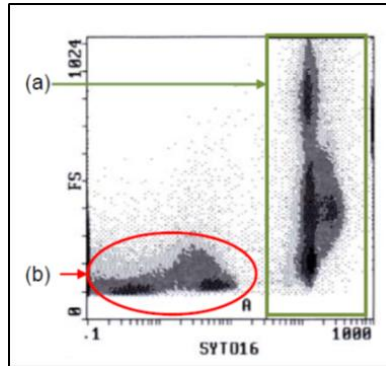


Εικόνα 19: Παράθυρο μικροσφαιριδίων:

- 19(a): Συσσωματώματα μικροσφαιριδίων.
- 19(b): Μικροσφαιρίδια κατά την καταμέτρηση.
- 19(c): «Θραύσματα» μικροσφαιριδίων.

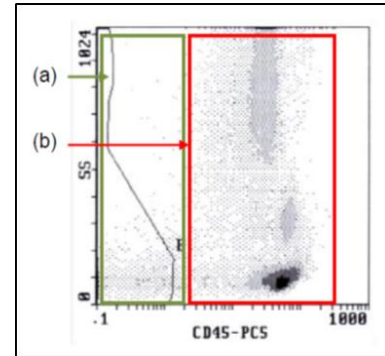
¹¹ Σημειώνεται ότι τα λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν παρόμοια πλάγια σκέδαση με αυτήν των κυττάρων CD34⁺.

B4.5.4.2. Διαγράμματα για το πρωτόκολλο μέτρησης απόλυτου αριθμού και βιωσιμότητας των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων



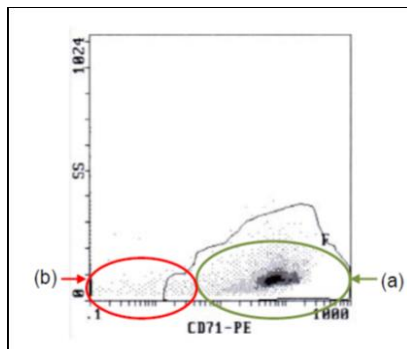
Εικόνα 20: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος SYTO16:

- 20(a): Πληθυσμός εμπύρηνων κυττάρων.
- 20(b): Πληθυσμός «κατεστραμμένων» εμπύρηνων κυττάρων και ερυθρών αιμοσφαιρίων με αρνητικό σήμα ως προς τη χρώση SYTO16.



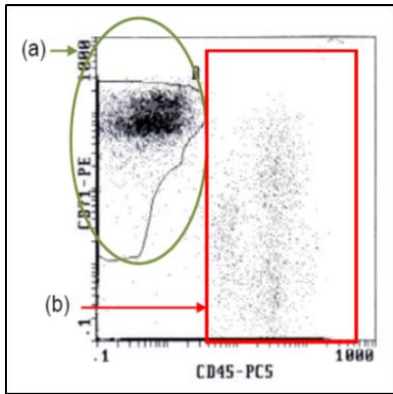
Εικόνα 21: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD45-PC5:

- 21(a): Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺.
- 21(b): Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺.



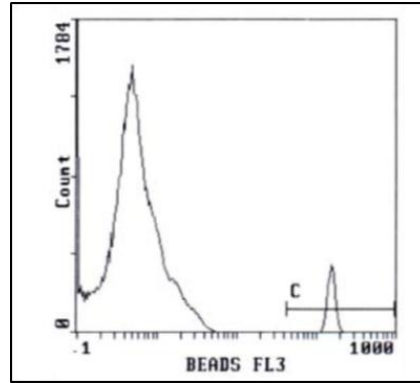
Εικόνα 22: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD71-PE:

- 22(a): Πληθυσμός κυττάρων CD71⁺.
- 22(b): Πληθυσμός κυττάρων CD71⁻.

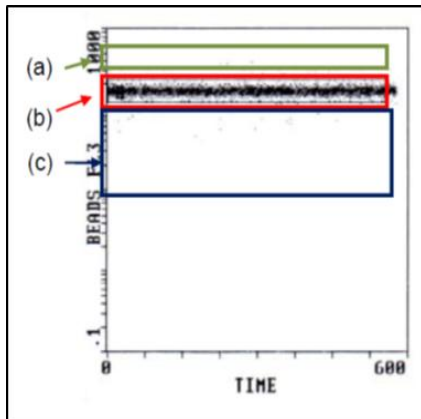


Εικόνα 23: Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει σήματος CD71-PE και σήματος CD45-PC5:

- 23(a): Πληθυσμός κυττάρων CD71⁺CD45⁻ (εμπύρινα ερυθρά αιμοσφαίρια).
- 23(b): Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺ (αιμοποιητικά κύτταρα).



Εικόνα 24: Θετικός φθορισμός μικροσφαιριδίων. Στα προς μέτρηση δείγματα προστίθενται φθορίζοντα σφαίρια που χάρη στη γνωστή τους συγκέντρωση επιτρέπουν τον ακριβή υπολογισμό όλων των κυτταρικών πληθυσμών.



Εικόνα 25: Παράθυρο μικροσφαιριδίων:
 -25(a): Συσσωματώματα μικροσφαιριδίων.
 -25(b): Μικροσφαιρίδια κατά τη μέτρηση.
 -25(c): «Θραύσματα» μικροσφαιριδίων.

B5. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Βασική παράμετρος ώστε να οδηγηθεί μια μονάδα ΟΠ.Α σε μελλοντική μεταμόσχευση είναι ο αριθμός και η ζωτικότητα των CD34⁺ κυττάρων. Παράλληλα, σπουδαίο ρόλο παίζει και ο αριθμός των CD71⁺ κυττάρων, ενός αντιγόνου που κατά κύριο λόγο ανευρίσκεται στην επιφάνεια των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια καταλαμβάνουν μικρό αλλά μη αμελητέο ποσοστό των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων που εμπεριέχονται σε μια μονάδα ΟΠ.Α, ακόμα και μετά τη διαδικασία μείωσης όγκου της μονάδας.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μέτρηση των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε δείγματα που λήφθηκαν πριν και μετά τη διαδικασία μείωσης όγκου της μονάδας ΟΠ.Α ώστε να μελετηθεί το αν η διαδικασία αυτή επηρεάζει το ποσοστό τους στη μονάδα ΟΠ.Α. Επιπλέον, έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με διάφορες παραμέτρους, όπως είναι οι εβδομάδες κύησης, ο τύπος του τοκετού, το φύλο και το βάρος του νεογνού. Όσον αφορά στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, υπήρχε πλήρης συναίνεση των δοτών ύστερα από αναλυτική ενημέρωση.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Συλλέχθηκαν 53 μονάδες ΟΠ.Α, οι οποίες παραδόθηκαν στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α εντός 24 ωρών από τον τοκετό και σε εύρος θερμοκρασίας 4-30°C. Η επεξεργασία των μονάδων πραγματοποιήθηκε εντός 36 ωρών από τον τοκετό ενώ η φύλαξή τους έγινε στους 4 °C. Παράλληλα, καταγράφηκαν στοιχεία όπως οι εβδομάδες κύησης, ο τύπος του τοκετού, το φύλο και το βάρος του νεογνού.

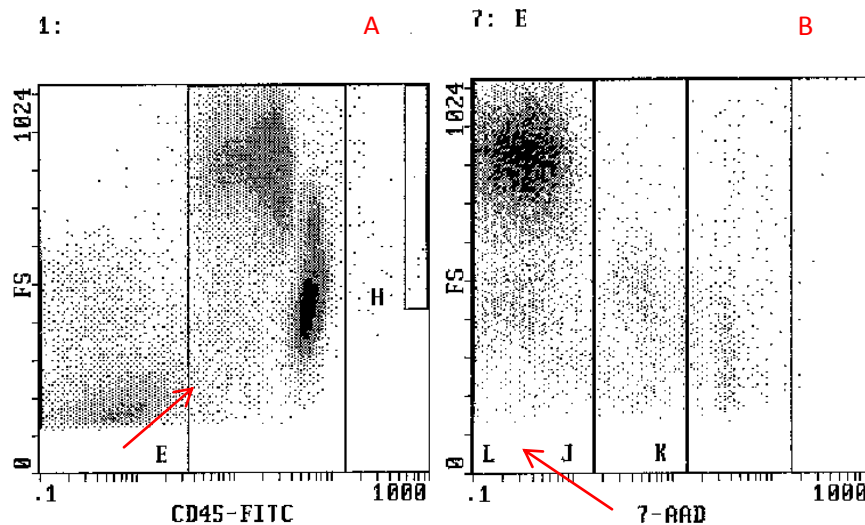
Όσον αφορά στις εβδομάδες κύησης οι μονάδες που συλλέχθηκαν προήλθαν από εγκυμοσύνη 37-41 εβδομάδων. Αυτές των 37 εβδομάδων αποτελούσαν το 11,3% των εξεταζόμενων μονάδων ΟΠ.Α, των 38 εβδομάδων το 30,2%, των 39 εβδομάδων το 28,3%, των 40 εβδομάδων το 24,5% και των 41 εβδομάδων το 5,7%. Όσον αφορά στον τύπο του τοκετού το 60,4% ήταν φυσιολογικός ενώ το 39,6% με καισαρική τομή. Επιπλέον, σχετικά με το φύλο του νεογνού, το 49,1% ήταν θηλυκού φύλου ενώ το υπόλοιπο 50,9% αρσενικού. Τέλος, νεογνά βάρους 2500-3499 gr αποτελούσαν το 60,4% και 3500-4499 gr το 39,6% (ο μέσος όρος του βάρους των νεογνών ήταν 3419,2±360,2 gr) (Πίνακας 8).

Εβδομάδες κύησης	Αριθμός μονάδων ΟΠ.Α	Φύλο νεογνού	Αριθμός μονάδων ΟΠ.Α
37	6	Θήλυ	26
38	16	Άρρεν	27
39	15		
40	13		
41	3		
Τύπος τοκετού	Αριθμός μονάδων ΟΠ.Α	Βάρος νεογνού	Αριθμός μονάδων ΟΠ.Α
Φυσιολογικός	32	2500-3499 gr	27
Καισαρική	21	3500-4499 gr	26

Πίνακας 8: Ο αριθμός των εξεταζόμενων μονάδων ΟΠ.Α σε συνάρτηση με τις εβδομάδες κύησης, το είδος του τοκετού, το φύλο και το βάρος του νεογνού.

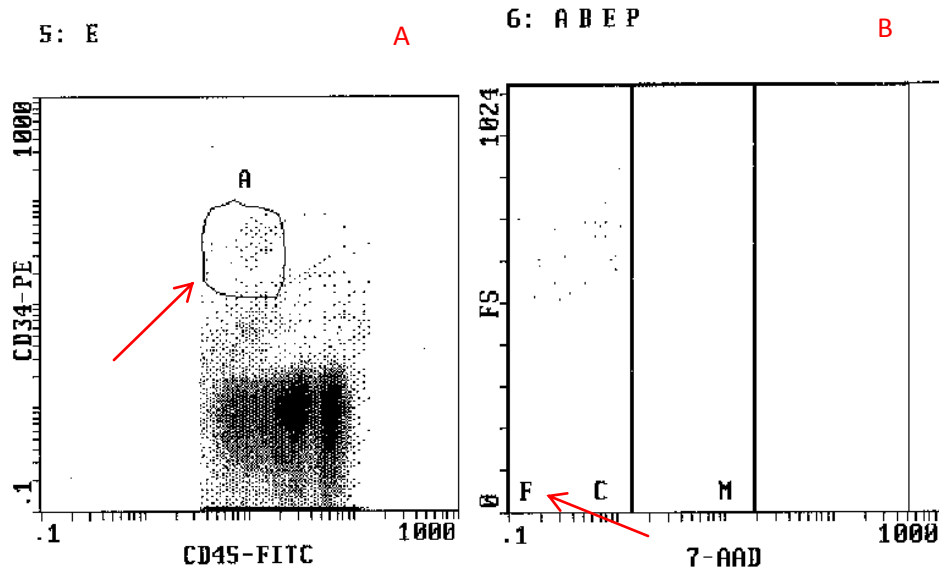
Γ2. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Αρχικά καταγράφηκε ο όγκος του κάθε ασκού συλλογής με μέσο όρο $114,3 \pm 14,9$ gr. Στη συνέχεια, εκτελέστηκε η διαδικασία της μείωσης όγκου σε χρόνο 40 λεπτών για την κάθε μονάδα ΟΠ.Α και σε θερμοκρασία δωματίου. Καταγράφηκε ο όγκος του ασκού επεξεργασίας με μέσο όρο $21,4 \pm 0,7$ gr. Τέλος, έγινε μέτρηση των κυττάρων και της ζωτικότητάς (viability) τους με κυτταρομετρία ροής ενώ υπολογίστηκε και η ανάκτησή τους (recovery).



Εικόνα 26: Ενδεικτικά ιστογράμματα κυτταρομετρητή ροής για τον πληθυσμό των λευκών αιμοσφαιρίων (δείγμα μονάδας ΟΠ.Α με κωδικό 1198):

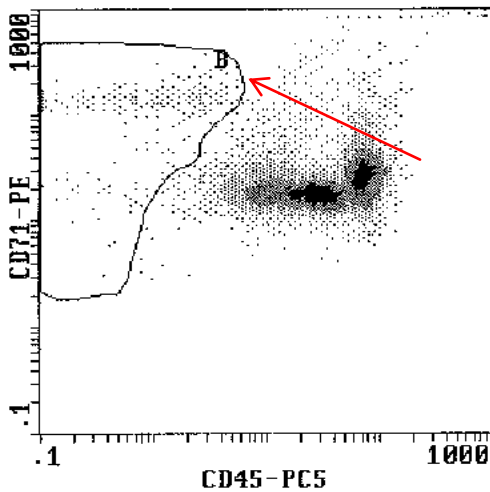
- 26(A): Η ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών γίνεται βάσει της πρόσθιας σκέδασης (FS) και του σήματος CD45-FITC. Τα λευκά αιμοσφαίρια δίνουν ισχυρό σήμα CD45-FITC ενώ το μέγεθός τους ποικίλει (παράθυρο «E»).
- 26(B): Η ανάλυση των λευκών αιμοσφαιρίων, που προέρχονται από το παράθυρο «E», γίνεται βάσει της πρόσθιας σκέδασης (FS) και του σήματος 7-AAD. Αφού η χρωστική 7-AAD εξετάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, τα «ζωντανά» λευκά αιμοσφαίρια παρουσιάζουν ασθενές σήμα για τη χρωστική αυτή (παράθυρο «L»).



Εικόνα 27: Ενδεικτικά ιστογράμματα κυτταρομετρητή ροής για τον πληθυσμό των κυττάρων CD34 (δείγμα μονάδας ΟΠ.Α με κωδικό 1198):

- 27(A): Η ανάλυση των λευκών αιμοσφαιρίων (παράθυρο «Ε») γίνεται με βάση τα σήματα των CD34-PE και CD45-FITC. Τα κύτταρα CD34 θα εμφανίσουν ισχυρό σήμα και για τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα (παράθυρο «Α»).
- 27(B): Η ανάλυση των κυττάρων CD34 γίνεται βάσει της πρόσθιας σκέδασης και του σήματος 7-AAD. Τα ζωντανά κύτταρα CD34 θα εμφανίσουν ασθενές σήμα για τη χρωστική αυτή 7-AAD (παράθυρο «F»).

4: A



Εικόνα 28: Ενδεικτικό ιστογράμμο κυτταρομετρητή ροής για τον πληθυσμό των κυττάρων CD71 (δείγμα μονάδας ΟΠ.Α με κωδικό 1198). Η ανάλυση των κυττάρων γίνεται βάσει του σήματος των CD71-PE και CD45-PC5. Τα κύτταρα που εμφανίζουν ισχυρό σήμα CD71-PE και ασθενές σήμα CD45-PC5 είναι τα εμπύρρινα ερυθρά αιμοσφαίρια (παράθυρο «B»).

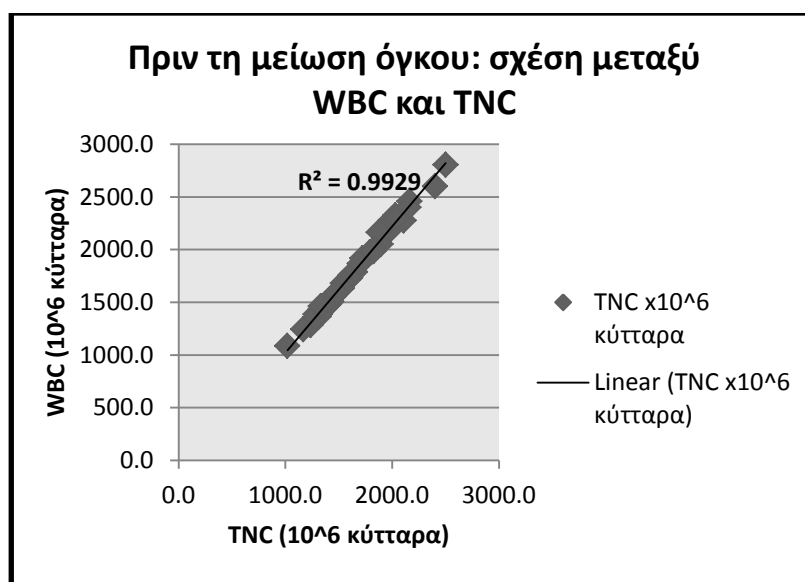
ΚΩΔΙΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α	ΕΔΟΜΑΔΕΣ ΚΥΗΣΗΣ	ΦΥΛΟ	ΤΥΠΟΣ ΤΟΚΕΤΟΥ	ΒΑΡΟΣ ΝΕΟΓΝΟΥ (gr)	ΟΓΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α (ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ)	WBC (10 ⁶ cells)	TNC (10 ⁶ cells)	NRBC (10 ⁶ cells)	CD34 (10 ⁶ cells)	ΟΓΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α (ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ)	WBC (10 ⁶ cells)	TNC (10 ⁶ cells)	NRBC (10 ⁶ cells)	CD34 (10 ⁶ cells)
41957	37	A	Φ	3150	115.5	1299.5	1375.1	75.6	3.3	21.5	956.0	1002.2	46.2	2.2
42041	38	Θ	Φ	2920	99.0	1603.0	1733.0	130.0	7.1	21.1	1286.5	1410.6	124.1	7.0
42029	37	A	Κ	4000	105.4	1607.9	1731.9	124.0	6.8	21.9	1132.7	1202.9	70.2	5.2
42116	38	Θ	Φ	3450	108.0	1366.0	1437.1	71.1	2.2	21.7	1010.7	1059.0	48.3	2.0
42018	39	A	Φ	3500	122.5	2020.9	2301.4	280.5	9.3	21.3	1506.3	1655.4	149.1	9.1
42639	40	A	Φ	3800	131.5	2162.5	2457.5	295.0	11.0	21.7	1637.3	1791.1	153.8	9.8
42512	38	A	Κ	2830	121.8	1236.4	1283.0	46.6	2.2	21.3	1000.0	1047.0	47.0	2.0
42699	39	Θ	Φ	3150	102.0	1590.0	1715.5	125.5	2.0	21.2	1160.0	1246.5	86.5	1.9
43066	38	Θ	Κ	3750	107.6	2017.0	2275.3	258.3	10.1	20.1	1052.0	1101.1	49.1	2.3
42925	39	Θ	Κ	4020	96.2	1990.0	2194.7	204.7	9.6	22.5	1436.9	1571.9	135.0	9.1
43076	38	A	Κ	3450	125.1	1406.8	1478.9	72.1	2.4	21.3	966.6	988.4	21.8	1.5
43026	38	Θ	Κ	2970	98.1	1432.0	1505.9	73.9	2.5	21.6	847.5	858.5	11.0	0.8
43293	37	Θ	Κ	3500	98.2	1316.0	1366.3	50.3	1.8	21.0	760.9	767.4	6.5	0.4
42845	40	A	Φ	3900	148.5	2502.0	2803.7	301.7	12.5	21.2	1422.7	1562.3	139.6	9.2
43541	41	Θ	Φ	3250	112.4	2405.0	2602.0	197.0	8.8	21.4	1724.0	1887.4	163.4	8.7
42702	40	A	Φ	3670	145.0	1654.0	1788.0	134.0	7.0	21.3	1209.0	1285.9	76.9	4.7
72	41	Θ	Φ	3850	122.9	1333.0	1434.8	101.8	5.1	21.7	876.8	893.2	16.4	1.1
79	39	Θ	Φ	3150	122.9	1444.0	1556.2	112.2	5.2	21.0	977.9	1028.0	50.1	3.5
82	37	Θ	Κ	3220	136.7	1455.6	1558.1	102.5	4.2	19.2	847.8	860.2	12.4	1.2
103	40	A	Φ	3250	101.5	2111.0	2276.0	165.0	7.5	20.1	1568.0	1710.1	142.1	7.4
111	38	Θ	Φ	3300	115.0	1369.0	1453.0	84.0	3.6	21.7	1110.0	1178.3	68.3	3.1
197	39	A	Κ	3500	114.8	1383.7	1478.3	94.6	3.9	21.7	1051.8	1111.0	59.2	3.6
195	39	A	Φ	3210	158.1	2031.7	2325.8	294.1	10.8	20.8	1074.3	1155.1	80.8	5.9
234	38	A	Κ	3530	109.8	1306.8	1390.8	84.0	3.6	21.9	915.2	933.8	18.6	1.7
279	39	A	Φ	3050	119.5	1894.7	2052.5	157.8	6.8	21.7	965.8	989.4	23.6	1.8
394	40	A	Κ	3760	112.3	1724.6	1917.4	192.8	8.5	21.8	1101.0	1210.5	109.5	6.9
385	40	A	Φ	3340	109.8	1877.0	2164.0	287.0	11.2	21.4	966.3	1027.9	61.6	5.3
409	38	A	Φ	3050	110.8	1295.9	1379.2	83.3	3.1	22.3	986.0	1038.5	52.5	3.2
462	39	Θ	Κ	3660	99.2	1998.0	2288.1	290.1	10.7	21.4	1492.0	1634.0	142.0	9.5
503	39	Θ	Κ	3120	112.6	1357.0	1435.3	78.3	3.9	21.3	1013.0	1070.1	57.1	3.8
534	38	Θ	Φ	3550	122.7	1399.0	1472.0	73.0	2.8	21.0	996.7	1042.7	46.0	2.4

ΚΩΔΙΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α	ΕΔΟΜΑΔΕΣ ΚΥΗΣΗΣ	ΦΥΛΟ	ΤΥΠΟΣ ΤΟΚΕΤΟΥ	ΒΑΡΟΣ ΝΕΟΓΝΟΥ (gr)	ΟΓΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α (ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ)	WBC (10 ⁶ cells)	TNC (10 ⁶ cells)	NRBC (10 ⁶ cells)	CD34 (10 ⁶ cells)	ΟΓΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α (ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ)	WBC (10 ⁶ cells)	TNC (10 ⁶ cells)	NRBC (10 ⁶ cells)	CD34 (10 ⁶ cells)
541	40	A	Φ	3590	106.3	1792.0	1972.2	180.2	9.1	21.4	1324.0	1448.2	124.2	8.9
304	41	Θ	K	3180	112.9	1287.0	1385.6	98.6	4.2	20.9	964.0	1015.4	51.4	4.0
321	40	A	Φ	3500	91.9	1020.1	1086.2	66.1	2.0	21.8	935.2	960.8	25.6	1.9
818	38	Θ	Φ	3150	97.2	1613.5	1756.4	142.9	6.0	21.0	1203.3	1299.6	96.3	4.9
834	38	A	Φ	3700	108.1	1351.3	1451.0	99.7	4.9	21.2	1038.8	1113.2	74.4	4.6
841	39	A	Φ	4000	124.0	1835.2	2008.8	173.6	9.5	21.9	1132.2	1211.9	79.6	5.0
907	37	A	Φ	2890	105.6	1541.8	1681.8	140.0	5.8	21.0	1121.4	1222.3	100.9	5.7
908	40	Θ	K	3240	100.9	1412.6	1508.7	96.1	3.8	21.3	1035.2	1105.6	70.4	3.5
919	39	Θ	Φ	3430	102.6	2154.6	2400.2	245.6	10.9	21.5	559.0	566.5	7.5	0.6
920	39	A	K	3580	124.4	1828.7	1983.4	154.7	6.5	19.0	798.0	808.1	10.1	1.8
940	38	A	K	3100	101.2	1629.3	1768.1	138.8	5.4	22.2	1174.4	1272.2	97.8	5.3
951	40	Θ	Φ	2500	108.1	1632.3	1773.7	141.4	5.5	22.3	1210.9	1314.4	103.5	5.0
994	39	Θ	Φ	3600	124.1	1551.3	1677.2	125.9	4.5	21.7	963.5	1004.0	40.5	2.0
1042	40	A	Φ	3800	143.7	1451.4	1552.8	101.4	4.0	22.3	1097.2	1160.1	62.9	3.9
1043	38	A	K	4120	135.4	1326.9	1389.9	63.0	2.1	21.8	885.1	898.3	13.2	1.7
1045	38	Θ	K	3170	94.9	1698.7	1867.5	168.8	7.1	20.9	1400.3	1531.1	130.8	7.0
1046	37	Θ	Φ	2760	99.1	1268.5	1331.8	63.3	2.3	22.0	1049.4	1086.1	36.7	2.0
1094	40	Θ	K	4100	109.4	1334.7	1461.9	127.2	4.6	21.2	1102.4	1190.6	88.2	4.5
1129	38	Θ	Φ	3500	97.3	1167.6	1243.5	75.9	2.2	21.8	745.6	753.7	8.1	0.5
1191	40	Θ	Φ	3600	128.5	2043.2	2300.1	256.9	9.8	21.9	1171.7	1271.1	99.4	7.0
1194	39	A	Φ	3515	123.5	1531.4	1633.8	102.4	4.7	21.9	987.7	1021.0	33.3	2.5
1198	39	Θ	K	3345	112.4	1483.7	1593.7	110.0	5.0	20.3	970.3	1007.7	37.4	2.7
M.O				3419.2	114.3	1614.1	1755.8	141.8	5.8	21.4	1092.9	1161.9	69.1	4.2
SD				360.2	14.9	329.8	396.7	73.5	3.0	0.7	231.5	274.1	44.6	2.7
CV						0.2	0.2	0.5	0.5		0.2	0.2	0.6	0.6

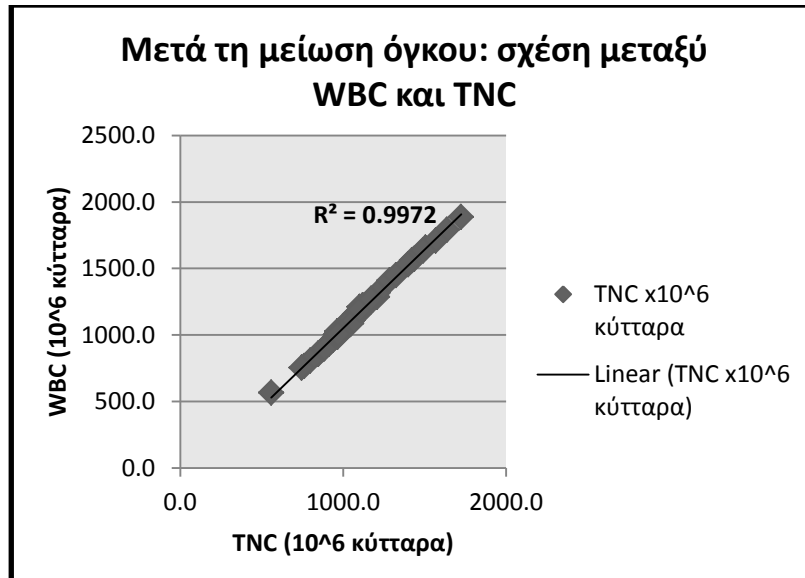
Πίνακας 9: Στοιχεία των μονάδων ΟΠ.Α και αποτελέσματα των μετρήσεων (Α: Άρρεν, Θ: Θήλυ, Κ: Καισαρική, Φ: Φυσιολογικός, Μ.Ο: Μέσος Όρος, SD: Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation), CV: Συντελεστής Μεταβλητότητας (Coefficient of Variation), WBC: Λευκά Αιμοσφαίρια, TNC: Συνολικός Αριθμός Εμπύρηνων Κυττάρων, NRBC: εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια, CD34: κύτταρα CD34).

Στον πίνακα 9 παρατίθενται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής. Ο απόλυτος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, των κυττάρων CD34, και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων υπολογίστηκε ως το γινόμενο της τιμής του παραθύρου «L» (των λευκών αιμοσφαιρίων) επί τον όγκο της μονάδας ΟΠ.Α, το γινόμενο της τιμής του παραθύρου «F» (των κυττάρων CD34) επί τον όγκο της μονάδας ΟΠ.Α και το γινόμενο της τιμής του παραθύρου «B» (των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων) επί τον όγκο της μονάδας ΟΠ.Α αντίστοιχα. Ο αριθμός των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων υπολογίστηκε ως το άθροισμα του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων.

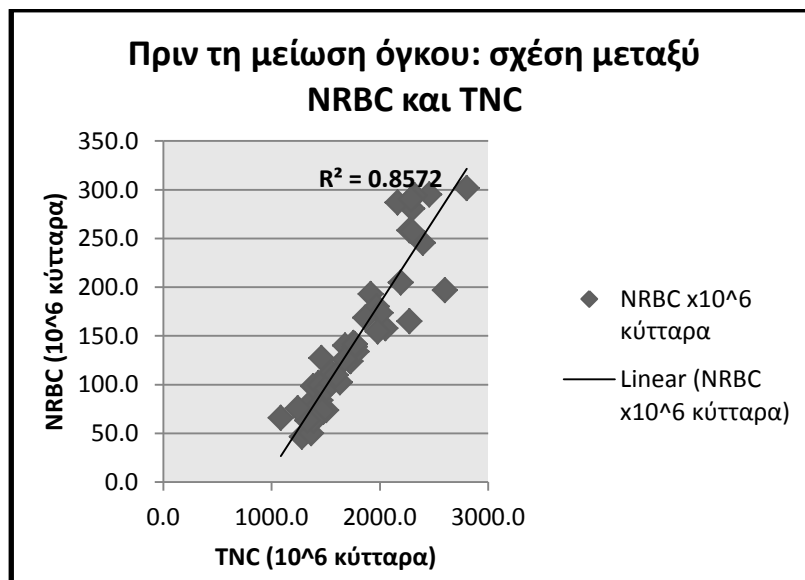
Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακας 9) αποκαλύπτεται μια γραμμική σχέση των λευκών αιμοσφαιρίων με το συνολικό αριθμό των εμπύρηνων κυττάρων ($R^2 > 0,99$) (Διαγράμματα 1 και 2), των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων με το συνολικό αριθμό των εμπύρηνων κυττάρων ($R^2 > 0,85$) (διαγράμματα 3 και 4) και των κυττάρων CD34 με τα εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια ($R^2 > 0,9$) (Διαγράμματα 5 και 6).



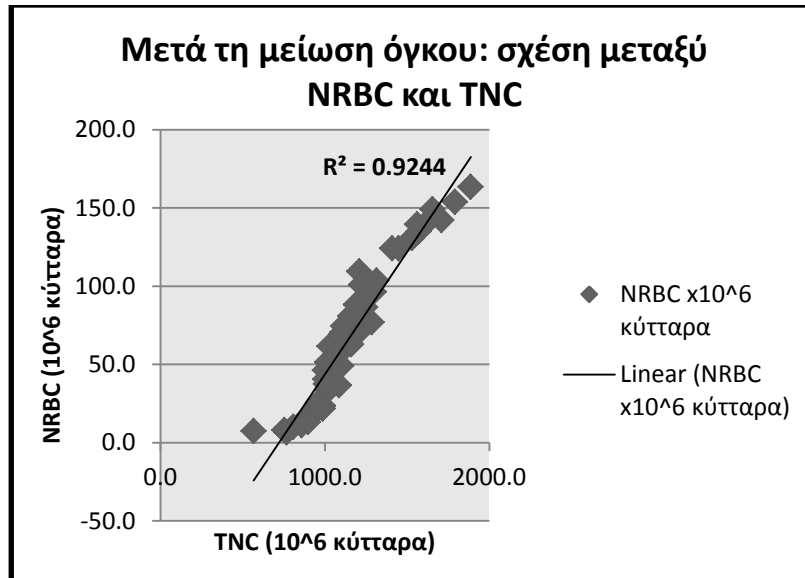
Διάγραμμα 1: Γραμμική σχέση μεταξύ του πληθυσμού των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων (TNC) σε μονάδες ΟΠ.Α πριν τη μείωση όγκου.



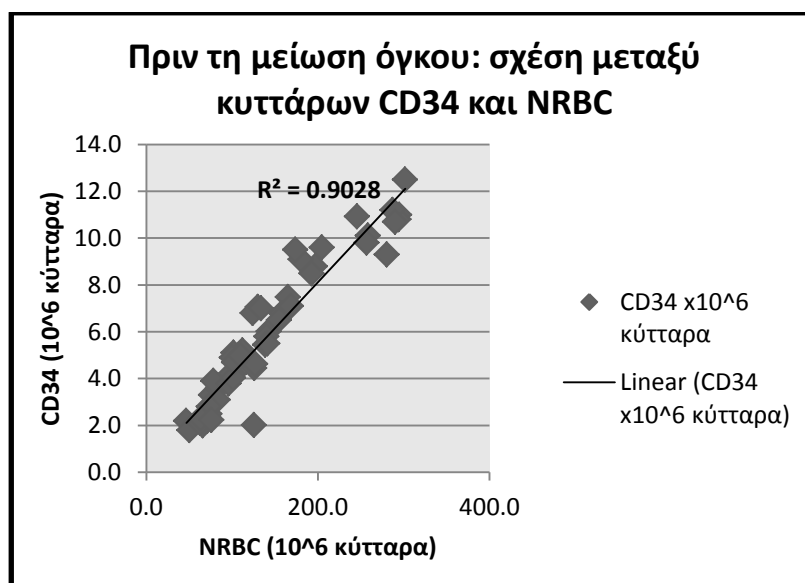
Διάγραμμα 2: Γραμμική σχέση μεταξύ του πληθυσμού των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων (TNC) σε μονάδες ΟΠ.Α μετά τη μείωση όγκου.



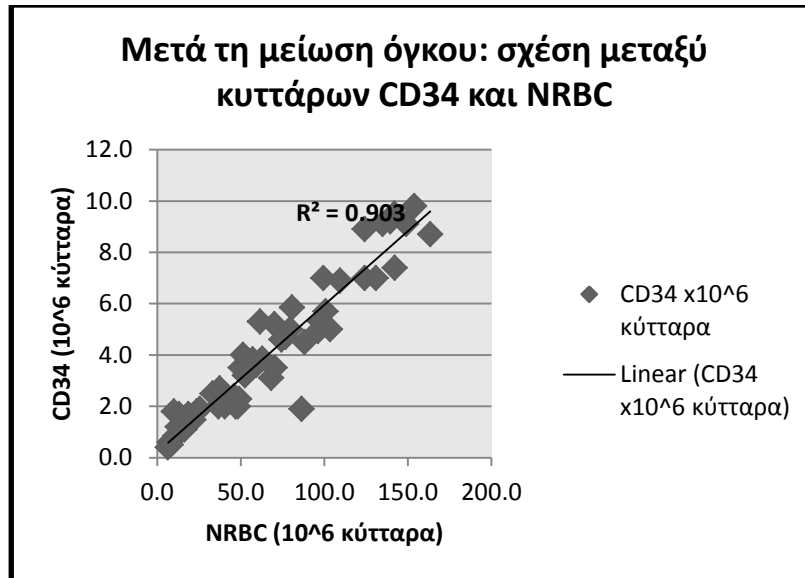
Διάγραμμα 3: Γραμμική σχέση μεταξύ του πληθυσμού των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC) και του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων (TNC) σε μονάδες ΟΠ.Α πριν τη μείωση όγκου.



Διάγραμμα 4: Γραμμική σχέση μεταξύ του πληθυσμού των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC) και του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων (TNC) σε μονάδες ΟΠ.Α μετά τη μείωση όγκου.



Διάγραμμα 5: Γραμμική σχέση μεταξύ του πληθυσμού των κυττάρων CD34 και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC) σε μονάδες ΟΠ.Α πριν τη μείωση όγκου.

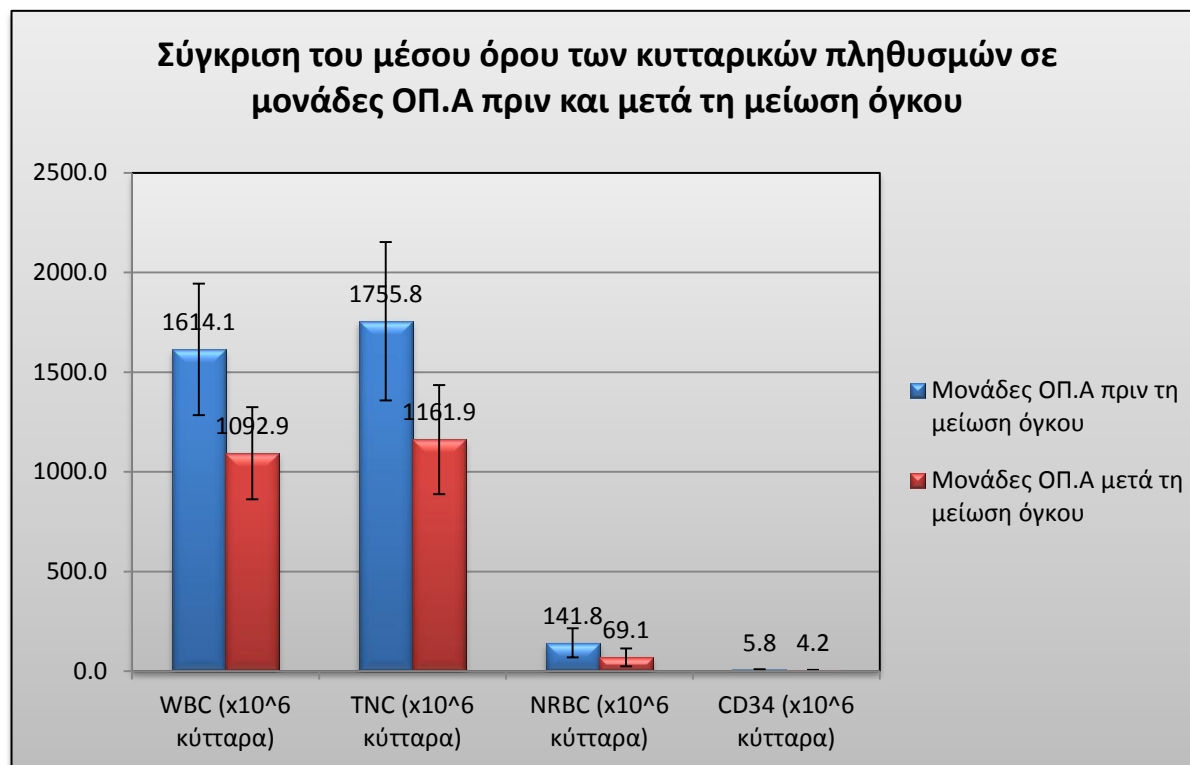


Διάγραμμα 6: Γραμμική σχέση μεταξύ του πληθυσμού των κυττάρων CD34 και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC) σε μονάδες ΟΠ.Α μετά τη μείωση όγκου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι ο αριθμός των εξεταζόμενων κυτταρικών πληθυσμών ήταν μικρότερος στα δείγματα που λήφθηκαν από τον ασκό επεξεργασίας (που περιείχε το ΟΠ.Α), μετά τη μείωση όγκου (διάγραμμα 7). Ο μέσος όρος του απόλυτου αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων στα δείγματα πριν τη μείωση όγκου ήταν 1614.1 ± 329.8 ($\times 10^6$ κύτταρα) σε αντίθεση με αυτόν των δειγμάτων μετά τη μείωση όγκου που ήταν 1092.9 ± 231.5 ($\times 10^6$ κύτταρα). Ο μέσος όρος του απόλυτου αριθμού του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων πριν τη μείωση όγκου ήταν 1755.8 ± 396.7 ($\times 10^6$ κύτταρα) ενώ μετά 1161.9 ± 274.1 ($\times 10^6$ κύτταρα). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια με το μέσο όρο του απόλυτου αριθμού τους, πριν τη μείωση όγκου, να είναι 141.8 ± 73.5 ($\times 10^6$ κύτταρα) ενώ μετά 69.1 ± 44.6 ($\times 10^6$ κύτταρα). Ο μέσος όρος του απόλυτου αριθμού των κυττάρων CD34 πριν τη μείωση όγκου ήταν 5.8 ± 3.0 ($\times 10^6$ κύτταρα) ενώ μετά 4.2 ± 2.7 ($\times 10^6$ κύτταρα).

Επιπλέον, ο μέσος όρος της ζωτικότητας των λευκών αιμοσφαιρίων, των κυττάρων CD34 και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στα δείγματα πριν τη μείωση όγκου ήταν $91.8\% \pm 7.3$, $93.8\% \pm 7.6$ και $92.0\% \pm 5.1$ αντίστοιχα. Στα δείγματα που λήφθηκαν από επεξεργασμένες μονάδες ήταν $92.1\% \pm 5.0$, $95.6\% \pm 2.6$ και $93,9\% \pm 3.1$ αντίστοιχα. Όσον αφορά στην ανάκτηση των ίδιων κυτταρικών πληθυσμών τα ποσοστά ήταν $70.1\% \pm 8.1$ για τα

λευκά αιμοσφαίρια, $80,8\% \pm 11,8$ για τα κύτταρα CD34 και $76,3\% \pm 11,2$ για τα εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια.



Διάγραμμα 7: Ο μέσος όρος του αριθμού των εξεταζόμενων κυτταρικών πληθυσμών σε δείγματα που προήλθαν από μονάδες ΟΠ.Α πριν και μετά τη διαδικασία μείωσης όγκου.

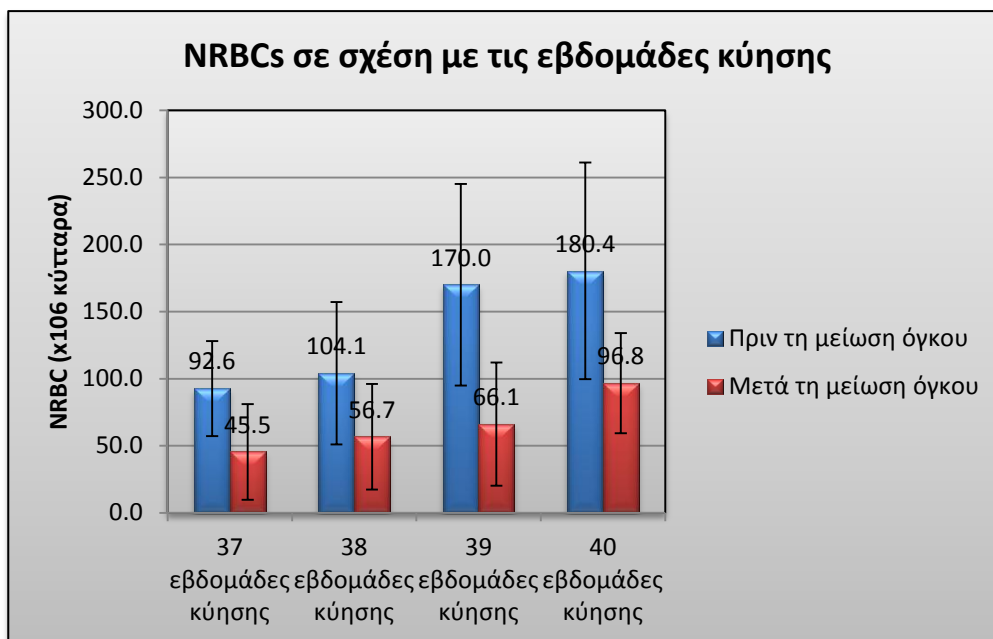
Τέλος, ακολούθησε συσχέτιση με τις προαναφερθείσες παραμέτρους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) και διαγράμματα.

	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	TNC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)
ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ				
ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΚΥΗΣΗΣ	M.O	SD	M.O	SD
37	1414,9	141,1	1507,5	174,1
38	1451,2	212,7	1555,3	263,4
39	1739,7	271,8	341,3	1909,7
40	1747,5	398,1	1927,9	470,0

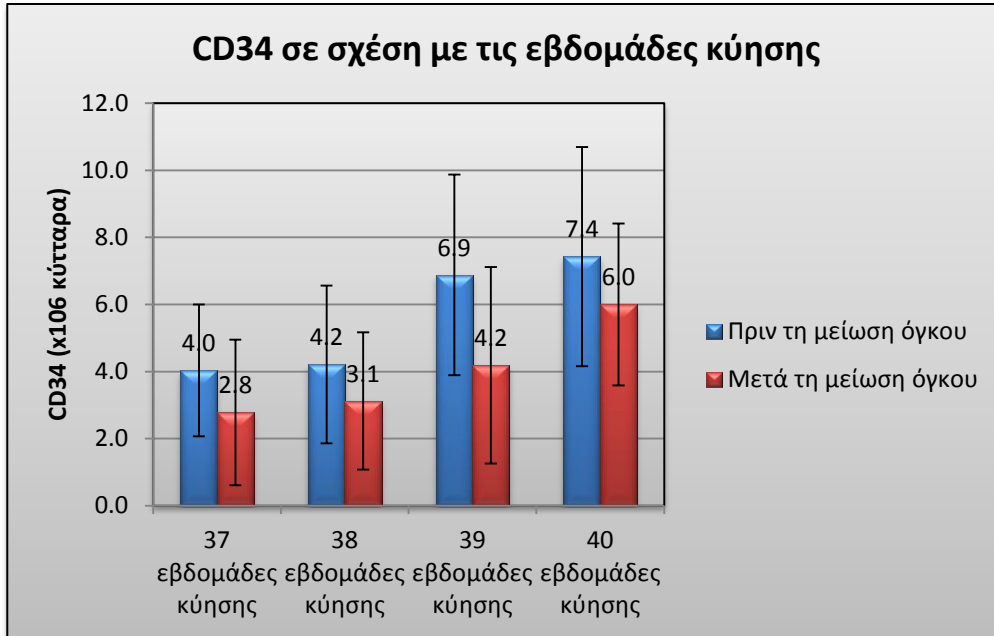
	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	TNC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)				
ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ								
ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΚΥΗΣΗΣ	M.O	SD	M.O	SD				
37	978,0	151,1	1023,5	183,5				
38	1038,7	166,6	1095,4	204,7				
39	1072,6	253,7	1138,7	298,0				
40	1213,9	218,3	1310,7	252,7				
	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	TNC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)				
ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ								
ΦΥΛΟ ΝΕΟΓΝΟΥ	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD
ΑΡΡΕΝ	1647,0	347,1	1797,4	420,4	150,3	80,3	6,3	3,2
ΘΗΛΥ	1582,3	315,5	1715,8	376,1	133,5	66,8	5,4	2,9
ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ								
ΦΥΛΟ ΝΕΟΓΝΟΥ	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD
ΑΡΡΕΝ	1113,6	215,2	1185,7	256,8	72,1	44,1	4,6	2,6
ΘΗΛΥ	1072,9	248,7	1139,1	292,8	66,2	45,8	3,7	2,7
	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	TNC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)				
ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ								
ΤΥΠΟΣ ΤΟΚΕΤΟΥ	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ	1666,0	367,3	1818,6	436,6	152,6	77,1	6,3	3,2
ΚΑΙΣΑΡΙΚΗ	1534,9	250,7	1660,1	312,7	125,2	66,0	5,2	2,7
ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ								
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ	1124,2	248,5	1199,9	291,0	75,7	44,6	4,5	2,8
ΚΑΙΣΑΡΙΚΗ	1045,1	199,3	1104,1	241,4	59,0	43,9	3,7	2,6
	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	TNC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)				
ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ								
ΒΑΡΟΣ ΝΕΟΓΝΟΥ	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD	M.O	SD
2500-3499 gr	1588,8	305,6	1718,4	361,2	129,7	64,5	5,3	2,8
3500-4499 gr	1640,3	357,4	1794,7	434,2	154,3	81,1	6,4	3,3
ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ								
2500-3499 gr	1079,6	227,5	1147,3	266,4	67,8	41,4	3,8	2,2
3500-4499 gr	1106,6	239,4	1177,1	286,4	70,4	48,6	4,6	3,1

Πίνακας 10: Ο μέσος όρος των κυτταρικών πληθυσμών σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου σε συνάρτηση με την κάθε εξεταζόμενη παράμετρο (WBC: Λευκά Αιμοσφαίρια, TNC: Συνολικός Αριθμός Εμπύρηνων Κυττάρων, NRBC: Εμπύρηνια Ερυθρά Αιμοσφαίρια, M.O: Μέσος Όρος, SD: Τυπική Απόκλιση).

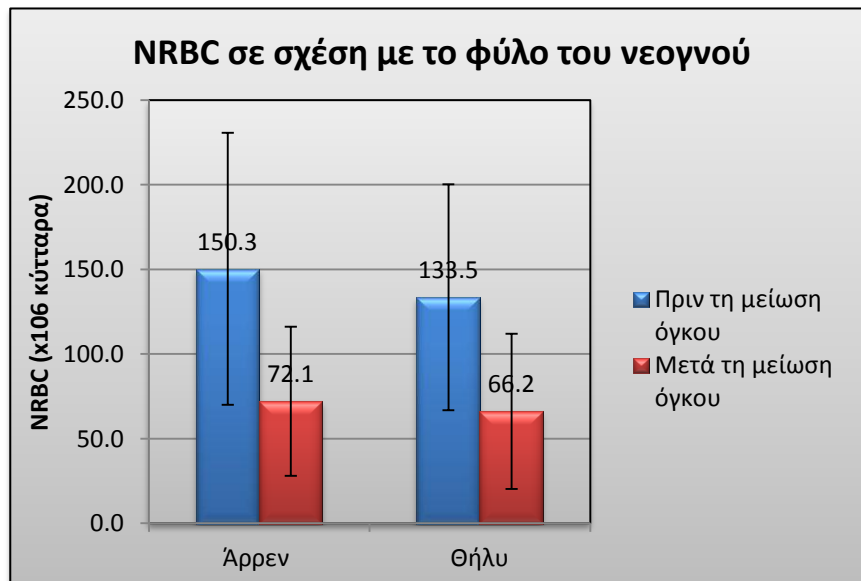
Σημειώνεται ότι τα δείγματα που προήλθαν από 41 εβδομάδες κύησης δεν λήφθηκαν υπόψη στη στατιστική μελέτη, καθώς ο αριθμός τους ήταν μικρός και θεωρήθηκε ότι δεν αποτελεί αξιόπιστη παράμετρο.



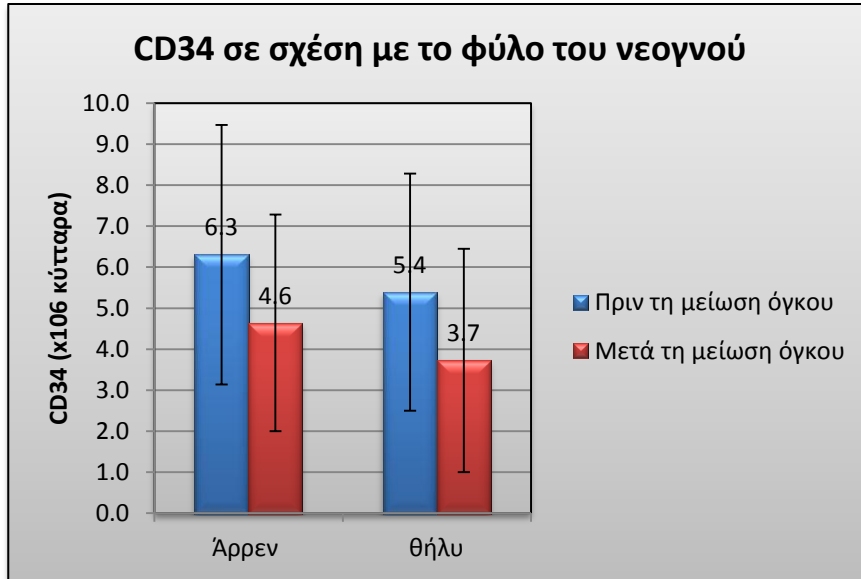
Διάγραμμα 8: Ο πληθυσμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC), σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με τις εβδομάδες κύησης της μητέρας-δότριας.



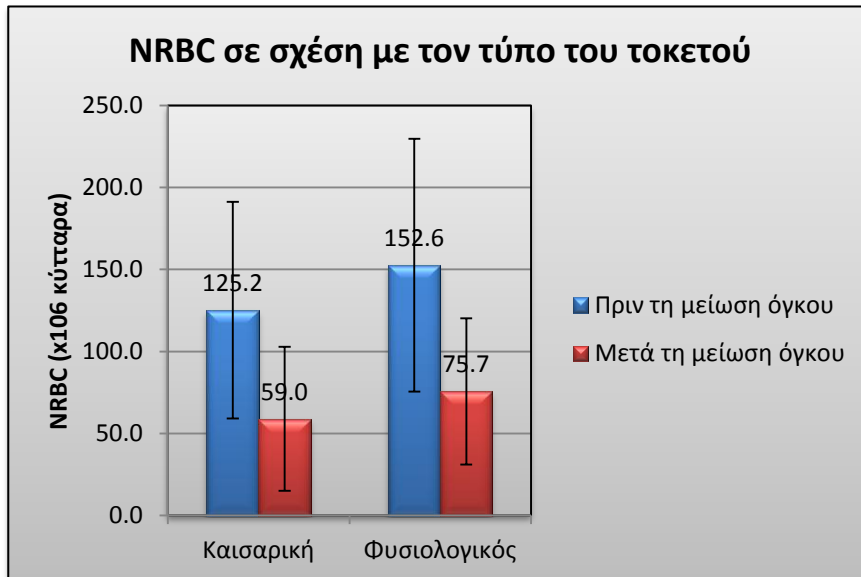
Διάγραμμα 9: Ο πληθυσμός των κυττάρων CD34, σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με τις εβδομάδες κύησης της μητέρας-δότριας.



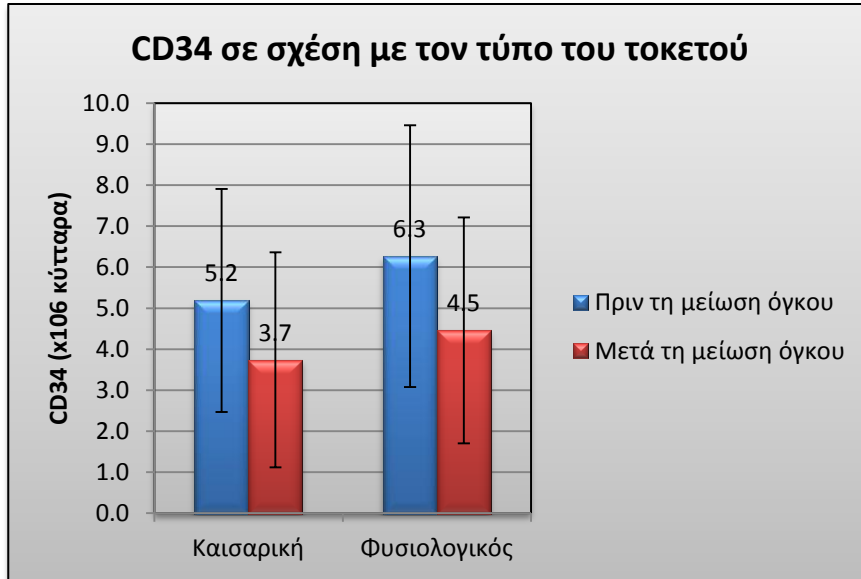
Διάγραμμα 10: Ο πληθυσμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC), σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με το φύλο του νεογνού.



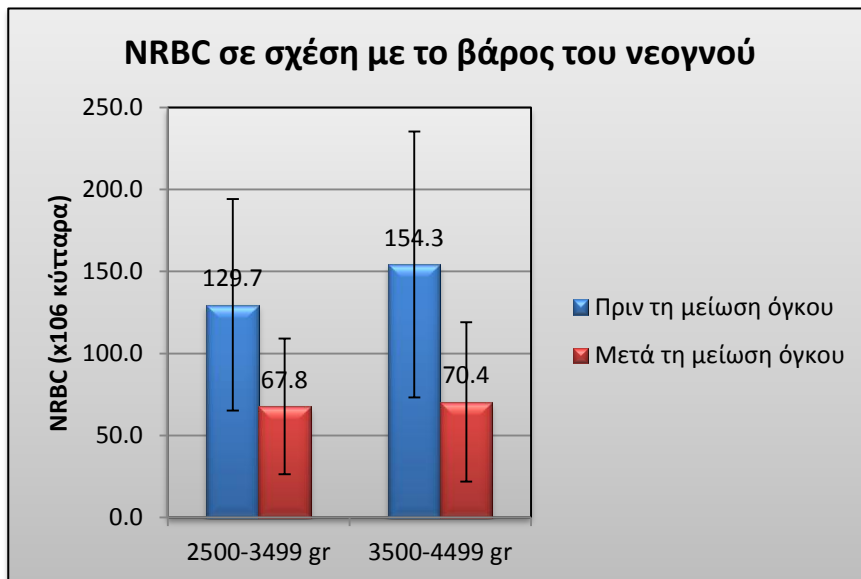
Διάγραμμα 11: Ο πληθυσμός των κυττάρων CD34, σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με το φύλο του νεογνού.



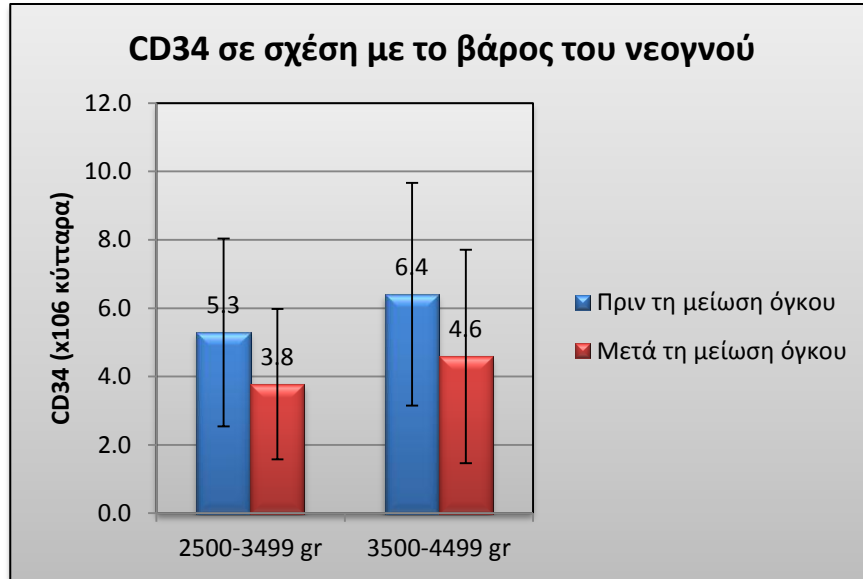
Διάγραμμα 12: Ο πληθυσμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC), σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με τον τύπο του τοκετού.



Διάγραμμα 13: Ο πληθυσμός των κυττάρων CD34, σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με τον τύπο του τοκετού.



Διάγραμμα 14: Ο πληθυσμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (NRBC), σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με το βάρος του νεογνού.



Διάγραμμα 15: Ο πληθυσμός των κυττάρων CD34, σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου, σε συνάρτηση με το βάρος του νεογνού.

Γ3. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συλλέχθηκαν 53 μονάδες ΟΠ.Α, οι οποίες παραδόθηκαν στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α εντός 24 ωρών από τον τοκετό και σε εύρος θερμοκρασίας 4-30°C. Η επεξεργασία των μονάδων πραγματοποιήθηκε εντός 36 ωρών από τον τοκετό ενώ η φύλαξή τους έγινε στους 4 °C. Παράλληλα, καταγράφηκαν στοιχεία όπως οι εβδομάδες κύησης, ο τύπος του τοκετού, το φύλο και το βάρος του νεογνού.

Όσον αφορά στις εβδομάδες κύησης οι μονάδες που συλλέχθηκαν προήλθαν από εγκυμοσύνη 37-41 εβδομάδων. Αυτές των 37 εβδομάδων αποτελούσαν το 11,3% των εξεταζόμενων μονάδων ΟΠ.Α, των 38 εβδομάδων το 30,2%, των 39 εβδομάδων το 28,3%, των 40 εβδομάδων το 24,5% και των 41 εβδομάδων το 5,7%. Όσον αφορά στον τύπο του τοκετού το 60,4% ήταν φυσιολογικός ενώ το 39,6% με καισαρική τομή. Επιπλέον, σχετικά με το φύλο του νεογνού, το 49,1% ήταν θηληκού φύλου ενώ το υπόλοιπο 50,9% αρσενικού. Τέλος, νεογνά βάρους 2500-3499 gr αποτελούσαν το 60,4% και 3500-4499 gr το 39,6% (ο μέσος όρος του βάρους των νεογνών ήταν 3419,2±360,2 gr) (Πίνακας 6).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν τα εξής:

1. Ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στις περιπτώσεις που οι μητέρες-δότεριες βρίσκονταν σε πιο προχωρημένη εβδομάδα (Πίνακας 11).

Εβδομάδες κύησης	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)	
37	1414,9 \pm 141,1	92,6 \pm 35,4	4,0 \pm 2,0	Πριν τη μείωση όγκου
38	1451,2 \pm 212,7	104,1 \pm 53,2	4,2 \pm 2,4	
39	1739,7 \pm 271,8	170,0 \pm 75,1	6,9 \pm 3,0	
40	1747,5 \pm 398,1	180,4 \pm 80,8	7,4 \pm 3,3	
37	978,0 \pm 151,1	45,5 \pm 35,7	2,8 \pm 2,2	Μετά τη μείωση όγκου
38	1038,7 \pm 166,6	56,7 \pm 39,3	3,1 \pm 2,0	
39	1072,6 \pm 253,7	66,1 \pm 45,9	4,2 \pm 2,9	
40	1213,9 \pm 218,3	96,8 \pm 37,3	6,0 \pm 2,4	

Πίνακας 11: Ο αριθμός των κυτταρικών πληθυσμών σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου σε συνάρτηση με τις εβδομάδες κύησης (WBC: λευκά αιμοσφαίρια, NRBC: εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια).

2. Ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στις περιπτώσεις του φυσιολογικού τοκετού (Πίνακας 12).

Τύπος τοκετού	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)	
Φυσιολογικός	1666,0 \pm 367,3	152,6 \pm 77,1	6,3 \pm 3,2	Πριν τη μείωση όγκου
Καισαρική	1534,9 \pm 250,7	125,2 \pm 66,0	5,2 \pm 2,7	
Φυσιολογικός	1124,2 \pm 248,5	75,7 \pm 44,6	4,5 \pm 2,8	Μετά τη μείωση όγκου
Καισαρική	1045,1 \pm 199,3	59,0 \pm 43,9	3,7 \pm 2,6	

Πίνακας 12: Ο αριθμός των κυτταρικών πληθυσμών σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου σε συνάρτηση με τον τύπο του τοκετού (WBC: λευκά αιμοσφαίρια, NRBC: εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια).

3. Ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στα αρσενικά νεογνά (Πίνακας 13).

Φύλο νεογνού	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)	
Άρρεν	1647,0 \pm 347,1	150,3 \pm 80,3	6,3 \pm 3,2	Πριν τη μείωση όγκου
Θήλυ	1582,3 \pm 315,5	133,5 \pm 66,8	5,4 \pm 2,9	
Άρρεν	1113,6 \pm 215,2	72,1 \pm 44,1	4,6 \pm 2,6	Μετά τη μείωση όγκου
Θήλυ	1072,9 \pm 248,7	66,2 \pm 45,8	3,7 \pm 2,7	

Πίνακας 13: Ο αριθμός των κυτταρικών πληθυσμών σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου σε συνάρτηση με το φύλο του νεογνού (WBC: λευκά αιμοσφαίρια, NRBC: εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια).

4. Ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος σε νεογνά μεγαλύτερου βάρους (Πίνακας 14).

Βάρος νεογνού	WBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	NRBC ($\times 10^6$ κύτταρα)	CD34 ($\times 10^6$ κύτταρα)	
2500-3499 gr	1588,8 \pm 305,6	129,7 \pm 64,5	5,3 \pm 2,8	Πριν τη μείωση όγκου
3500-4499 gr	1640,3 \pm 357,4	154,3 \pm 81,1	6,4 \pm 3,3	
2500-3499 gr	1079,6 \pm 227,5	67,8 \pm 41,4	3,8 \pm 2,2	Μετά τη μείωση όγκου
3500-4499 gr	1106,6 \pm 239,4	70,4 \pm 48,6	4,6 \pm 3,1	

Πίνακας 14: Ο αριθμός των κυτταρικών πληθυσμών σε δείγματα πριν και μετά τη μείωση όγκου σε συνάρτηση με το βάρος του νεογνού (WBC: λευκά αιμοσφαίρια, NRBC: εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια).

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνεται ότι το φύλο του νεογνού σχετίζεται με τον αριθμό των εμπύρηνων κυττάρων στις μονάδες ΟΠ.Α. Αυτές που προήλθαν από νεογνό αρσενικού φύλου είχαν περισσότερα κύτταρα του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού [$150,3 \pm 80,3$ ($\times 10^6$ κύτταρα) πριν τη μείωση όγκου της μονάδας ΟΠ.Α και $72,1 \pm 44,1$ ($\times 10^6$ κύτταρα) μετά τη μείωση όγκου], σε αντίθεση με αυτές που προήλθαν από νεογνό θηλυκού φύλου [$133,5 \pm 66,8$ ($\times 10^6$ κύτταρα), πριν τη μείωση όγκου της μονάδας ΟΠ.Α, και $66,2 \pm 45,8$ ($\times 10^6$ κύτταρα) μετά τη μείωση όγκου] (Διάγραμμα 10). Το ίδιο παρατηρήθηκε να ισχύει και για τον πληθυσμό των κυττάρων CD34 (Διάγραμμα 11).

Παράλληλα, ο τύπος του τοκετού φάνηκε να έχει σχέση με τον αριθμό τόσο των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (Διάγραμμα 12) όσο και των κυττάρων CD34 (Διάγραμμα 13). Στις μονάδες ΟΠ.Α που συλλέχθηκαν ύστερα από φυσιολογικό τοκετό, ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων ήταν μεγαλύτερος [$152,6 \pm 77,1$ ($\times 10^6$ κύτταρα), πριν τη μείωση όγκου της μονάδας ΟΠ.Α, και $75,7 \pm 44,6$ ($\times 10^6$ κύτταρα) μετά τη μείωση όγκου] σε σχέση με αυτές που συλλέχθηκαν μετά από καισαρική τομή [$125,2 \pm 66,0$ ($\times 10^6$ κύτταρα), πριν τη μείωση όγκου της μονάδας ΟΠ.Α, και $59,0 \pm 43,9$ ($\times 10^6$ κύτταρα) μετά τη μείωση όγκου].

Θετική σχέση παρατηρήθηκε και μεταξύ του πληθυσμού των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων και του βάρους του νεογνού, καθώς και με την εβδομάδα κύησης στην οποία βρισκόταν η μητέρα-δότρια. Στα νεογνά βάρους 2500-3499 gr ο αριθμός των κυττάρων πριν τη μείωση όγκου της μονάδας ΟΠ.Α ήταν $127,2 \pm 68,5$ ($\times 10^6$ κύτταρα) και μετά τη μείωση όγκου $64,9 \pm 44,0$ ($\times 10^6$ κύτταρα). Αντίθετα, στα νεογνά βάρους 3500-4499 gr ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στις μονάδες ΟΠ.Α, πριν τη μείωση όγκου, ήταν $164,0 \pm 76,9$ ($\times 10^6$ κύτταρα) και μετά τη μείωση όγκου $75,4 \pm 45,9$ ($\times 10^6$ κύτταρα) (Διάγραμμα 14).

Ο αριθμός του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού φάνηκε να είναι μεγαλύτερος στις περιπτώσεις που οι μητέρες-δότριες βρίσκονταν σε πιο προχωρημένη εβδομάδα κύησης [στις 37 εβδομάδες κύησης ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων ήταν $92,6 \pm 35,4$ ($\times 10^6$ κύτταρα), πριν τη μείωση όγκου των μονάδων ΟΠ.Α, και $45,5 \pm 35,7$ ($\times 10^6$ κύτταρα) μετά τη μείωση όγκου, στις 38 εβδομάδες κύησης ήταν $104,1 \pm 53,2$ ($\times 10^6$ κύτταρα), πριν τη

μείωση όγκου, και $56,7 \pm 39,3$ ($\times 10^6$ κύτταρα) μετά τη μείωση όγκου, στις 39 εβδομάδες κύησης ήταν $170,0 \pm 75,1$ ($\times 10^6$ κύτταρα), πριν τη μείωση όγκου, και $66,1 \pm 45,9$ ($\times 10^6$ κύτταρα) μετά τη μείωση όγκου και στις 40 εβδομάδες κύησης ήταν $180,4 \pm 80,8$ ($\times 10^6$ κύτταρα), πριν τη μείωση όγκου, και $96,8 \pm 37,3$ μετά τη μείωση όγκου] (Διάγραμμα 8).

Τα παραπάνω συμπεράσματα συμφωνούν με την έρευνα που διεξήχθη το 2009 στην Κορέα, από την ερευνητική ομάδα του Lee και των συνεργατών του. Κατέληξαν στο ότι το φύλο του νεογνού και ο τύπος του τοκετού σχετίζονται με τον αριθμό των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στις μονάδες ΟΠ.Α. Ο αριθμός των μονάδων ΟΠ.Α που μελετήθηκαν ήταν 2.129 και ο μέσος όρος των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων που εμπεριέχονταν σε αυτές ήταν $3,3 \pm 3,9$ (/100WBCs). Στις μονάδες ΟΠ.Α που είχαν συλλεχθεί από νεογνό αρσενικού φύλου ο μέσος όρος των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων ήταν $3,5 \pm 4,3$ (/100WBCs), σε αντίθεση με αυτές που είχαν συλλεχθεί από νεογνό θηλυκού φύλου που ήταν $3,1 \pm 3,4$ (/100WBCs). Οι μονάδες που συλλέχθηκαν μετά από φυσιολογικό τοκετό, είχαν αριθμό εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων $3,6 \pm 4,0$ (/100WBCs) ενώ, μετά από καισαρική τομή, $2,5 \pm 3,3$ (/100WBCs), (Lee et al., 2009).

Επιπλέον, ο Yang και η επιστημονική του ομάδα, σε μελέτη που έγινε το 2011 στον Καναδά, κατέληξαν στο ότι το φύλο του νεογνού επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων CD34 στις μονάδες ΟΠ.Α. Οι μονάδες ΟΠ.Α που μελετήθηκαν μετά τη μείωση όγκου τους ήταν 4.930. Ο μέσος όρος των κυττάρων CD34 στις μονάδες ΟΠ.Α που προήλθαν από αρσενικό νεογνό ήταν $3,9 \pm 3,5$ ($\times 10^6$ κύτταρα) ενώ αυτές που προήλθαν από νεογνό θηλυκού φύλου $3,6 \pm 3,4$ ($\times 10^6$ κύτταρα). Όσον αφορά στον τύπο του τοκετού, ο αριθμός των κυττάρων CD34 ήταν $3,8 \pm 3,5$ ($\times 10^6$ κύτταρα) στις μονάδες ΟΠ.Α που συλλέχθηκαν μετά από φυσιολογικό τοκετό και $3,6 \pm 3,4$ ($\times 10^6$ κύτταρα) σε αυτές που συλλέχθηκαν μετά από καισαρική τομή (Yang et al., 2011). Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν στη μελέτη της Aroviita και της ομάδας της. Μελετήθηκαν 1.999 μονάδες ΟΠ.Α. Ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων CD34 στα αρσενικά νεογνά ήταν $39,0 \pm 27$ (κύτταρα/ μ l) ενώ στα θηλυκά νεογνά $36,3 \pm 25$ (κύτταρα/ μ l) (Aroviita et al., 2005).

Σε έρευνα του Sheffer-Mimouni και της ομάδας του παρατηρήθηκε ότι η εξεταζόμενη ομάδα γυναικών με δείκτη μάζας σώματος¹² (BMI) 25,1-30 kg/m² (πριν την εγκυμοσύνη) γέννησαν νεογνά μεγαλύτερου βάρους σε σχέση με αυτά των γυναικών με BMI 20-25 kg/m². Στην πρώτη ομάδα, ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στις μονάδες ΟΠ.Α ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν της δεύτερης (*Sheffer-Mimouni et al., 2007*).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έρχονται σε αντίθεση με αυτά του Kil και της ομάδας του, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2011, όσον αφορά στη συσχέτιση του αριθμού των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων με τις εβδομάδες κύησης. Κατά τον Kil, μονάδες ΟΠ.Α που συλλέχθηκαν μετά από κύηση 28-31 εβδομάδων είχαν μεγαλύτερο απόλυτο αριθμό εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων [$1,98 \pm 1,55 (x 10^9/L)$] σε σχέση με αυτές που προήλθαν μετά από κύηση περισσότερων από 32 εβδομάδων [$1,86 \pm 1,55 (x 10^9/L)$] (*Kil et al., 2011*). Αντίθετα, σε έρευνα του Al-bayati και της ομάδας του το 2012, η ομάδα 1 των μονάδων ΟΠ.Α (n=50), που συλλέχθηκαν μετά από μέσο όρο εβδομάδων κύησης 38,3±2,7 είχαν μέσο αριθμό εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων 1867 (x10⁶/L) ενώ στην ομάδα 2 (n=50) με μέσο όρο εβδομάδων κύησης 38±1,9, ο μέσος αριθμός των κυττάρων ήταν 460 (x10⁶/L), (*Al-bayati et al., 2012*).

Επιπλέον, όσον αφορά στα κύτταρα CD34, η Chandra και οι συνεργάτες της παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός τους σχετίζεται άμεσα με τις εβδομάδες κύησης και το βάρος του νεογνού. Εξετάστηκαν 500 δείγματα μονάδων ΟΠ.Α. Σε αυτά που προήλθαν από νεογνό βάρους μικρότερου από 2500 gr (n=104), το ποσοστό των κυττάρων CD34 ήταν 0,21%±0,24 και ο αριθμός των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων 3,12±1,32 (κύτταρα/μl), ενώ σε νεογνά βάρους μεγαλύτερου (≥2500 gr) (n=396), το ποσοστό των κυττάρων CD34 ήταν 1,84%±1,12 και ο αριθμός των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων 7,77±3,31 (κύτταρα/μl). Θετική σχέση παρατηρήθηκε και με τις εβδομάδες κύησης, καθώς, δείγματα ΟΠ.Α κύησης μεγαλύτερης των 36 εβδομάδων (n=396) περιείχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση εμπύρηνων κυττάρων σε σχέση με τα δείγματα ΟΠ.Α κύησης μικρότερης των 35 εβδομάδων (n=149) (*Chandra et al., 2012*).

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των κυττάρων, σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς μετά τη διαδικασία μείωσης

¹² Ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) υπολογίζεται ως το γινόμενο του σωματικού βάρους με το τετράγωνο του ύψους ενός ατόμου. Τιμές του BMI από 18,5-25 kg/m² δείχνουν κανονικό σωματικό βάρος ενώ από 25,1-30 kg/m² υπέρβαρο άτομο (*Sheffer-Mimouni et al., 2007*).

όγκου των μονάδων ΟΠ.Α. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς, κατά τη διαδικασία μείωσης όγκου παρατηρείται απώλεια αριθμού κυττάρων.

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων και η συσχέτισή τους με το φύλο του νεογνού και τον τύπο του τοκετού έρχεται σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες (*Yang et al., 2011; Lee et al., 2009 και Aroviita et al., 2005*). Αντίθετα, η συσχέτιση του κυτταρικού πληθυσμού με τις εβδομάδες κύησης και το βάρος του νεογνού, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, έρχεται σε διαφωνία με άλλες (*Al-bayati et al., 2011 και Sheffer-Mimouni et al., 2007*). Πιθανή αιτία είναι ο μικρός αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν. Για το λόγο αυτό, συνιστάται επανάληψη της παρούσας μελέτης με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Τέλος, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη συγκέντρωση των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στις μονάδες ΟΠ.Α, όπως το κάπνισμα, η υπέρταση, η χρήση αλκοόλ και ορισμένων φαρμάκων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, έτσι ώστε να αποκλειστούν από τη μελέτη.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Adami V, Malangone W, Falasca E, Marini L, Risso A, Crini S, Toniutti E, Passoni Ferraro E, Del Frate G, Pittino M, Biffoni F, Rinaldi C, Degrassi A.** (2005) A closed system for the clinical banking of umbilical cord blood. *Blood Cells Mol Dis*, 35(3):389-97.
- 2. Ali H, Al-Mulla F.** (2012) Defining umbilical cord blood stem cells. *Stem Cell Discovery* , 2(1):15-23.
- 3. Alkindi S, Dennison D.** (2011) Umbilical Cord Blood Banking and Transplantation: A short review. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 11(4):455-61.
- 4. Alonso JM 3rd, Regan DM, Johnson CE, Oliver DA, Fegan R, Lasky LC, Wall DA.** (2001) A simple and reliable procedure for cord blood banking, processing, and freezing: St Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences. *Cytotherapy*, 3(6):429-33.
- 5. Armson BA.** (2005) Umbilical cord blood banking: implications for perinatal care providers. *J Obstet Gynaecol Can*, 27(3):263-90.
- 6. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomäki R.** (2005) Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion*, 45(4):613-21.
- 7. Badowski MS, Harris DT.** (2012) Collection, processing, and banking of umbilical cord blood stem cells for transplantation and regenerative medicine. *Methods Mol Biol*, 879:279-90.
- 8. Barker JN, Byam C, Scaradavou A.** (2011) How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. *Blood*, 24;117(8):2332-9.
- 9. Basford C, Forraz N, Habibollah S, Hanger K, McGuckin C.** (2010) The Cord Blood Separation League Table: a Comparison of the Major Clinical Grade Harvesting Techniques for Cord Blood Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*, 3(1):32-45.
- 10. Bhattacharya N, Stubblefield P.** (2009) *Frontiers in Cord Blood Science*, 1st edition, Springer, London.

11. **Bryant C, Beall M, McPhaul L, Fortson W, Ross M.** (2006) Do placental sections accurately reflect umbilical cord nucleated red blood cell and white blood cell differential counts? *J Matern Fetal Neonatal Med*, 19(2):105-8.
12. **Butler MG, Menitove JE.** (2011) Umbilical cord blood banking: an update. *J Assist Reprod Genet*, 28(8):669-76.
13. **Buttarelo M, Plebani M.** (2008) Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol*, 130(1):104-16.
14. **Chandra T, Afreen S, Kumar A, Singh U, Gupta A.** (2012) Does umbilical cord blood-derived CD34⁺ cell concentration depend on the weight and sex of a full-term infant? *J Pediatr Hematol Oncol*, 34(3):184-187.
15. **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E.** (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315-7.
16. **Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE.** (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, 3;10(2):120-36.
17. **Dunckley H.** (2012) HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol*, 882:9-25.
18. **Gluckman E, Ruggeri A, Rocha V, Baudoux E, Boo M, Kurtzberg J, Welte K, Navarrete C, van Walraven SM.** (2011) Family-directed umbilical cord blood banking. *Haematologica*, 96(11):1700-7.
19. **Harris DT.** (2008) Collection, Processing, and Banking of Umbilical Cord Blood Stem Cells for Clinical Use in Transplantation and Regenerative Medicine. *LabMedicine*, 39(3):173-178.
20. **Harris DT.** (2012) Optimizing cord blood sample cryopreservation. *Cytotherapy*, 14(3):359-65.
21. **Hermansen MC.** (2012) Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 84(3):F211-5.
22. **Kalodimou VE, Bikos L, Kourenti C, Fifa A, Vlachousis A.** (2011) Direct measurement of CD34⁺ cord blood stem cell absolute counts, viability and WBC using flow cytometry. *Health Science Journal*, 5(4):306-319.

23. **Kil TH, Han JY, Kim JB, Ko GO, Lee YH, Kim KY, Lim JW.** (2011) A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weights. *Korean J Pediatr*, 54(2):69-78.
24. **Kita K, Lee JO, Finnerty CC, Herndon DN.** (2011) Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. *Stem Cells Int*, 2011:276193.
25. **Koliakos G, Alamdari D, Tsagias N, Kouzi-Koliakos K, Michaloudi E, Karagiannis V.** (2007) A novel high-yield volume-reduction method for the cryopreservation of UC blood units. *Cytotherapy*, 9(7):654-9.
26. **Koo HH, Ahn HS.** (2012) Umbilical cord blood transplantation. *Korean J Pediatr*, 55(7):219-23.
27. **Krishan A, Krishnamurthy H, Totey S.** (2010) Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration, 1st edition, Willey-Blackwell, New Jersey.
28. **Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J.** Ανοσολογία, 5^η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα.
29. **Kudo Y, Minegishi M, Seki O, Takahashi H, Suzuki A, Narita A, Sato Y, Abe M, Ishioka N, Harigae H, Tsuchiya S.** (2011) Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. *Int J Hematol*, 93(5):645-51.
30. **Kumo T, Tomizawa Y, Kita M, Takabayashi, Tamiya E, Takamura Y.** (2010) Concentration and extraction chip of fetal nucleated red blood cell (NRBC) by micro gap with diaphragm for fetal DNA diagnosis from maternal blood. 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Groningen.
31. **Larghero J, Rea D, Brossard Y, Van Nifterik J, Delasse V, Robert I, Biscay N, Chantre E, Raffoux E, Socié G, Gluckman E, Benbunan M, Marolleau JP.** (2006) Prospective flow cytometric evaluation of nucleated red blood cells in cord blood units and relationship with nucleated and CD34(+) cell quantification. *Transfusion*, 46(3):403-6.
32. **Laurenti E, Dick JE.** (2012) Molecular and functional characterization of early human hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1266:68-71.

33. **Lee HR, Shin S, Yoon JH, Kim BJ, Hwang KR, Kim JJ, Roh EY.** (2009) Complete blood count reference values of donated cord blood from Korean neonates. *Korean J Lab Med*, 29(3):179-84.
34. **Lensch MW.** (2012) An evolving model of hematopoietic stem cell functional identity. *Stem Cell Rev*, 8(2):551-60.
35. **Marsee DK, Pinkus GS, Yu H.** (2010) CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*, 134(3):429-35.
36. **Mayani H, Lansdorp PM.** (1998) Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 16(3):153-65.
37. **McKenna D, Sheth J.** (2011) Umbilical cord blood: current status & promise for the future. *Indian J Med Res*, 134:261-9.
38. **Mehta A, Hoffbrand V.** (2005) *Hematology at a glance*, 2nd edition, Blackwell Publishing, UK.
39. **Mehta P.** (2004) *Pediatric Stem Cell Transplantation*, 1st edition, Jones & Bartlett Learning, London.
40. **Moise KJ Jr.** (2005) Umbilical cord stem cells. *Obstet Gynecol*, 106(6):1393-407.
41. **M-Reboredo N, Díaz A, Castro A, Villaescusa RG.** (2000) Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 26(12):1263-70.
42. **Navarrete C, Contreras M.** (2009) Cord blood banking: a historical perspective. *Br J Haematol*, 47(2):236-45.
43. **Nissen-Druey C, Tichelli A, Meyer-Monard S.** (2005) *Human hematopoietic colonies in health and disease*, 1st edition, Karger Medical and Scientific Publishers, Basel.
44. **Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB, Fischer G, Poulton K, Wacker K, Hurley CK, Noreen H, Sacchi N.** (2011) Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood*, 118(23):e180-3.
45. **Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, Balber AE, Kurtzberg J.** (2011) Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood

- transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17(9):1362-74.
- 46. Pelosi E, Castelli G, Testa U.** (2012) Human umbilical cord is a unique and safe source of various types of stem cells suitable for treatment of hematological diseases and for regenerative medicine. *Blood Cells Mol Dis*, 15;49(1):20-8.
- 47. Picardi A, Arcese W.** (2010) Quality assessment of cord blood units selected for unrelated transplantation: a transplant center perspective. *Transfus Apher Sci*, 42(3):289-97.
- 48. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A.** (2008) Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(7):901-13.
- 49. Regan DM, Wofford JD, Wall DA.** (2010) Comparison of cord blood thawing methods on cell recovery, potency, and infusion. *Transfusion*, 50(12):2670-5.
- 50. Robin M, Kernès S, Porcher R, de Latour RP, Traineau R, Ribaud P, Rocha V, Devergie A, Marolleau JP, Benburan M, Socié G, Larghero J.** (2008) Influence of bone marrow nucleated red blood cell dose on outcome after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*, 140(6):725-7.
- 51. Rolfo A, Maconi M, Cardaropoli S, Biolcati M, Danise P, Todros T.** (2007) Nucleated red blood cells in term fetuses: reference values using an automated analyzer. *Neonatology*, 92(3):205-8.
- 52. Rubinstein P.** (2009) Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 44(10):635-42.
- 53. Salem HK, Thiemermann C.** (2010) Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, 31;28(3):585-96.
- 54. Salge-Bartels U, Huber HM, Kleiner K, Volkens P, Seitz R, Heiden M.** (2009) Evaluation of Quality Parameters for Cord Blood Donations. *Transfus Med Hemother*, 36(5):317-324.

- 55. Sheffer-Mimouni G, Mimouni FB, Dollberg S, Mandel D, Deutsch V, Littner Y.** (2007) Neonatal nucleated red blood cells in infants of overweight and obese mothers. *J Am Coll Nutr*, 26(3):259-63.
- 56. Smith A.** (2006) A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441:1060.
- 57. Selves P, Mirabet V, Roig R.** (2010) Volume reduction in routine cord blood banking. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5(4):362-6.
- 58. Stevens CE, Gladstone J, Taylor PE, Scaradavou A, Migliaccio AR, Visser J, Dobrila NL, Carrier C, Cabbad M, Wernet P, Kurtzberg J, Rubinstein P.** (2002) Placental/umbilical cord blood for unrelated-donor bone marrow reconstitution: relevance of nucleated red blood cells. *Blood*, 100(7):2662-4.
- 59. Takanashi M, Oba A, Ogawa A, Ito M, Kawahata Y, Nakajima K.** (2010) Red blood cell depletion of cord blood using an automated system-Evaluation of the AXP system. *Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*, 56(1):62-67.
- 60. Troyer DL, Weiss ML.** (2008) Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26(3):591-9.
- 61. Tse W, Laughlin MJ.** (2005) Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 377-83.
- 62. Westhoff CM.** (2006) Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol*, 13(6):471-5.
- 63. Wilkerson MJ.** (2012) Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(1):53-71.
- 64. Wognum B, Yuan N, Lai B, Miller CL.** (2013) Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. *Methods Mol Biol*, 946:267-83.
- 65. Yang H, Loutfy MR, Mayerhofer S, Shuen P.** (2011) Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation. *Transfusion*, 51(2):284-92.
- 66. Γερμενής Α.** (2000) *Ιατρική Ανοσολογία*, 1^η έκδοση, εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα.
- 67. Δανιηλίδης Α, Κουζή-Κολιάκου Κ, Κλεάρχου Ν, Τσάγιας Ν, Μαυρομιχάλη Μ, Καραγιάννης Β.** (2006) Απομόνωση εμπύρηνων εμβρυικών ερυθρών αιμοσφαιρίων από το περιφερικό αίμα εγκύων, με τη χρήση μαγνητικού διαχωρισμού. *Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογία*, 18(3):238-245.

- 68. Εθνικός Οργανισμός Μεταμοσχεύσεων.** (2011) Στατιστικά στοιχεία.
<http://www.eom.gr>.
- 69. Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου Α.** (2003) Αιματολογία Ι, 1^η έκδοση, Βήτα Ιατρικές Εκδόσεις, Αθήνα.

