

ΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΝΕΑΣ ΗΜΙ-
ΑΥΤΟΜΑΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΧΡ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ
ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ
ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ
ΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ
ΜΕΘΟΔΟ «*RUBINSTEIN*».**

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΠΑΛΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

A.M. 09529

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΝΕΑΣ ΗΜΙ-
ΑΥΤΟΜΑΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΧΡ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ
ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ
ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ
ΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ
ΜΕΘΟΔΟ «*RUBINSTEIN*».**

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΠΑΛΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

A.M. 09529

ΑΘΗΝΑ, 2014

TEI OF ATHENS

FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS

DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

THESIS

**QUALITATIVE EVALUATION OF ISOLATION
RESULTS OF CORD BLOOD STEM CELLS WITH THE
NEW SEMI-AUTOMATIC METHOD AXP IN
COMPARISON WITH THE «*RUBINSTEIN*» METHOD.**

SUPERVISOR: KRIEMPARDIS ANASTASIOS

PALAIOPOULOU MARIA

R.N.: 09529

ATHENS, 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκιόκα, διευθύντρια της Ελ.Τ.ΟΠΑ και τον Δρ. Αντρέα Παπασάββα,υποδιευθυντή της Ελ.Τ.ΟΠΑ για την ανάθεση του θέματος. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Χατζησταματίου Φάνη, τον Δρ. Μιχαλόπουλο Στάθη και την κ. Παναγούλη Έφη για την πολύτιμη βοήθειά τους. Επίσης, ευχαριστώ τον Μαλλή Παναγιώτη, τη Μαρκογιάννη Έλενα και γενικά όλα τα μέλη της Ελ.Τ.ΟΠΑ για την υποστήριξή τους.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή, Δρ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, δίχως τις οποίες θα ήταν αδύνατη η εκτέλεση της παρούσας εργασίας. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, για τις θυσίες που έχουν κάνει ώστε να καταφέρω να πραγματοποιήσω τα όνειρα μου, καθώς επίσης και στους φίλους μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
ABSTRACT	viii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΟΡΩΝ	ix-xi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	2
1.1. ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	2
1.2. ΠΕΡΙΟΔΟΙ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ	2
1.2.1. ΕΜΒΥΪΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ	3
1.2.2. ΜΕΤΕΜΒΡΥΪΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ.....	3-4
1.3. ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	4-7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	8
2.1. ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ	8
2.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	8
2.2.1. ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	8-14
2.2.2. ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΜΗ-ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	15
2.2.3. ΜΕΣΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	15-16
2.3. ΤΟ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΜΟΣΧΕΥΜΑ	16-18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	19
3.1. ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	19
3.2. ΦΥΛΑΞΗ ΟΠ.Α. ΣΤΙΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΟΠ.Α.....	19-20
3.3. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗΣ ΤΡΑΠΕΖΩΝ	20
3.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΧΩΡΟ	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	21
4.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΠ.Α.....	21-22
4.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΟΠ.Α.....	22
4.2.1. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ	23-25
4.2.2. ΚΡΥΟΚΑΤΑΨΥΞΗ	26
4.2.3. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	26-31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	32
5.1. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΠ.Α	32
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	33

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΤΡΑΠΕΖΑ. 35-36

2. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α. ΜΕ ΤΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΠΛΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥΛΙΘΥΛΙΟΥ Ή ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΙΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΧΡ ΚΑΙ ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ..... 37-41

3. ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α. 41-42

4. ΑΠΟΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α. 43-44

5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α.....45

5.1. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ45

5.2. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ (Automated Hematology Analyzer, NIHON-KODEN).45

5.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ..... 46-52

5.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CFU (COLONY FORMING UNIT)..... 52-53

5.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ 53-54

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α.....56

2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΟΠ.Α 57-58

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΟΠ.Α. ΜΕ ΤΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟ.....59

2.2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΟΠ.Α. ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΧΡ..... 59-60

3. ΚΑΤΑΨΥΞΗ-ΑΠΟΨΥΞΗ60

3.1. ΑΠΟΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α. ΠΟΥ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟ.....60

3.1.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ61

3.2. ΑΠΟΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α. ΠΟΥ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΧΡ61

3.2.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ62

4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ..... 63-69

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 70-71

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ72

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73-77
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	78-79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠ.Α) είναι το αίμα που κυκλοφορεί μεταξύ του ομφαλίου λώρου και του πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Κύριος ρόλος του, είναι η μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών από τη μητέρα στο έμβρυο, με στόχο τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου. Το ΟΠ.Α. παραμένει στον ομφάλιο λώρο για μικρό χρονικό διάστημα, χωρίς να πήξει, γι' αυτό και η συλλογή του θα πρέπει να πραγματοποιηθεί πολύ γρήγορα. Είναι μία πλούσια πηγή προγονικών κυτταρικών πληθυσμών (αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, μη-αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και μεσεγχυματικά κύτταρα) και τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ως μόσχευμα για τη θεραπεία πολλών νοσημάτων, ως εναλλακτική επιλογή της μεταμόσχευσης μυελού των οστών ή σε συνδιασμό με αυτόν. Γι' αυτόν το λόγο έχουν δημιουργηθεί οι Τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, καθώς και οργανισμοί οι οποίοι τις ελέγχουν και θεσπίζουν κανονισμούς για τη σωστή λειτουργία τους. Οι τράπεζες αυτού του τύπου επεξεργάζονται τις μονάδες ΟΠ.Α., με σκοπό να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μόσχευμα και τις αποθηκεύουν.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο ποιοτικός έλεγχος των μεθόδων επεξεργασίας των μονάδων ΟΠ.Α., με σκοπό τη δημιουργία ποιοτικών και αξιοποιήσιμων μοσχευμάτων. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μείωση όγκου σε μονάδες ΟΠ.Α. με δύο τρόπους: α. με τη χειροκίνητη μέθοδο διπλής φυγοκέντρωσης, μετά από προσθήκη αμύλου του υδροξυαιθυλίου και β. με τη νέα ημι-αυτόματη (semi-automated) μέθοδο AXP (AutoXpress Platform). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κρυσυντήρηση των μονάδων ΟΠ.Α.. Μετά την πάροδο 3 μηνών, οι μονάδες αυτές αποψύχθηκαν, με σκοπό την εξαγωγή αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων για την σύγκριση των δύο μεθόδων μείωσης όγκου. Καθ' όλη τη διάρκεια των διαδικασιών, έγινε μέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών με ποικίλους τρόπους, προκειμένου να αξιολογηθούν και να συγκριθούν οι 2 μέθοδοι, όσον αφορά στην απόδοσή τους.

ABSTRACT

Umbilical cord blood (UCB) is the blood that circulates between umbilical cord and the placenta during pregnancy. Its main role is oxygen and nutrient transportation, from mother to fetus, for the normal development of fetus. Cord blood (CB) inside umbilical cord remains without clot formation, for a short time after childbirth, and that is the reason why the collection should be carried out very quickly. It is a rich source of progenitor cells (HSCs, non - hematopoietic progenitor cells, mesenchymal cells) and lately, used as a graft to treat several hematological diseases, as an alternative to bone marrow transplantation, or in combination with it. The creation of cord blood banks, and organizations who control them, aims to establish a proper and functional way of storing CB units, which can be released for transplantation in case someone who needs them.

The aim of this thesis is to validate two methods of cord blood volume reduction, in order to produce grafts of high quality. These methods are the manual methods of: a. double centrifugation using Hydroxy ethyl starch (HES) and b. the new semi-autonomous method called AXP (AutoXpress Platform). In addition, the volume reduced CBUs were cryopreserved and thawed after 3 months. Cell enumeration was performed, in order to validate and compare the two methods of volume reduction.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΟΡΩΝ

Ελληνικοί όροι

ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.	Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος
ΙΤ	Ισοθερμική τσάντα
ΟΠ.Α	Ομφαλοπλακουντιακό αίμα

Αγγλικοί όροι

AXP	AutoXpress Platform
BFU-E	Burst Forming Unit Erythroid (Μονοδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ερυθρά σειρά)
Buffy coat	Εμπύρηνα κύτταρα και λίγα αιμοπετάλια
CBU	Cord Blood Unit (Μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος)
CD	Cluster of Differentiation (Σύμπλεγμα διαφοροποίησης)
CFC	Colony Forming Cell (Κύτταρο Ικανό Σχηματισμού Αποικιών)
CFU	Colony Forming Unit (Μονάδα Σχηματιζόμενων Αποικιών)
CFU-Bas	Colony Forming Units-Basophil (προγονικά κύτταρα των βασεοφίλων)
CFU-E	Colony Forming Units-Erythroid (προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς)

CFU-Eo	Colony Forming Units-Eosinophil (προγονικά κύτταρα των ηωσινοφίλων)
CFU-G	Colony Forming Units-Granulocyte (προγονικά κύτταρα των ουδετερόφιλων)
CFU-GEMM	Colony Forming Unit Granulocyte, Erythroid, Monocytes, Megakaryocytes (Πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκίωδη, ερυθρά, μονοκυτταρική και μεγακαρυωτική σειρά)
CFU-GM	Colony Forming Unit Granulocyte, Monocyte (Ωριμότερο δίδυμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκίωδη και τη μονοκυτταρική σειρά)
CFU-M	Colony Forming Units-Monocyte/Macrophage (προγονικά κύτταρα των μονοκυττάρων)
CFU-Meg	Colony Forming Units-Megacaryocyte (προγονικά κύτταρα της μεγακαρυωτικής σειράς)
ddH₂O	Distilled Deionized Water (Απεσταγμένο και απιονισμένο ύδωρ)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (Διμεθυλοσουλφοξείδιο)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
FBS	Fetal Bovine Serum (Βόειος Εμβρυϊκός Ορός)
FS	Forward Scatter (Πρόσθια σκέδαση)
HCT	Αιματοκρίτης
HES	Hydroxyl Ethyl Starch (Αιθυλικό υδροξείδιο του αμύλου)
HLA	Human Leukocyte Antigen (Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο)
HSC	Hematopoietic Stem Cell (Αιμοποιητικό στελεχειαίο κύτταρο)
HPCs	Hematopoietic Progenitor Cells (Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα)

MSCs	Mesenchymal Stem Cells (Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα)
NRBCs	Nucleated Red Blood Cells (Εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού)
PLT	Platelets (Αιμοπετάλια)
QC sample	Quality Control sample (Δείγμα Ποιοτικού Ελέγχου)
RBCs	Red Blood Cells (Ερυθρά αιμοσφαίρια)
SS	Side Scatter (Πλάγια σκέδαση)
TNCs	Total Nucleated Cells (Συνολικός αριθμός εμπύρηνων κυττάρων)
UCB	Umbilical cord blood (Ομφαλοπλακουντιακό αίμα)
WBCs	White Blood Cells (Λευκά αιμοσφαίρια)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Αιμοποίηση ορίζεται το σύνολο μηχανισμών, το οποίο εξασφαλίζει τη συνεχή παραγωγή, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των έμμορφων στοιχείων του αίματος, καθώς επίσης και την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος στον οργανισμό (Πίνακας 1). Η αιμοποίηση πραγματοποιείται στα αιμοποιητικά όργανα, τα οποία είναι: τα λεμφοκυτογόνα ή λεμφικά όργανα, όπου ωριμάζουν τα λεμφοκυττάρια και ο μυελός των οστών, όπου διαφοροποιούνται και ωριμάζουν τα υπόλοιπα στοιχεία του αίματος (Γερμενής Ε. Αναστάσιος, 2000, Πάγκαλης Α. Γεράσιμος, 2008, Ali and Al-Mulla, 2012).

Πίνακας 1. Στοιχεία του αίματος (αντύπωση από Γερμενής Ε. Αναστάσιος, 2000, Πάγκαλης Α. Γεράσιμος, 2008).

ΑΙΜΑ	
ΑΜΟΡΦΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΕΜΜΟΡΦΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ
Πλάσμα: υδατικό διάλυμα με μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και συμμετέχει στην ανταλλαγή συστατικών του εξωκυττάριου υγρού των ιστών.	Ερυθρά αιμοσφαίρια (Red Blood Cells, RBCs): μεταφορά οξυγόνου (O ₂) και διοξειδίου του άνθρακα (CO ₂) από τους πνεύμονες στους περιφερειακούς ιστούς και αντίστροφα.
	Λευκά αιμοσφαίρια (White Blood Cells, WBCs): αποτελούν κυτταρικό συστατικό του ανοσιακού συστήματος.
	Αιμοπετάλια (Platelets, PLTs): συμμετέχουν στην πήξη του αίματος και βοηθούν στην αποκατάσταση της βλάβης των αγγείων.

1.2. ΠΕΡΙΟΔΟΙ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η αιμοποίηση διακρίνεται σε δύο περιόδους: την εμβρυϊκή αιμοποίηση και τη μετεμβρυϊκή αιμοποίηση.

1.2.1. ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η αιμοποίηση στο έμβρυο διακρίνεται σε τρία στάδια:

- Τη μεσοβλαστική ή προηπατική περίοδο
- Την ηπατοσπληνική περίοδο
- Τη μυελική περίοδο

Η μεσοβλαστική περίοδος αρχίζει στο τέλος της τρίτης εμβρυϊκής εβδομάδας και διαρκεί ως το τέλος του δεύτερου εμβρυϊκού μήνα. Σε αυτή την περίοδο, η αιμοποίηση ξεκινά από το λεκιθικό ασκό και τον κοιλιακό μίσχο. Στο αίμα τα περισσότερα κύτταρα διαφοροποιούνται και μετατρέπονται σε αρχέγονες ερυθροβλάστες, ενώ τα υπόλοιπα παραμένουν αδιαφοροποίητα (αιμοκυτοβλάστες), καθώς επίσης δεν υπάρχουν λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Η αιμοκυτοβλάστη είναι αρχέγονο αδιαφοροποίητο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο και αποτελεί τον πρόγονο των μητρικών κυττάρων των έμμορφων στοιχείων του αίματος.

Η ηπατοσπληνική περίοδος ξεκινά στο τέλος του δεύτερου εμβρυϊκού μήνα και διαρκεί έως τον έβδομο μήνα της εγκυμοσύνης. Η αιμοποίηση πραγματοποιείται κυρίως στο μεσέγχυμα του ήπατος και λιγότερο στο σπλήνα και στο θύμο αδέν, όπου ωριμάζουν ερυθροκύτταρα και λεμφοκύτταρα.

Η μυελική περίοδος ξεκινά περίπου στον πέμπτο εμβρυϊκό μήνα, όπου ο μυελός των οστών μαζί με το ήπαρ έχουν αιμοποιητική λειτουργία. Αμέσως μετά τον τοκετό ο μυελός των οστών αποτελεί το κύριο αιμοποιητικό όργανο στον οποίο τα κύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν σε ερυθροκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα, μονοπύρηνα και αιμοπετάλια περιόδους (Ιωαννίδου Παπακωνσταντίνου Α., 2003).

1.2.2. ΜΕΤΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά τη μετεμβρυϊκή περίοδο το κύριο αιμοποιητικό όργανο είναι ο μυελός των οστών, όπου παράγονται όλα τα έμμορφα στοιχεία του αίματος, εκτός από τα λεμφοκύτταρα (Πίνακας 2). Ο μυελός των οστών διακρίνεται σε (Ιωαννίδου Παπακωνσταντίνου Α., 2003):

- Ερυθρό (στο νεογνό)
- Ωχρό ή λιπώδη (μετά το πέμπτο έτος της ζωής του ανθρώπου)
- Πηκτώδη (στη γεροντική ηλικία)

Πίνακας 2. Θέσεις αιμοποίησης (ανατύπωση από Hoffbrand A. V., 2009).

Έμβρυο	0-2 μηνών (λεκιθικός σάκκος)
	2-7 μηνών (ήπαρ, σπλήνας, θύμος αδένας)
	5-9 μηνών (μυελός των οστών)
Νεογνό	Μυελός των οστών (σχεδόν από όλα τα οστά)
Ενήλικας	Σπόνδυλοι, πλευρές, στέρνο, κρανίο, ιερόν οστόύν και πυλεός, το ανώτερο τμήμα του μηριαίου.

1.3. ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όλες οι αιμοποιητικές σειρές προέρχονται από τη διαφοροποίηση ενός πολυδύναμου στελεχιαίου αιμοποιητικού κυττάρου. Με την κυτταρική διαίρεση, το στελεχιαίο κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα, τα οποία όταν ωριμάσουν θα δώσουν γένεση σε προγονικά κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών (ερυθρά, κοκκιωδή, μεγακαρυοκυτταρική, μονοκυτταρική και λεμφική). Το στελεχιαίο αιμοποιητικό κύτταρο έχει την ικανότητα της αυτοανανέωσης, έτσι ώστε η κυτταροβρίθεια του μυελού να παραμένει σταθερή σε κανονικές συνθήκες (Πάγκαλης Α. Γεράσιμος, 2008).

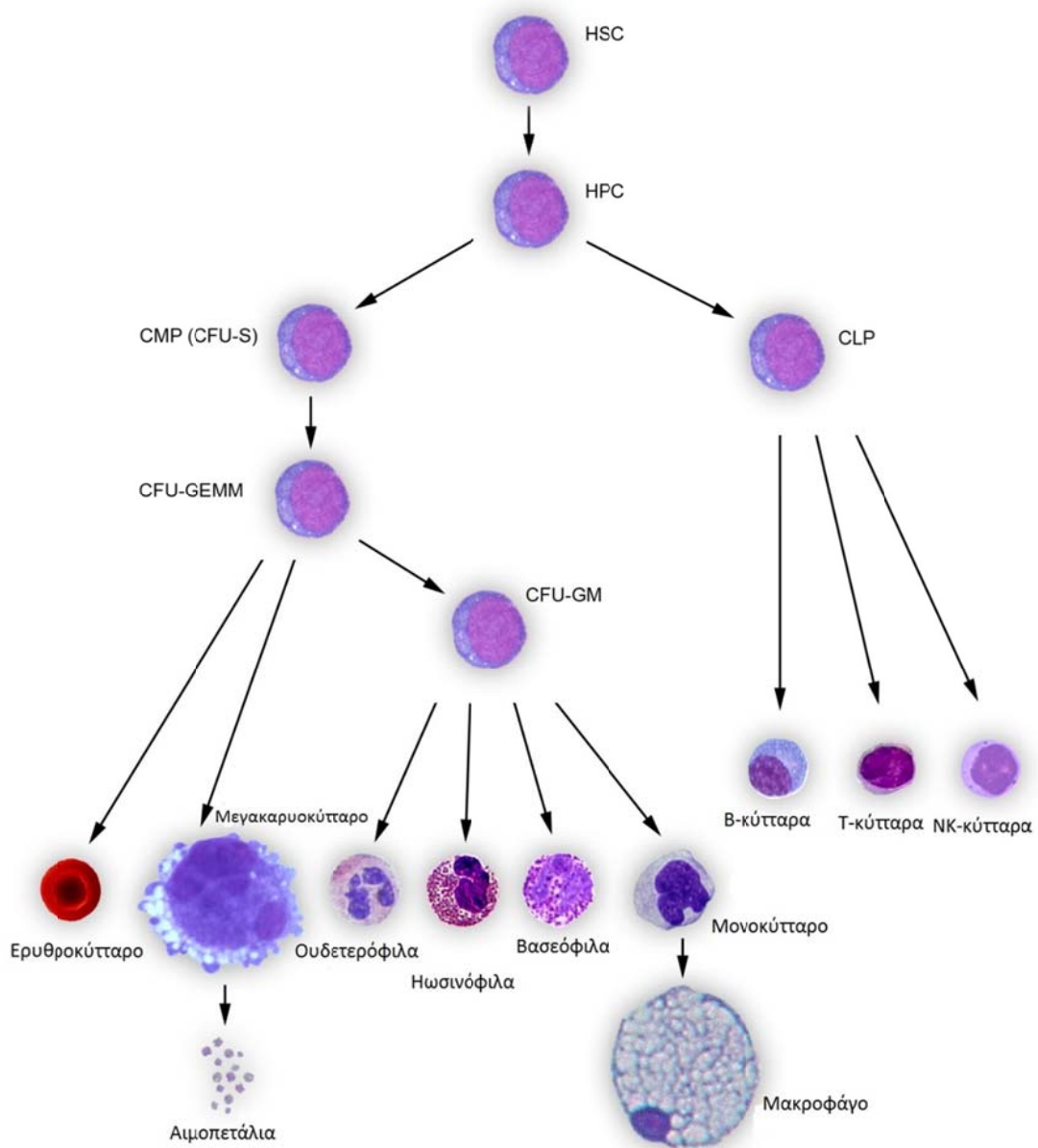
Αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (Hematopoietic Stem Cell, HSC) ορίζεται μία ομάδα ποικιλοδύναμων στελεχιαίων κυττάρων, τα οποία δίνουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αίματος, τόσο της μυελικής όσο και της λεμφικής σειράς. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εντοπίζονται στο μυελό των οστών, το περιφερικό αίμα και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠ.Α.). Αντιπροσωπεύουν περίπου το 0.05% του συνόλου των αιμοποιητικών κυττάρων και μόλις το 0.01% των κυττάρων του μυελού των οστών. 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 βάσει της δέσμευσης για δημιουργία κυτταρικών σειρών σε: μυελικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (Common myeloid progenitor, CMP) και λεμφικά προγονικά

αιμοποιητικά κύτταρα (Common lymphoid progenitor, CLP), τα οποία είναι και πολυδύναμα (Ιωαννίδου Παπακωνσταντίνου Α., 2003). Αυτά με τη σειρά τους θα δώσουν γένεση σε πιο διαφοροποιημένα και δεσμευμένα προγονικά κύτταρα. Από τα μυελικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα θα προκύψουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και μονοκύτταρα, ενώ από τα λεμφικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα θα προκύψουν τα Β και Τ λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural killer, NK).

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, από μορφολογική άποψη, είναι μη αναγνωρίσιμα κύτταρα, επειδή ιστολογικά μοιάζουν με τα λεμφοκύτταρα. Έχουν μικρό μέγεθος με μεγάλο πυρήνα, ενώ το κυτταρόπλασμά τους είναι περιορισμένο. Για το λόγο αυτό, γίνεται χρήση ειδικών τεχνικών δοκιμασιών, όπως είναι οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην αναγνώριση αυτού του τύπου κυττάρων 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, Smith, 2006). Στον άνθρωπο η καλλιέργεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από ΟΠ.Α. μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μεσεγχυματικών κυττάρων ως υπόστρωμα. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα δίνουν τη δυνατότητα στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα να αναπτυχθούν ακόμα και αν ο αριθμός τους σε μία μονάδα ΟΠ.Α. είναι χαμηλός (Shpall EJ, 2002). Παρ' όλα αυτά υπάρχουν πολλά συστήματα καλλιέργειας τα οποία επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων που είναι δεσμευμένα στις κυτταρικές σειρές του μυελού των οστών. Στα καλλιεργητικά μέσα, αυτά τα προγονικά κύτταρα ονομάζονται αποικιογόνα κύτταρα (Colony Forming Units, CFU) (Γεράσιμος Πάγκαλης, 2005). Οι αποικίες της μυελικής σειράς είναι (Εικόνα 1) (Ιωαννίδου Παπακωνσταντίνου Α., 2003):

- CFU-E (Colony Forming Units-Erythroid, προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς).
- CFU-GM (Colony Forming Units-Granulocyte/Monocyte, προγονικά κύτταρα της κοκκιοκυτταρικής και μονοκυτταρικής σειράς).
- CFU-Eo (Colony Forming Units-Eosinophil, προγονικά κύτταρα των ηωσινοφίλων).

- CFU-Bas (Colony Forming Units-Basophil, προγονικά κύτταρα των βασεοφίλων).
- CFU-M (Colony Forming Units-Monocyte/Macrophage, προγονικά κύτταρα των μονοκυττάρων).
- CFU-G (Colony Forming Units-Granulocyte, προγονικά κύτταρα των ουδετερόφιλων).
- CFU-Meg (Colony Forming Units-Megacaryocyte, προγονικά κύτταρα της μεγακαρυοτικής σειράς).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της αιμοποίησης (ανατύπωση από «<https://daley.med.harvard.edu/assets/Willy/willy.htm>» access in 26/03/2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ

Ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠ.Α.-Umbilical Cord Blood, UCB), είναι το αίμα που κυκλοφορεί στον ομφάλιο λώρο, ο οποίος είναι ο ιστός που συνδέει τον πλακούντα με το αναπτυσσόμενο έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης. Μέσω αυτού, το έμβρυο τροφοδοτείται με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο από τον πλακούντα με σκοπό την ανάπτυξή του. Σε αυτό κυκλοφορούν διάφορες κατηγορίες στελεχιαίων και προγονικών κυττάρων και για το λόγο αυτό συλλέγεται. Το ΟΠ.Α. παραμένει μέσα στον ομφάλιο λώρο αμέσως μετά τη γέννηση του νεογνού, όπου γίνεται και η συλλογή του από τον μαιευτήρα (*Ali and Al-Mulla, 2012*).

2.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Το ΟΠ.Α. είναι ένα ετερογενές μείγμα αιμοποιητικών κυττάρων. Εκτός από τα κύτταρα του αίματος, όπως είναι τα ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια και τα θρομβοκύτταρα, το ΟΠ.Α. περιέχει διαφορετικούς πληθυσμούς στελεχιαίων κυττάρων. Στο σημείο αυτό διαφέρει με το περιφερικό αίμα, το οποίο δεν περιέχει στελεχιαία κύτταρα. Το ΟΠ.Α. περιέχει τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς τύπους προγονικών κυττάρων (*Ali and Al-Mulla, 2012*):

- Τα μεσεγχυματικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs).
- Τα πολυδύναμα μη-αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (Multipotent Non-Hematopoietic Stem Cells).
- Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs).

2.2.1. ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Το 1974 ο Kunddton πρώτος ανέφερε την παρουσία κλωνικών προγονικών κυττάρων σε αίμα του ομφάλιου λώρου. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται στη

συνέχεια από πολλούς άλλους μελετητές, γεγονός που αποδεικνύει ότι το ΟΠ.Α. είναι πλούσια πηγή προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Επίσης παρατηρήθηκε ότι αυτά τα κύτταρα βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ΟΠ.Α. από ότι στο αίμα των ενήλικων ανθρώπων. Ο Broxmeyer και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν, το 1989, μία μελέτη που ανέδειξε την παρουσία των αιμοποιητικών στελεχειαίων κυττάρων στο ΟΠ.Α. (Broxmeyer H.E, 1989).

Έχει αποδειχθεί ότι το ΟΠ.Α. περιέχει αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια της αιμοποίησης, τα οποία εκφράζουν ποικίλους αντιγονικούς δείκτες (Cluster of Differentiation, CD) (Πίνακας 3). Η παρουσία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο ΟΠ.Α., οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την εμβρυϊκή ζωή η αιμοποίηση επιτελείται, όπως προαναφέρθηκε, αρχικά στους λεκιθικούς σάκους και στη συνέχεια μεταναστεύουν, μέσω της κυκλοφορίας του ΟΠ.Α., στο ήπαρ και τελικά στο μυελό των οστών.

Πίνακας 3. Αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που εμπεριέχονται στο ΟΠ.Α (ανατύπωση από Goldsby, 2007, Γερμενής, 2000).

CD	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ-ΕΚΦΡΑΣΗ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	ΆΛΛΑ ΟΝΟΜΑΤΑ
CD13	Μυελομονοκύτταρα, πρώιμα προγονικά κύτταρα κοκκιοκυττάρων (CFU-GM)	Μεταλοπρωτεΐνάση του ψευδαργύρου	Αμινοπεπτιδάση-N
CD18	Λευκοκύτταρα	Υπομονάδα της ιντεγκρίνης ¹ b2, συνδέεται με τα CD11a, b και c	
CD19	B-κύτταρα που προέρχονται από τις πιο πρώιμα αναγνωρίσιμες σειρές B-κυττάρων κατά την ανάπτυξη B-κυτταρικών βλαστών, θυλακιακά δενδριτικά κύτταρα	Σχηματίζει σύμπλεγμα με τα CD21 (CR2) και CD18 (TARA-1), συνυποδοχέας στα B-κύτταρα	
CD31	Μονοκύτταρα, αιμοπετάλια, κοκκιοκύτταρα, B-κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα	Πιθανό μόριο προσκόλλησης	PECAM-1

¹ Οι ιντεγκρίνες είναι πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν για την πρόσδεση μεταξύ του κυττάρου και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επίσης συμμετέχουν στη σηματοδότηση των κυττάρων, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στο σχήμα, και την κινητικότητα (Xiong Jian-Ping, 2001).

CD	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ-ΕΚΦΡΑΣΗ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	ΆΛΛΑ ΟΝΟΜΑΤΑ
CD33	Μυελοειδή προγονικά κύτταρα, μονοκύτταρα	Μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που εξαρτάται από το σιαλικό οξύ	
CD34	Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, ενδοθήλιο τριχοειδών	Μόριο προσκόλλησης κυττάρου με κύτταρο, συνδέτης του CD62 (L-σελεκτίνη)	
CD38	Πρώιμα B και T-κύτταρα, ενεργοποιημένα T-κύτταρα, B-κύτταρα των βλαστικών κέντρων, πλασματοκυττάρων		
CD45	Λευκοκύτταρα	Τυροσινική φωσφατάση, ευοδώνει τη μεταβίβαση του μηνύματος του BcR και του TcR	Κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (Leukocyte Common Antigen, LCA), T200, B220
CD45RA	B-κύτταρα, υποπληθυσμοί T-κυττάρων (παρθένα T-κύτταρα) μονοκύτταρα	Ισότυπος του CD45	
CD45RO	Υποπληθυσμοί T και B κυττάρων, μονοκύτταρα, μακροφάγα	Ισότυπος του CD45	
CD45RB	Υποπληθυσμοί T και B κυττάρων, μονοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα	Ισότυπος του CD45	
CD49a	Ενεργοποιημένα T-κύτταρα, μονοκύτταρα	Ιντεγκρίνη α1, συνδέεται με το CD29, το κολλαγόνο και τη λαμινίνη	VLA-1
CD51	Αιμοπετάλια, μεγακαρυοκύτταρα	Ιντεγκρίνη αν, συνδέεται με το CD61, τη βιτρονεκτίνη, τον παράγοντα von Willebrand, το ινωδογόνο και τη θρομβοσπονδίνη	Υποδοχέας της βιτρονεκτίνης
CD54	Αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα	Συνδέεται με τις ιντεγκρίνες CD11a/CD18 (LFA-1) και CD11b/CD18 (Mac-1), υποδοχέας των ρινοϊών	ICAM-1
CD58	Αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης, συνδέεται με το CD2	LFA-3
CD61	Αιμοπετάλια, μεγακαρυοκύτταρα, μακροφάγα	Υπομονάδα της ιντεγκρίνης b3, συνδέεται με το CD41 (GPIIb/IIIa) ή το CD 51	

CD	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ-ΕΚΦΡΑΣΗ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	ΆΛΛΑ ΟΝΟΜΑΤΑ
CD62L	B και T-κύτταρα, μονοκύτταρα, NK-κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης, συνδέεται με τα CD34 και GlyAM, μεσολαβεί στην κύληση των ουδετερόφιλων επί του ενδοθηλίου	LAM-1, L-σελεκτίνη, LECAM-1
CD71	Ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα	Υποδοχέας της τρανσφερίνης	T9
CDw90	CD34 ⁺ προθυμοκύτταρα, θυμοκύτταρα	Πιθανή συμμετοχή στη συνδιέγερση των λεμφοκυττάρων, πιθανή παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	Thy-1
CD117	Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα	Υποδοχέας του παράγοντα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF)	c-kit
CD133	Αρχέγονοι κυτταρικοί πληθυσμοί		
CD135	Πολυδύναμα, μυελομονοκυτταρικά και αρχέγονα προγονικά B-κύτταρα	Υποδοχέας αυξητικού παράγοντα πρόιμων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων	FLT-3
CD184	Αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα	Συνδεδεμένος με G πρωτεΐνη υποδοχέας χημειοκίνης. Συνυποδοχέας για τον ιό HIV	CXCR4, LESTER

CD45

Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία είναι γνωστή ως «κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο» (Leukocyte Common Antigen, LCA). Εκφράζεται σε μεγάλο ποσοστό στα λευκοκύτταρα. Παρουσιάζει οχτώ ισομορφές με διαφορετικά μοριακά βάρη [CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, CD45R (ABC)]. Οι διαφορετικές ισομορφές είναι προϊόν από τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης του αγγελιοφόρου RNA τριών εξονίων ενός απλού γονιδίου. Το αντιγόνο αυτό είναι επίσης γνωστό και ως υποδοχέας τυροσινικής φωσφατάσης τύπου C (Protein tyrosine phosphatase receptor type C, PTPRC).

Βασικός ρόλος του δείκτη CD45 είναι η ενεργοποίηση των T και B κυττάρων, που μεσολαβείται από το σύμπλεγμα αντιγόνου-υποδοχέα. Τα T κύτταρα, τα οποία εκφράζουν διαφορετικές ισομορφές του CD45 έχουν και διαφορετικούς τρόπους ενεργοποίησης. Σε περίπτωση λοίμωξης η έκφραση πολλών ισομορφών στα T κύτταρα μειώνεται (*Altin G. Joseph, 1997, Goldsby, 2007*).

CD34

Πρόκειται για μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται στη μεμβράνη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, τόσο στο ΟΠ.Α. όσο και στο μυελό των οστών. Αποτελεί παράγοντα διακυτταρικής προσκόλλησης, καθώς επίσης βοηθά και στη σύνδεση των στελεχειαίων κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του μυελού των οστών.

Έχει εκτιμηθεί ότι η συχνότητα των κυττάρων CD34⁺ στο μυελό των οστών των ενήλικων ανθρώπων κυμαίνεται σε ποσοστό 1-3% όλων των εμπύρηνων κυττάρων, ενώ στο ΟΠ.Α. είναι 1%. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής ο αριθμός τους μειώνεται περίπου στο 11% των μονοπύρηνων κυττάρων (Mononuclear Cells, MNCs) κατά την 17^η εβδομάδα κύησης και στο 1% κατά την 38^η εβδομάδα. Τα CD34⁺ κύτταρα στο ΟΠ.Α. μπορούν να διαχωριστούν, με βάση την έκφραση του CD45RA και του CD71, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση τριών μεγάλων υποπληθυσμών: πολυδύναμα, μυελοειδή και ερυθροειδή προγονικά κύτταρα. Σημαντικός είναι ο αριθμός τους σε μια μονάδα ΟΠ.Α., αφού αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για τη μεταμόσχευσή τους σε ασθενείς. Παρόλα αυτά η ακριβής λειτουργία αυτής της γλυκοπρωτεΐνης δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένη

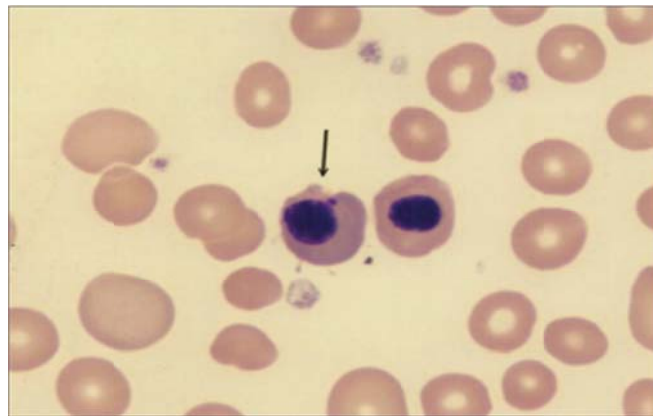
(Kita, 2011, Mayani and Lansdorp, 1998, Laura E. Sidney and Matthew J. Branch, 2014).

CD71

Ο δείκτης CD71 είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, γνωστή και ως υποδοχέας τρανσφερρίνης 1 (Transferrin receptor protein 1, TfR1). Κύρια λειτουργία του είναι η δημιουργία συμπλόκων σιδήρου. Σε ουδέτερο pH, δεσμεύει τη φερροτρανσφερρίνη και «εγκολπώνει» το σύμπλοκο σε όξινο ενδοσωμικό διαμέρισμα, όπου απελευθερώνονται ιόντα σιδήρου. Εκφράζεται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση στα κύτταρα του πλακούντα, στα μυοκύτταρα, στα ηπατοκύτταρα, στα κύτταρα του παγκρέατος και στο σπέρμα. Επίσης εκφράζεται στην επιφάνεια των δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ) και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία ουσιαστικά αποτελούν τις άωρες μορφές των ερυθρών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος. Η ωρίμανσή τους οδηγεί σε απώλεια έκφρασης του υποδοχέα τρανσφερρίνης ενώ παράλληλα ξεκινούν οι μηχανισμοί για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Τέλος, η μέτρηση των CD71 κυττάρων αποτελεί δείκτη για την εκτίμηση ασθενειών, όπως οι λευχαιμίες και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Myelodysplastic syndrome, MDSS) (Derek K. Marsee Geraldine S. Pinkus, 2010, Goldsby, 2007).

Τα εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια: (Nucleated Red Blood Cells, NRBCs) είναι άωρα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία ονομάζονται επίσης και ερυθροβλάστες ή νορμοβλάστες. Για την ορθή χρήση των όρων αυτών οι νορμοβλάστες αφορούν κύτταρα που βρίσκονται στο μυελό των οστών, ενώ τα εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια αφορούν στο αίμα που κυκλοφορεί στον οργανισμό του ανθρώπου. Εντοπίζονται στον εμβρυϊκό μυελό των οστών ως απόκριση στην ερυθροποιητίνη και αποθηκεύονται σε αυτόν ως πρόγονοι των δικτυοερυθροκυττάρων και κατ' επέκταση των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε ένα υγιές νεογνό ο αριθμός των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων ελαττώνεται δραματικά στην κυκλοφορία του αίματός του, αμέσως μετά τη γέννηση, ενώ συναντάται σπάνια και σε μικρό ποσοστό σε μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά. Τα κύτταρα αυτά είναι μονοπύρηννα και το μέγεθός τους είναι περίπου 8 μm-12 μm (Εικόνα 2). Αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων nRBCs παρατηρείται σε παθολογικές καταστάσεις σε νεογνά, παιδιά και ενήλικες, λόγω της αυξημένης ερυθροποιητίνης.

Σε μονάδες ΟΠ.Α. τα εμπύρηννα ευθρά αιμοσφαίρια καταλαμβάνουν σημαντικό ποσοστό των συνολικών εμπύρηννων κυττάρων (Total Nucleated Cells, TNCs). Το γεγονός αυτό προκαλεί ψευδώς θετικά αποτελέσματα για το ποσοστό των CD34⁺ κυττάρων στην μονάδα ΟΠ.Α., έπειτα από την μείωση όγκου που έχει υποστεί (Larghero, 2006, Kumo, 2010).



Εικόνα 2. Εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια από ΟΠ.Α., με χρώση Giemsa (ανατύπωση από <http://www.jcnonweb.com/article.asp?issn=2249-4847;year=2013;volume=2;issue=4;spage=179;epage=182;auiast=Goel> access in 26/03/2014).

CD133

Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, γνωστή και ως AC133. Ο δείκτης αυτός εκφράζεται στην μεμβράνη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινο εμβρυϊκό ήπαρ, το μυελό των οστών και το αίμα, όπως και τα κύτταρα CD34. Τα CD133 κύτταρα παρέχουν μια εναλλακτική λύση για τα CD34 κύτταρα, όσον αφορά στην επιλογή του κατάλληλου μοσχεύματος για εμφύτευση, καθώς επίσης για μελέτες *ex vivo* και για γονιδιακή θεραπεία (Ali and Al-Mulla, 2012, Amy H. Yin, Sheri Miraglia, 2014).

2.2.2. ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΜΗ-ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κύτταρα αυτά είναι μικρά σε μέγεθος και βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο ΟΠ.Α. Επίσης εκφράζουν αρνητικά τον κύριο αιμοποιητικό δείκτη CD45 (λευκοκυτταρικό αντιγόνο). Έχει βρεθεί ότι ο συγκεκριμένος πληθυσμός κυττάρων εκφράζει μεταγραφικούς παράγοντες που εντοπίζονται συνήθως σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, καθώς και συγκεκριμένους επιφανειακούς δείκτες. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κατάλληλες συνθήκες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους που εκπροσωπούν τις τρεις βλαστικές στιβάδες. (*Ali and Al-Mulla, 2012*).

2.2.3. ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία συναντώνται κυρίως στο μυελό των οστών. Κύτταρα αυτού του τύπου απομονώνονται επίσης και από τον ομφάλιο λώρο και εμφανίζουν μορφολογικές ομοιότητες με αυτά του μυελού των οστών (*Gluckman E, 1997*). Βάσει της Διεθνούς Εταιρείας Κυτταρικών Θεραπειών τα μεσεγχυματικά κύτταρα πρέπει να πληρούν και τις τρεις προϋποθέσεις:

- Να εκφράζουν θετικά τους αντιγονικούς δείκτες CD105, CD73 και CD90 ενώ ταυτόχρονα να είναι αρνητικοί για τους δείκτες CD45, CD34, CD11a, CD19 και HLA-DR.
- Έπειτα από συγκεκριμένο ερέθισμα, τα κύτταρα πρέπει να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα.
- Να εμφανίζουν την ιδιότητα προσκόλλησης στο πλαστικό σε συνθήκες καλλιέργειας.

Επιπλέον, παρέχουν στα πολυδύναμα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα το απαραίτητο υπόστρωμα για την ανανέωση και διαφοροποίησή τους (*Salem and Thiernemann, 2010, Ali and Al-Mulla, 2012, Dominici M. and Le Blanc K, 2006*). Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα διχάζεται για την ύπαρξη των μεσεγχυματικών κυττάρων στο ΟΠ.Α.. Σύμφωνα με τη Mareschi και την ομάδα της, η απομόνωση των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι δυνατή μόνο από το μυελό των οστών (*Mareschi K, 2001*). Αντίθετα σύμφωνα με τον Oscar Lee τα μεσεγχυματικά

κύτταρα μπορούν να απομονωθούν τόσο από το μυελό των οστών όσο και από το ΟΠ.Α.. Παρόλα αυτά, επικρατεί διχογνωμία για την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, όπως ισχύει με τα μεσεγχυματικά κύτταρα που απομονώνονται από το μυελό των οστών (*Oscar K. Lee, 2004*).

2.3. ΤΟ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΜΟΣΧΕΥΜΑ

Η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση σε ανθρώπους χρησιμοποιώντας ΟΠ.Α. πραγματοποιήθηκε το 1988, από την Eliane Gluckman και την ομάδα της στο Παρίσι. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ΟΠ.Α., για ένα παιδί που έπασχε από την αναιμία Fanconi, από την νεογέννητη αδερφή του, η οποία ήταν απόλυτα HLA² (Human Leukocyte Antigen) συμβατή με τον αδερφό της (*Gluckman E., Broxmeyer Hal E., 1989*).

Το ΟΠ.Α. συλλέγεται και επεξεργάζεται με σκοπό την απομόνωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και πολυδύναμων προγονικών κυττάρων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μόσχευμα αντί των αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος ή και σε συνδυασμό με αυτά για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών για τη ζωή των ανθρώπων. Ενδεικτικά κακοήθη νοσήματα τα οποία έχουν αντιμετωπιστεί με τη χρήση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από ΟΠ.Α. είναι:

- Λέμφωμα Hodgkin
- Λέμφωμα Non-Hodgkin
- Οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία
- Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία
- Οξεία μυελοειδής λευχαιμία
- Χρόνια μυελοειδής λευχαιμία
- Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο
- Πολλαπλό μύελωμα

² Τα HLA-αντιγόνα (Human Leukocyte 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*).

Μη κακοήθη νοσήματα:

- Ιστιοκυττάρωση των κυττάρων Langerhans
- Νόσος Lesch-Nyhan και νόσος του Krabbe
- Αναιμία Blackfan-Diamond
- Θαλασσαιμία
- Αναιμία Fanconi
- Απλαστική αναιμία
- Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Το ΟΠ.Α. είναι μία πηγή πλούσια σε στελεχειαία κύτταρα και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τον μυελό των οστών (bone marrow) (Πίνακας 4) και το περιφερικό αίμα. Ετησίως, πραγματοποιούνται περίπου 140.000.000 τοκετοί παγκοσμίως, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), γεγονός που φανερώνει τη μεγάλη διαθεσιμότητα ΟΠ.Α..

Παρόλα τα πλεονεκτήματα που προσφέρει το ΟΠ.Α. στον τομέα των μεταμοσχεύσεων, παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Μία μονάδα ΟΠ.Α. μειονεκτεί στον αριθμό των κυττάρων που περιέχει (1×10^7 εμπύρηννα κύτταρα / kg σωματικού βάρους λήπτη) με αποτέλεσμα να καθυστερήσει η εγκατάσταση και ο πολλαπλασιασμός τους. Συνήθως για έναν ενήλικο άνθρωπο που χρήζει μεταμόσχευσης, απαιτούνται περισσότερες από 2 μονάδες ΟΠ.Α.. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα με την ιστοσυμβατότητα των μονάδων που θα μεταμοσχευτούν τόσο μεταξύ τους όσο και με τον λήπτη. Έχει παρατηρηθεί ότι οι μεταμοσχεύσεις ΟΠ.Α. που πραγματοποιούνται σε παιδιά, έχουν καλύτερη έκβαση (Tse W, Laughlin MJ., 2005).

Η συγκέντρωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή στο μυελό των οστών, δηλαδή περίπου 1 ανά 100.000 κύτταρα είναι αρχέγονο. Ωστόσο, η συγκέντρωση αυτή μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση κυτοκινών με σκοπό την κινητοποίηση του περιφερικού αίματος (Reiffers, 1986).

Πίνακας 4. Συγκριτική μελέτη του ΟΠ.Α. και του μυελού των οστών ως μόσχευμα (ανατύπωση από Alkindi and Dennison, 2011, Ali and Al-Mulla, 2012, Rubisteinsteinstein Pablo, 2009, Rocha V., Gluckman E., 2006).

ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟ ΑΙΜΑ	ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ
Ευκολία συλλογής ΟΠ.Α.. Η διαδικασία είναι ακίνδυνη τόσο για τη μητέρα όσο και για το νεογνό, αφού η λήψη του αίματος γίνεται μετά το τέλος του τοκετού.	Η συλλογή γίνεται στο χειρουργείο υπό γενική αναισθησία με αναρροφήσεις του μυελού από τα οστά της λεκάνης. Τη συλλογή κάνει ομάδα αιματολόγων μεταμοσχευτών ιατρών. Η διαδικασία διαρκεί περίπου μία έως δύο ώρες.
Μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από ΟΠ.Α. με βαθμό ιστοσυμβατότητας δότη-λήπτη περίπου 65-75%, γιατί το σύστημα των HLA αντιγόνων (Human Leucocyte Antigens) δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένο.	Για τη μεταμόσχευση μυελού των οστών πρέπει να υπάρχει πλήρη ιστοσυμβατότητα δότη-λήπτη (100%).
Χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης αντίδρασης μοσχεύματος κατά του ξενιστή (Graft-versus-Host Disease, GvHD) ³ .	Παρουσιάζει υψηλό κίνδυνο εμφάνισης αντίδρασης μοσχεύματος κατά του ξενιστή (Graft-versus-Host Disease, GvHD).
Μειωμένος κίνδυνος μετάδοσης ικών λοιμώξεων, όπως του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού της λοιμώδους μονοπυρήνωσης (EBV).	Υπάρχει κίνδυνος μετάδοσης λοιμώξεων.
Οι μονάδες ΟΠ.Α. μετά την επεξεργασία τους, μπορούν να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν σε τράπεζες αυτού του τύπου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Έτσι αποθηκεύεται μεγάλος όγκος μεταμοσχευτικών μονάδων.	Τα μοσχεύματα μυελού των οστών δεν αποθηκεύονται σε τράπεζες, γιατί έχουν μικρό χρόνο ζωής.
Μονάδες ΟΠ.Α. μπορούν να αποσταλούν κατεψυγμένες εύκολα σε μεταμοσχευτικά κέντρα και να αποψυχθούν εκεί για μεταμόσχευση σε ασθενείς.	Είναι δύσκολη η μεταφορά του μοσχεύματος και η διατήρησή του μέχρι τη μεταμόσχευση.
Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ΟΠ.Α. παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης.	Εμφανίζει μικρότερη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ΟΠ.Α..

³ Αντίδραση μοσχεύματος κατά του ξενιστή (Graft-versus-Host Disease, GvHD) είναι η πιο συχνή επιπλοκή μετά από οποιαδήποτε μεταμόσχευση, ακόμα και αν ο δότης είναι 100% συμβατός με τον λήπτη. Το γεγονός αυτό είναι συνέπεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των T και B κυττάρων από το αίμα του δότη και των ιστών του λήπτη (Apperley J., 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Οι τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος έχουν ως σκοπό τη συλλογή, επεξεργασία, κρυοσυντήρηση και διάθεση του ΟΠ.Α. σε μελλοντικούς λήπτες για μεταμόσχευση. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν και οργανισμοί που ελέγχουν τις τράπεζες ΟΠ.Α. και θεσπίζουν κανόνες για τη σωστή λειτουργία τους και την ασφαλή διακίνηση του αίματος στους ασθενείς. Το 1992 δημιουργείται η πρώτη δημόσια τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος στη Νέα Υόρκη των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (*Gluckman E., Broxmeyer Hal E., 1989*).

3.2. ΦΥΛΑΞΗ ΟΠ.Α. ΣΤΙΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΟΠ.Α..

Στις δημόσιες τράπεζες πραγματοποιείται δωρεά των μονάδων ΟΠ.Α. από τις οικογένειες με γραπτή συγκατάθεσή τους. Είναι πολύ σημαντικό η μητέρα να συναινέσει για να πραγματοποιηθούν ιολογικές εξετάσεις στο ΟΠ.Α., όπως είναι για τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), τον ιό της ηπατίτιδας Β (hepatitis B virus, HBV) και C (hepatitis C virus, HCV) και τον κυτταρομεγαλοϊό (Cytomegalovirus, CMV), καθώς επίσης και για τυποποίηση HLA (αντιγόνα ιστοσυμβατότητας) με σκοπό να ταυτοποιηθεί η σχέση μητέρας-νεογνού (*Rubistein, 2009*). Στη συνέχεια οι μονάδες επιλέγονται και μόνο αυτές που πληρούν αυστηρά κριτήρια ποιότητας, καταγράφονται και διατίθενται στην παγκόσμια δεξαμενή μονάδων ΟΠ.Α.. Τα στοιχεία τους είναι προσβάσιμα από αρμόδιους εθνικούς και παγκόσμιους οργανισμούς υγείας προς αναζήτηση κατάλληλης μονάδας για τον εκάστοτε ενδιαφερόμενο λήπτη (αλλογενή μεταμόσχευση). Παρόλα αυτά μία οικογένεια μπορεί να φυλάξει το ΟΠ.Α., μόνο εάν κάποιο άτομο από την οικογένεια χρήζει μεταμόσχευσης (γεγονός αποδεδειγμένο από θεραπεία ιατρό) και είναι συμβατό με το νεογνό (κατευθυνόμενη μεταμόσχευση).

Οι τράπεζες αυτού του τύπου ελέγχονται από τους διεθνείς οργανισμούς διαπίστευσης τραπεζών NetCord-FACT και διαχειρίζονται το αίμα βάσει των παγκόσμιων κανόνων που έχουν θεσπιστεί. Στις δημόσιες τράπεζες ΟΠ.Α. έχουν πρόσβαση όλοι οι άνθρωποι είτε έχουν κάνει δωρεά αίματος στο παρελθόν χωρίς να υπάρχει κάποια προτεραιότητα (*Merlin G. Butler & Jay E. Menitove, 2011*).

3.3. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗΣ ΤΡΑΠΕΖΩΝ

Ο διεθνής οργανισμός NetCord, είναι μία μη κερδοσκοπική ένωση τραπεζών που έχει στόχο: 1. την καλύτερη ποιότητα αίματος μέσω παγκόσμιων προτύπων και διαπίστευσης, 2. την εξισορρόπηση της παγκόσμιας προσφοράς και της ζήτησής του και 3. την ενθάρρυνση και διευκόλυνση της χρήσης ΟΠ.Α. για μεταμοσχεύσεις, με έμμεσο αποτέλεσμα να πραγματοποιηθούν εργαστηριακές και κλινικές μελέτες, γεγονός που θα παρέχει επαγγελματική και δημόσια εκπαίδευση. Ιδρύθηκε το 1997 και έχει σήμερα περίπου 35 τράπεζες-μέλη. Για να διασφαλιστεί η υψηλή και ομοιόμορφη ποιότητα όλων των μονάδων ΟΠ.Α. το NetCord ξεκίνησε μια συνεργασία το 1999 με το Ίδρυμα για τη Διαπίστευση Κυτταρικής Θεραπείας (FACT) στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Το 2000 δημοσίευσαν τα NetCord - FACT διεθνή πρότυπα για τη συλλογή, την επεξεργασία, τον έλεγχο και την αποθήκευση του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, καθώς επίσης και πρότυπα για την επιλογή του κατάλληλου μοσχεύματος-μονάδας ΟΠ.Α. και την διάθεσή του. Η συμμετοχή των τραπεζών στο πρόγραμμα διαπίστευσης είναι εθελοντική και βασίζεται στα παραπάνω πρότυπα (*«<http://www.netcord.org/>» access in 26/03/2014*).

3.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΧΩΡΟ

Σύμφωνα με στοιχεία του Εθνικού Οργανισμού Μεταμοσχεύσεων (EOM) στην Ελλάδα μεταμοσχεύθηκαν, από το 2007 έως το 2011, 50 μονάδες ΟΠ.Α., ενώ το ίδιο χρονικό διάστημα μεταμοσχεύθηκαν 42 μονάδες μυελού των οστών (*EOM*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΠ.Α.

Οι συλλογές ΟΠ.Α. πραγματοποιούνται με την ολοκλήρωση του τοκετού και πάντα έπειτα από ενημερωμένη συναίνεση της μητέρας. Για τη συλλογή, χρησιμοποιούνται ειδικοί ασκοί, οι οποίοι είναι αποστειρωμένοι για την ελαχιστοποίηση των μολύνσεων του αίματος από μικροοργανισμούς και παθογόνους παράγοντες που βρίσκονται στο αίμα της μητέρας.

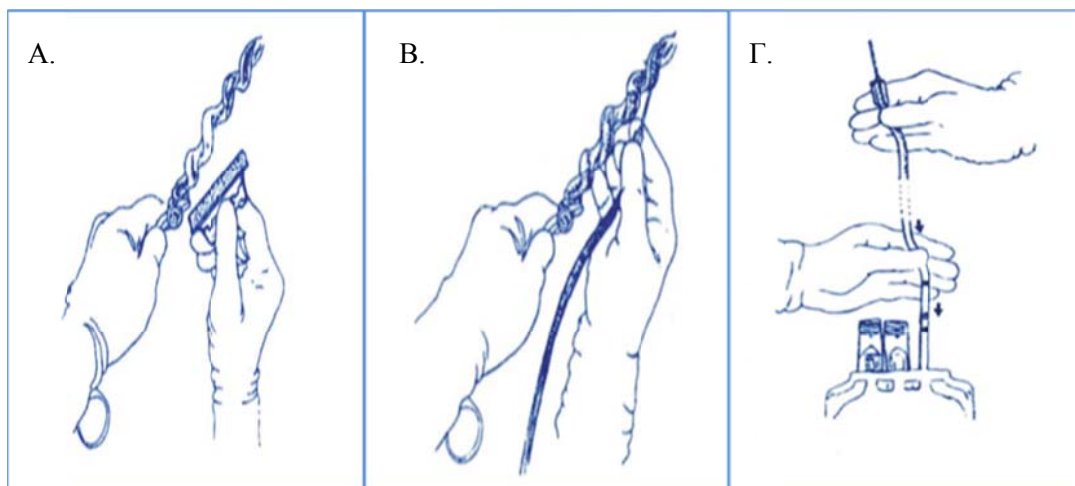
Υπάρχουν δύο τεχνικές για τη συλλογή ΟΠ.Α.:

- Η ενδομήτριος συλλογή (in utero) πραγματοποιείται στο δωμάτιο του τοκετού, αμέσως μετά τη γέννηση του νεογνού και ενώ ο πλακούντας βρίσκεται ακόμα μέσα στη μήτρα της γυναίκας.
- Η εξωμήτριος συλλογή (ex utero) δεν πραγματοποιείται στο δωμάτιο του τοκετού, αλλά σε διπλανό δωμάτιο του χειρουργείου, όπου μεταφέρεται ο πλακούντας με τον ομφάλιο λώρο.

Η συλλογή in utero πραγματοποιείται από εκπαιδευμένο προσωπικό, μαιές και μαιευτήρες, όσο ακόμα ο πλακούντας δεν έχει αποκολληθεί από τη μήτρα. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ο μεγάλος όγκος του αίματος που συλλέγεται. Αυτό ισχύει, γιατί η συλλογή πραγματοποιείται άμεσα, στην αίθουσα του τοκετού η οποία είναι αποστειρωμένη, ενώ παράλληλα οι συσπάσεις της μήτρας εξωθούν το ΟΠ.Α.. Βέβαια η μέθοδος αυτή δεν είναι πάντα εφικτή και υπάρχει περίπτωση να διαταράξει την κανονική διαδικασία του τοκετού (Εικόνα 3) (*Harris, 2008, Apperley J., 2008, Merlin G. Butler & Jay E. Menitove, 2011*).

Η συλλογή ex utero πραγματοποιείται μετά τη γέννηση του νεογνού και την αποκόλληση του πλακούντα από τη μήτρα. Για το λόγο αυτό η συλλογή δεν γίνεται στην αίθουσα του τοκετού, αλλά σε χώρο δίπλα σε αυτή. Η συλλογή γίνεται από εξουσιοδοτημένο προσωπικό και η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με την ενδομήτριο συλλογή. Η τεχνική αυτή είναι πιο εύκολη, αλλά ο όγκος του αίματος που συλλέγεται είναι συνήθως μικρός. Επίσης υπάρχει μεγάλη πιθανότητα

μολύνσεων, εφόσον η συλλογή πραγματοποιείται εκτός του αποστειρωμένου χώρου του τοκετού. Τέλος, η όλη διαδικασία πρέπει να πραγματοποιηθεί εντός 10 λεπτών περίπου, γιατί το αίμα στον πλακούντα πήζει πολύ γρήγορα από τη στιγμή που θα αποκολληθεί (*Apperley J., 2008*).



Εικόνα 3. Διαδικασία συλλογής ΟΠ.Α [Α: Ο μαιευτήρας τοποθετεί μια αιμοστατική λαβίδα στον ομφάλιο λώρο όσο πιο κοντά γίνεται στο νεογνό και αποστειρώνεται ο ομφάλιος λώρος με ιωδιούχο ποβιδίνη (Betadine). Β: Η βελόνα εισάγεται στο τμήμα του ομφάλιου λώρου, ενώ στην συνέχεια τοποθετείται ο ασκός συλλογής σε χαμηλότερη θέση από το σημείο παρακέντησης. Γ: Αφαίρεση της βελόνας όταν η ροή του αίματος σταματήσει.] (*Armson, 2005*).

4.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΟΠ.Α.

Κατά την επεξεργασία των μονάδων ΟΠ.Α. πραγματοποιείται απομάκρυνση ορισμένων συστατικών του αίματος (ερυθροκυττάρων και πλάσματος) και κατ' επέκταση ο όγκος των μονάδων μειώνεται. Με τον τρόπο αυτό, οι τράπεζες ΟΠ.Α. έχουν την δυνατότητα να αποθηκεύουν μεγάλο αριθμό μονάδων. Επίσης, με την επεξεργασία των μονάδων επιτυγχάνεται η δημιουργία ποιοτικών μοσχευμάτων, τα οποία είναι πιο αξιοποιήσιμα και αποτελεσματικά για την καταπολέμηση νόσων που χρήζουν μεταμόσχευσης.

4.2.1. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ

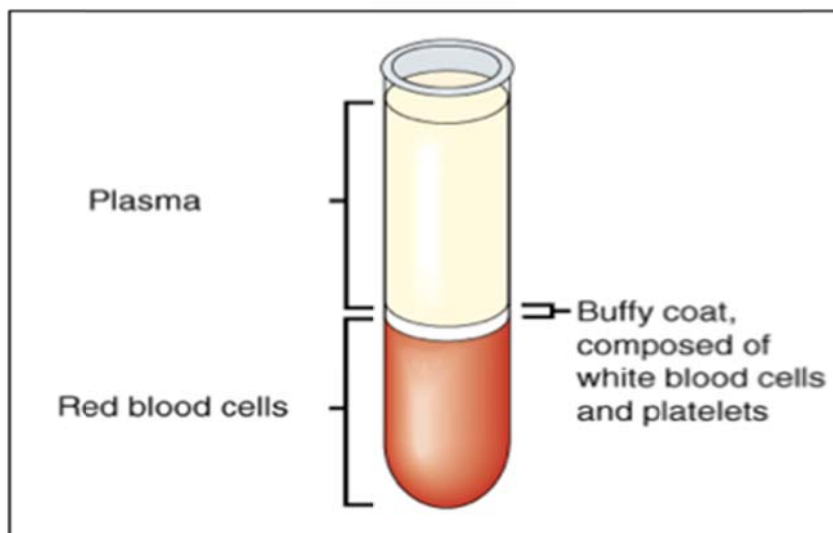
Το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας των μονάδων ΟΠ.Α. είναι η μείωση του αρχικού όγκου του αίματος, γεγονός που συμβάλει στην εξοικονόμηση χώρου κατά την αποθήκευσή τους. Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται διαχωρισμός και απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του πλάσματος από την μονάδα, ενώ παραμένουν τα εμπύρνηνα κύτταρα, τα οποία είναι απαραίτητα για πιθανή μελλοντική μεταμόσχευση. Είναι σημαντικό στην μονάδα να μην περιέχονται ερυθροκύτταρα για την αποφυγή ασυμβατότητας ABO και Rhesus μεταξύ δότη και λήπτη, που θα είχε αποτέλεσμα την απόρριψη του μοσχεύματος. Επίσης, η μείωση όγκου προσφέρει υψηλά ποσοστά ανάκτησης και βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την απόψυξη των μονάδων (*Harris, 2008*).

Η μείωση όγκου μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χειροκίνητες μεθόδους είτε με ημι-αυτοματοποιημένες, είτε με πλήρως αυτοματοποιημένες. Η πιο διαδεδομένη χειροκίνητη μέθοδος είναι η μέθοδος διπλής φυγοκέντρωσης, έπειτα από προσθήκη αμύλου του υδροξυαιθυλίου (Hydroxy ethyl starch, HES), ενώ η πιο γνωστή ημι-αυτόματη μέθοδος είναι η μέθοδος AXP (AutoXpress Platform, Thermogenesis) και η πλήρως αυτοματοποιημένη είναι η μέθοδος SEPAX (Biosafe). Όλες οι μέθοδοι καταλήγουν στη δημιουργία συμπυκνωμένου παραγώγου ΟΠ.Α., το οποίο περιέχει μονοπύρνηνα κύτταρα και ορισμένα εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα (*Harris, 2008, Solves Pilar, 2013*).

Για την χειροκίνητη μέθοδο, είναι απαραίτητη η προσθήκη αντιδραστηρίου HES στην μονάδα ΟΠ.Α.. Η χρήση του HES έχει ως σκοπό, την προσκόλλησή του στα ερυθρά αιμοσφαίρια, έτσι ώστε να ενισχύσει την καθίζησή τους. Σε αυτή τη μέθοδο είναι απαραίτητες δύο φυγοκεντρήσεις, όπου στην πρώτη πραγματοποιείται διαχωρισμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος (πλάσμα αναμεμειγμένο με εμπύρνηνα κύτταρα) και στη δεύτερη διαχωρίζεται το πλάσμα από τη στιβάδα των εμπύρνηνων κυττάρων (buffy coat) (Εικόνα 4). Η χειροκίνητη μέθοδος απαιτεί λεπτούς χειρισμούς για τον διαχωρισμό των στοιχείων του αίματος και πραγματοποιείται από εξειδικευμένο προσωπικό. Λόγω του ότι υπεισέρχεται ο ανθρώπινος παράγοντας, η ανάκτηση των επιθυμητών κυτταρικών πληθυσμών δεν είναι πάντα η βέλτιστη (*Fasouliotis J Sozos, 2000*).

Οι άλλες δύο μέθοδοι βασίζονται και αυτές στην ίδια αρχή, δηλαδή στον διαχωρισμό των στοιχείων του ΟΠ.Α. με κάποιας μορφή φυγοκέντρωση. Η διαφορά τους είναι, ότι το πλήρως αυτοματοποιημένο SEPAX ξεκινά και ολοκληρώνει τη

μείωση του όγκου ΟΠ.Α. εντελώς αυτόνομα, σε ένα στάδιο, ενώ η ημιαντόματη μέθοδος του AXP απαιτεί δύο φυγοκεντρήσεις, στο τέλος των οποίων διαχωρίζεται κυτταρικά συστατικά μέσα στους θαλάμους του (Εικόνες 5 και 6). Η μέθοδος AXP δεν απαιτεί χρήση αντιδραστηρίου HES. Το buffy coat, το πλάσμα και τα ερυθρά αιμοσφαίρια διανέμονται στα διαμερίσματα ενός ειδικού συστήματος ασκών κλειστού τύπου έπειτα από τις δύο φυγοκεντρήσεις. Η κατανομή του αίματος στα διαμερίσματα του συστήματος ασκών είναι αυτοματοποιημένη και ο έλεγχος της ροής του αίματος πραγματοποιείται με τη βοήθεια αισθητήρων (Solves, 2012).



Εικόνα 4. Διαχωρισμός στοιχείων του αίματος σε τρεις στιβάδες: του πλάσματος, του buffy coat (εμπύρηνα κύτταρα και λίγα αιμοπετάλια) και των ερυθρών αιμοσφαιρίων).



Εικόνα 5. Συσκευή AXP (Ανατύπωση από AXP AutoXpress System Training Guide, Thermogenesis).



Εικόνα 6. Συσκευή Sepax (Ανατύπωση από <http://stemlife1.blogspot.gr/2008/03/viacell-chose-sepax.html>, access in 29/03/2013).

4.2.2. ΚΡΥΟΚΑΤΑΨΥΞΗ

Μετά τη μείωση όγκου της μονάδας ΟΠ.Α. ακολουθεί η κατάψυξη του buffy coat. Η διαδικασία αυτή, έχει ως σκοπό την αποθήκευση της μονάδας για μελλοντική χρήση, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές επιπτώσεις στον αριθμό των κυτταρικών πληθυσμών που περιέχονται σε αυτή, καθώς επίσης και της βιωσιμότητάς τους. Για την κατάψυξη της μονάδας είναι απαραίτητη η προσθήκη κρυοπροστατευτικού διαλύματος. Το πιο διαδεδομένο κρυοπροστατευτικό διάλυμα είναι το DMSO (Dimethylsulfoxide, Διμεθυλοσουλφοξείδιο), το οποίο έχει την ιδιότητα να διαπερνά γρήγορα την κυτταρική μεμβράνη και να προστατεύει τα κύτταρα από τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, στις οποίες θα καταψυχθούν. Παρ' όλα αυτά το DMSO είναι τοξικό σε θερμοκρασία δωματίου και για το λόγο αυτό η διαδικασία έγχυσης του στη μονάδα ΟΠ.Α. πρέπει να είναι ταχεία και να πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία (περίπου 4 °C). Εώς τώρα μελέτες πιστοποιούν ότι οι μονάδες ΟΠ.Α. μπορούν να αποθηκευτούν σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες για περίπου εικοσιπέντε χρόνια (*Harris, 2012, Duchez Pascale, 2013, Regan, 2010*).

4.2.3. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο ποιοτικός έλεγχος των μονάδων ΟΠ.Α περιλαμβάνει τις διαδικασίες που πραγματοποιούνται στα δείγματα που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της μείωσης όγκου του ΟΠ.Α. και της κρυοκατάψυξης, καθώς και στα δείγματα αίματος της μητέρας. Σκοπός του, είναι η παραγωγή ποιοτικού τελικού προϊόντος (buffy coat), το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί μελλοντικά ως μόσχευμα για κλινική χρήση. Οι διαδικασίες αυτές είναι οι εξής (*Navarrete and Contreras, 2009*):

- I. Τυποποίηση των HLA αντιγόνων νεογνού-δότη και μητέρας νεογνού.
- II. Αιματολογικός έλεγχος.
- III. Μικροβιολογικός έλεγχος.
- IV. Ορολογικός έλεγχος νοσημάτων.
- V. Έλεγχος δυναμικότητας κυττάρων (Colony Forming Unit, CFU).
- VI. Μέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών.

I. Τυποποίηση των HLA αντιγόνων

Η τυποποίηση των HLA-αντιγόνων του ΟΠ.Α. αποτελεί ίσως την πιο σημαντική παράμετρο του ποιοτικού ελέγχου και τα αποτελέσματά της είναι καθοριστικά για την επιλογή της μονάδας ΟΠ.Α. για μεταμόσχευση, αλλά και για την έκβασή αυτής. Σύμφωνα με μελέτες για την επιτυχή μεταμόσχευση ΟΠ.Α. πρέπει να υπάρχει συμβατότητα λήπτη και δότη τουλάχιστον σε 4 από τους 6 βασικούς επιτόπους HLA. Συγκεκριμένα, έχουν ιδιαίτερη σημασία τα HLA-A και HLA-B αντιγόνα της τάξης I και το HLA-DRB1 της τάξης II. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση είναι δύο: η χαμηλής ανάλυσης (low resolution) μέθοδος SSO⁴ (Sequence-Specific Oligonucleotide) και η υψηλής ή χαμηλής ανάλυσης (high or low resolution) μέθοδος SSP⁵ (Sequence-Specific Primer) (Dunckley H., 2012, Picardi and Arcese, 2010, Spellman R. Stephen, 2012).

II. Αιματολογικός έλεγχος

Ο αιματολογικός έλεγχος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των ομάδων αίματος του συστήματος ABO και Rhesus και έλεγχο για τυχόν αιμοσφαιρινοπάθειες.

Ο προσδιορισμός της ομάδας αίματος σύμφωνα με το σύστημα ABO και Rhesus είναι απαραίτητος, αφού αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την επιλογή του κατάλληλου μοσχεύματος. Είναι σημαντικό ο λήπτης να είναι συμβατός με την ομάδα αίματος της μονάδας ΟΠ.Α. με την οποία πρόκειται να μεταμοσχευθεί, για την πιο εύκολη και πετυχημένη εμφύτευση του μοσχεύματος. Αντίθετα, σε περίπτωση ασυμβατότητας δότη και λήπτη, υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης χρόνιας αιμόλυσης (Picardi and Arcese, 2010).

Ο έλεγχος των αιμοσφαιρινοπαθειών χρησιμεύει στην αποφυγή μετάδοσης παθολογικών αιμοσφαιρινών με τη μεταμόσχευση των μονάδων. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι γενετικές ανωμαλίες στη δομή των αλυσίδων της σφαιρίνης που δομούν το μόριο της αιμοσφαιρίνης. Οι αιμοσφαιρίνες που ελέγχονται είναι οι A, A2, S, C, F και H. Στην εμβρυϊκή φάση και αλλά και μετά τη

⁴ Η μέθοδος SSO πραγματοποιείται κατά βάση για τυποποίηση κάθε μονάδας ΟΠ.Α. σε επίπεδο αλληλίου (Nunes, 2011).

⁵ Η μέθοδος SSP πραγματοποιείται για τυποποίηση ομάδων γονιδίων είτε για τυποποίηση σε γονιδιακό επίπεδο στην περίπτωση που μία μονάδα ΟΠ.Α. ζητηθεί για μεταμόσχευση (Nune, 2011).

γέννηση του νεογνού οι αιμοσφαιρίνες που επικρατούν στο αίμα του είναι η HbF σε μεγάλη ποσότητα και η HbA, ενώ η HbA2 εμφανίζεται σε μηδαμινό ποσοστό, καθώς σε αυτή τη φάση αρχίζει να συντίθεται. Όσες μονάδες ΟΠ.Α. είναι ομόζυγες ή ετερόζυγες ως προς τη δρεπανοκυτταρική αναιμία ή τη θαλασσαιμία, μπορεί να κριθούν ακατάλληλες για κλινική χρήση (*Fey P. L. Van der DIJs, 1992*).

III. Μικροβιολογικός έλεγχος

Ο μικροβιολογικός έλεγχος περιλαμβάνει αερόβιες και αναερόβιες αιμοκαλλιέργειες για την ανίχνευση βακτηριακών και μυκητιακών παραγόντων. Σε περίπτωση εμφάνισης θετικών αποτελεσμάτων, πραγματοποιούνται περαιτέρω έλεγχοι για την εξακρίβωση του μικροοργανισμού που προκάλεσε τη μόλυνση και η μονάδα απορρίπτεται (*Rubistein, 2009*).

IV. Ορολογικός έλεγχος νοσημάτων

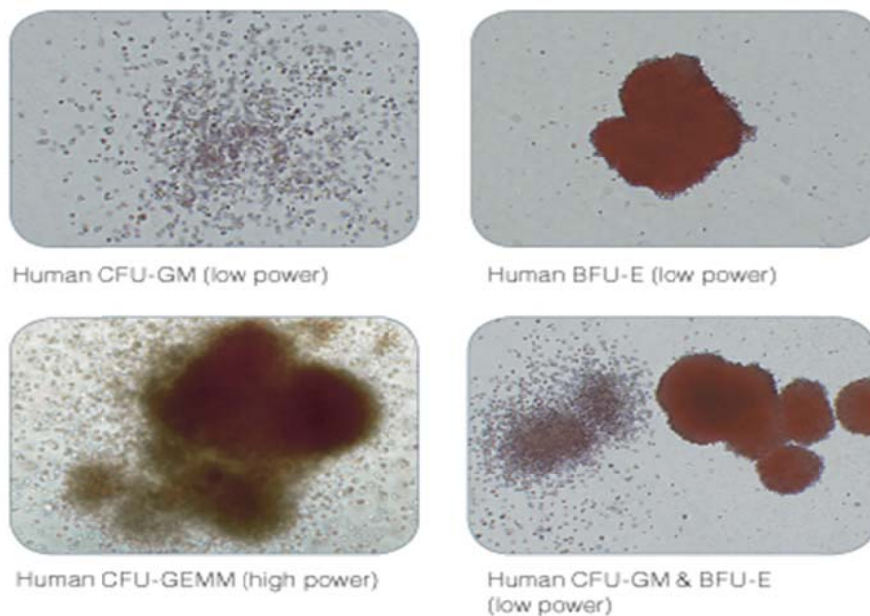
Ο ιολογικός έλεγχος αφορά τις εξής μολυσματικές ασθένειες (*Picardi and Arcese, 2010, Rubistein, 2009*):

- Τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), τύπου 1 και 2.
- Τον ιό της ηπατίτιδας Β (Hepatitis B Virus) και C (Hepatitis C Virus).
- Τον ανθρώπινο λεμφοτρόπο ιό Τ-κυττάρων τύπου 1 και 2 (Human T-cell Lymphotropic Virus, HTLV1-2).
- Τον κυτταρομεγαλοϊό (Cytomegalovirus, CMV).
- Τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου Chagas (*Trypanosoma cruzi*).
- Τον ιό του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus).
- Τη σύφιλη (*Treponema pallidum*).

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

Ο έλεγχος δυναμικότητας πραγματοποιείται για την ταυτοποίηση και καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών, έτσι ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησής τους σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς. Οι

αποικίες που αναγνωρίζονται στη δοκιμασία CFU είναι οι: : BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid, μονοδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ερυθρά σειρά), CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte, ωριμότερο διδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη και τη μονοκυτταρική σειρά), CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Monocyte, Megakaryocyte, πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη, ερυθρά, μονοκυτταρική και μεγακαρυωτική σειρά) (Εικόνα 7) (Adami, 2005, Page, 2011).



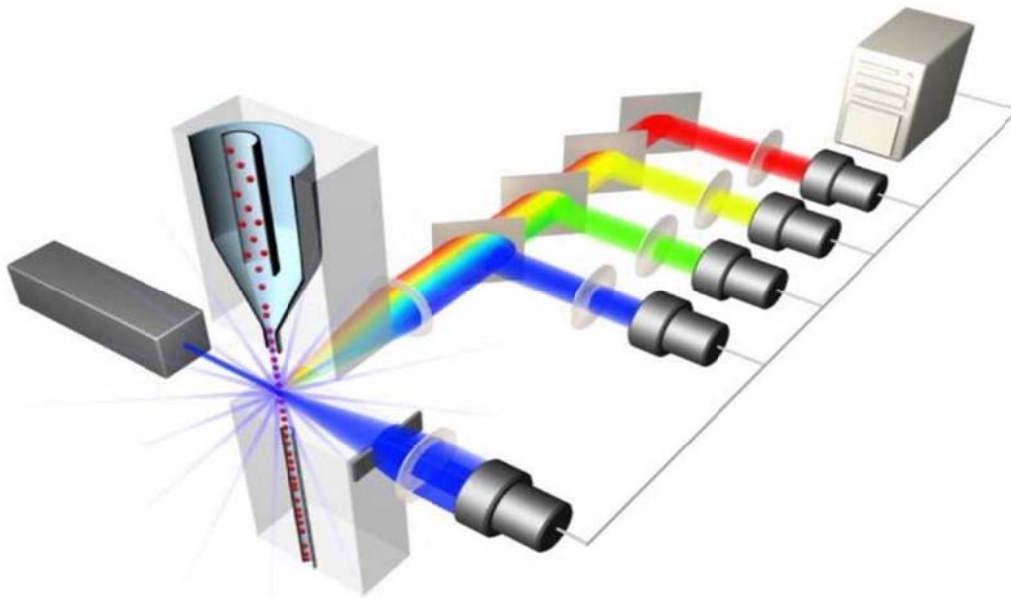
Εικόνα 7. Παραδείγματα αποικιών BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid, κύτταρα της ερυθράς σειράς), CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte, ωριμότερο διδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη και τη μονοκυτταρική σειρά), CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Monocyte, Megakaryocyte, πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, δεσμευμένο για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη, ερυθρά, μονοκυτταρική και μεγακαρυωτική σειρά) (ανατύπωση από «<http://www.stemcell.com/en/Services/Contract-Services.aspx>» access in 28/03/2014).

VI. Μέτρηση κυττάρων μονάδας ΟΠ.Α.

Ο αριθμός των εμπύρηνων κυττάρων στο τέλος της επεξεργασίας της μονάδας ΟΠ.Α. είναι πολύ σημαντικός, γιατί καθορίζει αν η μονάδα θα καταψυχθεί. Εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι το ποσοστό ανάκτησης των κυττάρων αυτών, δηλαδή ο λόγος των εμπύρηνων κυττάρων μετά τη μείωση όγκου προς τα εμπύρηνια ερυθρά πριν τη μείωση. Η μέτρηση των κυττάρων ΟΠ.Α. πραγματοποιείται σε δύο στάδια: στον αιματολογικό αναλυτή και με κυτταρομετρία ροής.

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που παρέχει ταχεία ανάλυση πολλαπλών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων (μέγεθος, κοκκίωση, αριθμός πυρήνων κ.α.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει ακτίνα laser (Εικόνα 8). Οι πληροφορίες που λαμβάνονται είναι ποιοτικές και ποσοτικές. Στην κυτταρομετρία ροής το δείγμα μπορεί να είναι αίμα, ΟΠ.Α., μυελός των οστών ή ιστός υπό μορφή εναιωρήματος, ακόμη και σε μικρή ποσότητα.

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή χρωστικές που είναι κατάλληλες ως προς τις παραμέτρους που θα μετρηθούν. Τα επισημασμένα κύτταρα περνούν από μία πηγή φωτός, όπου τα φθορίζοντα μόρια διεγείρονται σε μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Όταν τα μόρια επανέλθουν σε κατάσταση ηρεμίας, οι φθορίζουσες ουσίες ή χρωστικές εκπέμπουν φωτεινή ενέργεια σε υψηλότερα μήκη κύματος. Συνήθως χρησιμοποιούνται χρωστικές που περιλαμβάνουν ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI), φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin, PE) και φλουορεσκεΐνη ισοθειοκυανική (Fluorescein isothiocyanate, FITC). Τα δεδομένα αποτυπώνονται σε διαγράμματα στιγμών και διαχωρίζονται διαδοχικά με βάση την ένταση του φθορισμού δημιουργώντας μια σειρά υποσυνόλων που ονομάζονται «πύλες» (gates) (Wilkerson, 2012, Brown M., 2000).



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση κυτταρομέτρου (Ανάλυση μεμονομένων κυττάρων καθώς διέρχονται σε νηματική ροή απο ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτουν ακτίνες laser, με διαφορετικά μκη κύματος. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται σε διαγράμματα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή) (<http://regmed.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html>» access in 28/03/2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΠ.Α.

Παρ' όλα τα πλεονεκτήματα του ΟΠ.Α. σε σχέση με τη χρήση του μυελού των οστών, υπάρχουν παράγοντες που ορισμένες φορές δυσχεραίνουν τη χρήση τους στον τομέα της μεταμόσχευσης και είναι πολύ σημαντικό να επιλυθούν. Ο κύριος προβληματισμός που επικρατεί αφορά το χαμηλό αριθμό αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την καθυστερημένη εγκατάστασή τους στον ασθενή, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία της μεταμόσχευσης. Για το λόγο αυτό οι τράπεζες ΟΠ.Α. αποθηκεύουν μονάδες οι οποίες περιέχουν $12,5 \times 10^8$ εμπύρηνια κύτταρα (total nucleated cells, TNCs) ή περισσότερα. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, επιλέγονται για επεξεργασία μονάδες υψηλού όγκου συλλογής και με μεγάλο αρχικό αριθμό κυττάρων, ώστε συνυπολογίζοντας τις απώλειες κυττάρων κατά την επεξεργασία, να επιτυγχάνεται ο επιθυμητός στόχος. Το γεγονός αυτό έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την απόρριψη περίπου του 62 % των μονάδων ΟΠ.Α. που δωρίζονται στις τράπεζες, γεγονός που τις επιβαρύνει οικονομικά (*Rubinstein, 2009*). Προκειμένου, αφενός να μειωθεί το οικονομικό κόστος, αφετέρου δε να αυξηθεί ο διαθέσιμος αριθμός μονάδων ΟΠ.Α., γίνονται στοχευμένες προσπάθειες για την αξιοποίηση των μονάδων με χαμηλότερο αρχικό αριθμό κυττάρων.

Η *ex vivo* έκπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων, παρόλο που φαίνεται να είναι εφικτή, βρίσκεται ακόμα σε αρχικά στάδια μελέτης και η εφαρμογή της σε κλινικό επίπεδο θα καθυστερήσει. Για το λόγο αυτό, πολλές τράπεζες ΟΠ.Α. εστιάζουν τις προσπάθειές τους στη βελτίωση των μεθόδων επεξεργασίας. Αυξάνοντας την ανάκτηση των κυττάρων (και κατά συνέπεια μειώνοντας τις απώλειες) οι τράπεζες ΟΠ.Α. θα έχουν τη δυνατότητα να επεξεργάζονται μονάδες με μικρότερο αρχικό όγκο και μικρότερη περιεκτικότητα κυττάρων, καταλήγοντας ωστόσο στο ίδιο επιθυμητό τελικό αποτέλεσμα, τη δημιουργία μονάδας ΟΠ.Α. υψηλής ποιότητας.

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

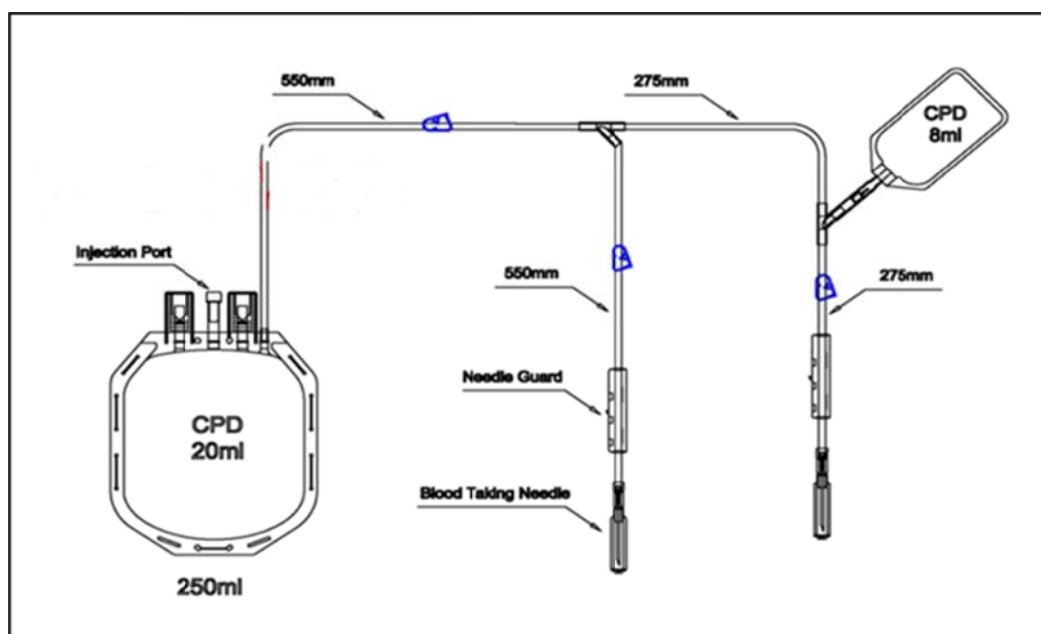
Για τη μεταμόσχευση μιας μονάδας ΟΠ.Α. είναι πολύ σημαντικός ο αριθμός, η βιωσιμότητα και η ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν ο συγκριτικός ποιοτικός έλεγχος δύο μεθόδων επεξεργασίας των μονάδων ΟΠ.Α.: της χειροκίνητης μεθόδου διπλής φυγοκέντρωσης μετά από προσθήκη αμύλου του υδροξυαιθυλίου (HES) και της ημι-αυτόματης μεθόδου AXP (AutoXpress Platform). Οι μονάδες καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο (σε θερμοκρασία -196°C) και αποψύχθηκαν σε χρονικό διάστημα 3 μηνών. Πριν και μετά τη μείωση όγκου της μονάδας ΟΠ.Α., με οποιαδήποτε από τις δύο προαναφερθείσες μεθόδους, καθώς και πριν και μετά την απόψυξη των κρυοσυντηρημένων - για διάστημα 3 μηνών - μονάδων, πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού, της βιωσιμότητας και της δυναμικότητας των κυτταρικών πληθυσμών. Αυτοί οι κυτταρικοί πληθυσμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή της μονάδας ΟΠ.Α. για μεταμόσχευση, αλλά και για την έκβασή αυτής.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΤΡΑΠΕΖΑ.

ΥΛΙΚΑ

- Ισοθερμική τσάντα.
- Ασκός συλλογής που περιέχει 12 ml αντιπηκτικό CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose), Tianhe Pharmaceutical (Εικόνα 9).
- 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.



Εικόνα 9. Ασκός συλλογής ΟΠ.Α. με αντιπηκτικό (ανατίπωση από «www.pall.com», access in 28/03/2014).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Οι υποψήφιοι γονείς και πιο συγκεκριμένα οι μητέρες που επιθυμούν τη δωρεά ΟΠ.Α., προσέρχονται στο χώρο της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.) όπου ενημερώνονται σχετικά με όλες τις διαδικασίες. Αφού κριθούν κατάλληλες για τη δωρεά, έπειτα από τη διαδικασία της συνέντευξης από το αρμόδιο προσωπικό, προμηθεύονται μία ειδική ισοθερμική τσάντα (IT). Η ισοθερμική τσάντα περιέχει τον ασκό συλλογής, ένα φιαλίδιο Falcon μέσα στον οποίο τοποθετείται ο ομφάλιος λώρος, ένα φιαλίδιο γενικής αίματος και δύο φιαλίδια πηγμάτων μέσα σε ειδικά πλαστικά σακουλάκια βιολογικού κινδύνου, το θερμομετρητή (Datalogger) και το έντυπο υλικό, στο οποίο περιλαμβάνεται η συναίνεση της μητέρας για τη δωρεά, το ιατρικό ιστορικό των γονέων, έντυπα με τις λεπτομέρειες σχετικά με τον τοκετό, που συμπληρώνονται από το μαιευτήρα καθώς και εκπαιδευτικό υλικό για τη συλλογή του ΟΠ.Α., που προορίζεται για το μαιευτήρα. Όταν πραγματοποιηθεί ο τοκετός και συλλεχθεί το βιολογικό υλικό, τοποθετείται στην IT η οποία πρέπει να επιστραφεί στην τράπεζα εντός 24 ωρών. Το βάρος του ασκού με το ΟΠ.Α. που συλλέχθηκε και προορίζεται για μη συγγενική αλλογενή μεταμόσχευση πρέπει να είναι 120-220 gr ώστε να επεξεργαστεί περαιτέρω στο εργαστήριο της τράπεζας.

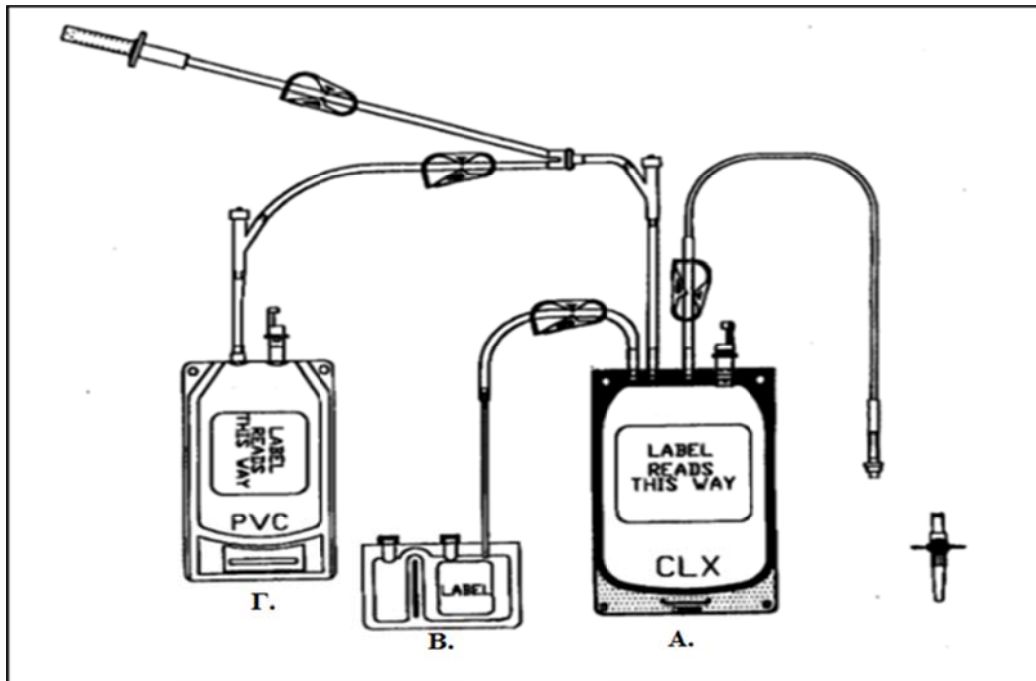
Όταν ο ασκός παραληφθεί από το προσωπικό του εργαστηρίου επεξεργασίας, λαμβάνονται τα εξής δείγματα: 0,5 ml μεταφέρεται σε φιαλίδιο snap-cap για τη μέτρηση των κυττάρων στον αιματολογικό αναλυτή και το κυτταρόμετρο και 2,5 ml σε φιαλίδιο γενικής αίματος για τυποποίηση των HLA-αντιγόνων του δότη.

2. ΜΕΙΩΣΗ ΟΓΚΟΥ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α. ΜΕ ΤΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΠΛΗΣ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥΑΙΘΥΛΙΟΥ Ή ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΙΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΧΡ ΚΑΙ ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

I. ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΠΛΗΣ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ.

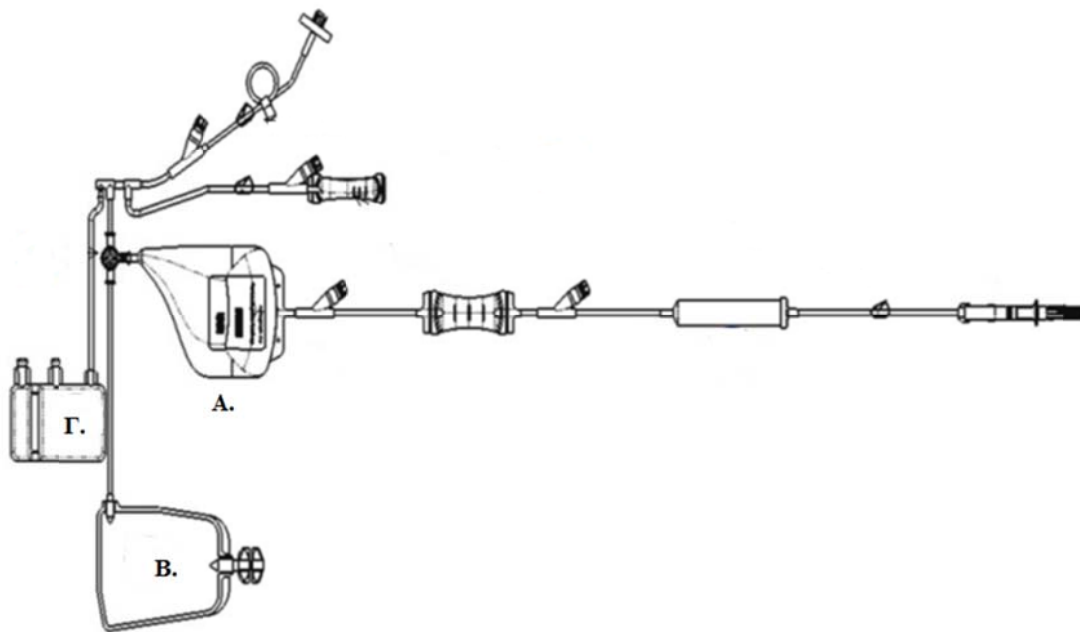
- Αντιδραστήριο Hydroxy Ethyl Starch (άμυλο του υδροξυαιθυλίου) (HETASTARCH, HES, 6 % w/v, Cooper S.A.).
- Σύστημα ασκών επεξεργασίας (stem cell processing kit), Pall Medical Corporation (Εικόνα 10).
- Φυγόκεντρος (Centrifuge CellSep), 6/720R, Sanyo.
- Εξαγωγέας πλάσματος (Plasma extractor), Fenwal Laboratories.
- Αυτόματος εξαγωγέας (Auto-Volume Expressor Operator Manual), Thermogenesis.
- Συσκευή πλήρους απομόνωσης (Total Containment Device, TCD-B40), Denco.
- Ειδικές λεπίδες για τη λειτουργία της συσκευής πλήρους απομόνωσης, Denco.
- Θερμοσυγκολλητής (Rapid Seal Tube Sealer), Genesis.
- Θάλαμος νηματικής ροής (Labguard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet), Nuair.
- 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.
- Φιαλίδια snap-cap, 5 ml, Greiner.



Εικόνα 10. Σύστημα ασκών επεξεργασίας μονάδας ΟΠ.Α (Α. ασκός επεξεργασίας, Β. ασκός κρυοκατάψυξης buffy coat, Γ. ασκός πλάσματος) (ανατύπωση από «www.pall.com», access in 28/03/2014).

II. ΗΜΙΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟΣ AXP (AUTO XPRESS PLATFORM).

- Σύστημα ασκών επεξεργασίας (processing bag set), AutoXpress System, thermogenesis (Εικόνα 11).
- Συσκευή AutoXpress Platform, Thermogenesis.
- Φυγόκεντρος Thermo Scientific.
- Συσκευή πλήρους απομόνωσης (Total Containment Device, TCD-B40), Denco.
- Ειδικές λεπίδες για τη λειτουργία της συσκευής πλήρους απομόνωσης, Denco.
- Θερμοσυγκολλητής (Rapid Seal Tube Sealer), Genesis.
- Θάλαμος νηματικής ροής (Labguard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet), Nuair.
- Φιαλίδιο γενικής αίματος, 4 ml, που περιέχει EDTA, Becton Dickinson.
- Φιαλίδια snap-cap, 5 ml, Greiner.
- Φιαλίδιο Falcon, 15 ml, Greiner.
- Σύριγγες, 5 ml, Becton Dickinson.



Εικόνα 11. Σύστημα ασκών επεξεργασίας AXP (ανατύπωση από *AXP AutoXpress System Training Guide, Thermogenesis*).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

I. ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μείωση όγκου μιας μονάδας ΟΠ.Α. πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο επεξεργασίας που εισήγαγε ο Pablo Rubistein (*Rubistein P., 1995*). Στο θάλαμο νηματικής ροής στα ειδικά δωμάτια GMP δωμάτιο C, πραγματοποιείται έγχυση αντιδραστηρίου Hydroxyl Ethyl Starch (εφεξής θα αναφέρεται ως HES) στον ασκό συλλογής ΟΠ.Α.. Ο όγκος του HES, που θα προστεθεί στη μονάδα, αντιστοιχεί στο 20 % του καθαρού όγκου του συλλεχθέντος ΟΠ.Α., μετά από την πρώτη λήψη δειγμάτων. Στη συνέχεια γίνεται σύνδεση του ασκού συλλογής ΟΠ.Α. με το σύστημα ασκών επεξεργασίας μέσω της συσκευής πλήρους απομόνωσης. Έπειτα, ο ασκός φυγοκεντρείται στις 420 rpm (revolutions per minute) για 7 λεπτά, στους 10 °C. Μετά το τέλος της πρώτης φυγοκέντρωσης, στον ασκό σχηματίζονται δύο στιβάδες: α. αυτή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, στο κάτω μέρος του ασκού και β. του πλάσματος αναμεμιγμένη με τα εμπύρηννα κύτταρα και τα αιμοπετάλια (buffy coat). Πραγματοποιείται απομάκρυνση του πλάσματος από τον ασκό επεξεργασίας,

με τη χρήση του χειροκίνητου εξαγωγέα πλάσματος. Οι δύο ασκοί διαχωρίζονται και ο ασκός επεξεργασίας φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 10 λεπτά, στους 10 °C. Στο τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης έχει διαχωριστεί το πλάσμα από το buffy coat. Το πλάσμα απομακρύνεται προς τον ασκό του πλάσματος με τη χρήση του αυτόματου εξαγωγέα, ενώ το buffy coat παραμένει στον ασκό επεξεργασίας. Οι δύο ασκοί διαχωρίζονται.

Από τον ασκό συλλογής, στον οποίο περιέχονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια της μονάδας ΟΠ.Α. στο τέλος της πρώτης φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια, λαμβάνονται τα εξής δείγματα:

- Από τον ασκό συλλογής στον οποίο πλέον περιέχονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια: 0,5 ml σε φιαλίδιο snap-cap, για μέτρηση των κυττάρων στον αιματολογικό αναλυτή, 0,5 ml σε φιαλίδιο snap-cap, για τον προσδιορισμό των ομάδων αίματος και 4 ml σε φιαλίδιο γενικής αίματος, για τον έλεγχο των αιμοσφαιρινοπαθειών.
- Από τον ασκό του buffy coat: 0,5 ml σε φιαλίδιο snap-cap, για μέτρηση των κυττάρων στον αιματολογικό αναλυτή και στο κυτταρόμετρο και 0,5 ml σε φιαλίδιο Falcon 15 ml, για καλλιέργεια CFU.

II. ΗΜΙΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟΣ AXP (AUTO XPRESS PLATFORM).

Στο θάλαμο νηματικής ροής συνδέεται ο ασκός συλλογής του ΟΠ.Α. με το σύστημα ασκών επεξεργασίας AutoXpress System μέσω της συσκευής πλήρους απομόνωσης και μεταφέρεται όλη η ποσότητα ΟΠ.Α. σε αυτό. Στη συνέχεια, ο ασκός επεξεργασίας τοποθετείται στη συσκευή AutoXpress Platform και φυγοκεντρείται δύο συνεχόμενες φορές. Η πρώτη φυγοκέντρωση, υψηλής ταχύτητας (high speed spin, HSS), πραγματοποιείται στις 1400 rcf (relative centrifugal force) για 20 λεπτά, στους 10°C και η δεύτερη φυγοκέντρωση, χαμηλής ταχύτητας (low speed spin, LSS), πραγματοποιείται στις 80 rcf για 10 λεπτά, στους 10 °C. Μετά το τέλος των φυγοκεντρήσεων, τα συστατικά του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, πλάσμα και buffy coat) έχουν κατανεμηθεί στους αντίστοιχους ασκούς. Το σύστημα ασκών απομακρύνεται από τη συσκευή AXP, η οποία τοποθετείται στη βάση σύνδεσης και μεταφέρει τα δεδομένα των φυγοκεντρήσεων στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η λήψη των δεύτερων δειγμάτων, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία και λαμβάνοντας τις ίδιες ποσότητες από τους αντίστοιχους ασκούς, όπως περιγράφεται στην χειροκίνητη μέθοδο (2., I).

3. ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- Κρυοσυντηρητικό διάλυμα περιεκτικότητας 55 % DMSO.
- Αντλία ελεγχόμενης έγχυσης (syringe pumps), SEP-10S.
- Συσκευή ανάδευσης (Balance Weight Shaker), Delmac Instruments DS302 F12.
- Θάλαμος νηματικής ροής (Labguard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet), Nuair.
- Πλαστικό κάλυμμα προστασίας ασκού κρυοκατάψυξης (Overwrap Pouch), Origen Biomedical.
- Ειδική μεταλλική κασετίνα, Thermogenesis.
- Θερμοσυγκολλητής (Rapid Seal Tube Sealer), Genesis.
- Κλασματικός καταψύκτης (Computer controlled rate freezer connected to liquid nitrogen supply tank), Ice cube Series 1800, Sylab.
- Σύριγγες 5 και 10 ml, Becton Dickinson.
- Κρυοσωληνάριο (cryovial), χωρητικότητας 1,8ml.
- Φιαλίδια για αερόβιο και αναερόβιο έλεγχο, Bactec, Becton Dickinson.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Η έγχυση του κρυοσυντηρητικού στη μονάδα ΟΠ.Α. πραγματοποιείται στο θάλαμο νηματικής ροής. Η ποσότητα του κρυοσυντηρητικού που προστίθεται είναι ανάλογη του όγκου της μονάδας, και συγκεκριμένα το 25 % αυτού. Η έγχυση πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλίας ελεγχόμενης έγχυσης, η οποία εγχύει το κρυοσυντηρητικό στον ασκό του buffy coat με σταθερό ρυθμό 20 ml/ώρα. Ταυτόχρονα, ο ασκός του buffy coat αναδεύεται, ώστε να κατανεμηθεί ισόποσα το κρυοσυντηρητικό σε όλο τον όγκο του, ενώ διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία,

τοποθετημένος ανάμεσα σε παγοκύστες (8 °C). Στη χειροκίνητη μέθοδο μετά την προσθήκη του DMSO στο buffy coat, το οποίο μέχρι στιγμής βρίσκεται στον ασκό επεξεργασίας, γίνεται μεταφορά στον ασκό κρυοκατάψυξης με τη βοήθεια της βαρύτητας και ειδικών χειρισμών. Στη μέθοδο AXP το DMSO εγχύεται απευθείας στον ασκό κρυοκατάψυξης. Είναι σημαντικό και στις δύο μεθόδους να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες αέρα, γιατί δημιουργούν πρόβλημα στην ποιότητα του κρυοσητηρημένου υλικού. Μετά την ολοκλήρωση της έγχυσης λαμβάνονται τα εξής δείγματα από το τελικό προϊόν: 0,5 ml, το οποίο τοποθετείται σε κρυοσωληνάριο και θα χρησιμεύσει σαν δείγμα ποιοτικού ελέγχου (QC) και από 0,5 ml, τα οποία τοποθετούνται σε φιαλίδια Bactec για αερόβιο και αναερόβιο μικροβιακό έλεγχο.

Στη συνέχεια, διαχωρίζονται τρία τμήματα (segments) πάνω στο στέλεχος του ασκού κρυοκατάψυξης με τη βοήθεια θερμοσυγκολλητή (Εικόνα 12). Ο ασκός τοποθετείται στο προστατευτικό πλαστικό κάλυμμα και έπειτα στην ειδική μεταλλική κασετίνα. Η κασετίνα τοποθετείται στον κλασματικό καταψύκτη και παραμένει εκεί για 72 λεπτά, κατά τα οποία: ο καταψύκτης ελαττώνει τη θερμοκρασία κατά 1 °C/λεπτό ως τους -50 °C και κατά 5 °C/λεπτό ως τους -100 °C, με διοχέτευση υγρού αζώτου. Τέλος, η μονάδα ΟΠ.Α. που βρίσκεται μέσα στη μεταλλική κασετίνα καθώς μεταφέρεται σε ειδική μεταλλική θήκη στη δεξαμενή του υγρού αζώτου (-196 °C).

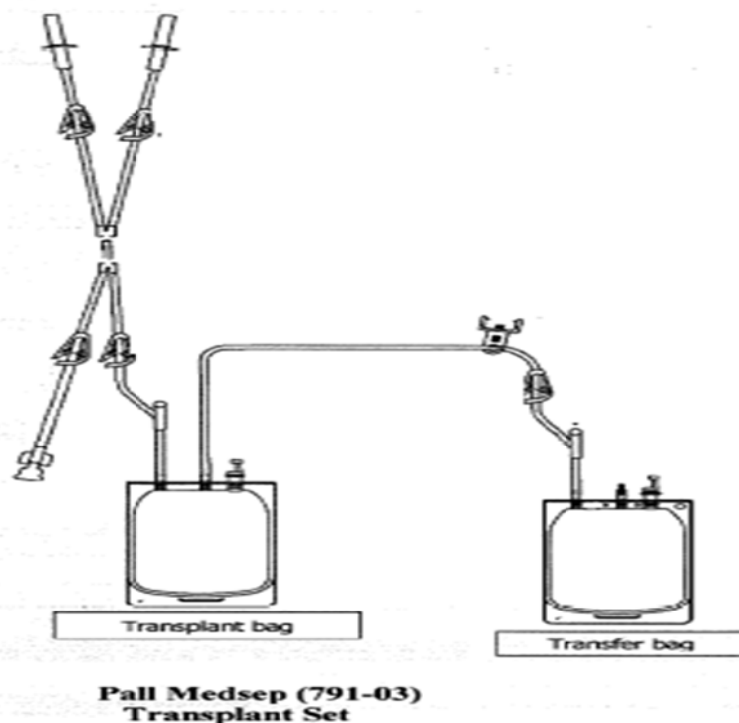


Εικόνα 12. Ασκός κρυοκατάψυξης μονάδας ΟΠ.Α. και segments (Ανατύπωση από *AXP AutoXpress System Training Guide, Thermogenesis*).

4. ΑΠΟΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΑΣ ΟΠ.Α.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- Ανθρώπινη αλβουμίνη 200 gr/lit (Baxter).
- Αντιδραστήριο Hydroxy Ethyl Starch (άμυλο του υδροξυαιθυλίου) (HETASTARCH, HES, 6% w/v, Cooper S.A.).
- Σύστημα ασκών μεταμόσχευσης (Pall Medical) (Εικόνα 13).
- Φυγόκεντρος (Centrifuge CellSep), 6/720R, Sanyo.
- Θερμοσυγκολλητής (Rapid Seal Tube Sealer), Genesis.
- Αυτόματος εξαγωγέας (Auto-Volume Expressor Operator Manual), Thermogenesis.
- Σύριγγα 50 ml, Becton Dickinson.
- Φιαλίδιο Falcon, 15 ml, Greiner.
- Φιαλίδια snap-cap, 5 ml, Greiner.



Εικόνα 13. Σύστημα ασκών μεταμόσχευσης, ασκός (ανατύπωση από «www.pall.com», access in 28/03/2014).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Η απόψυξη μιας μονάδας ΟΠ.Α. πραγματοποιείται βάσει του αντίστοιχου πειραματικού πρωτοκόλλου της Τράπεζας ΟΠ.Α. της Ν.Υόρκης (*Rubistein, 1995*). Αρχικά, η κρυσωτηρημένη μονάδα ΟΠ.Α. απομακρύνεται από τη δεξαμενή του υγρού αζώτου (-196°C). Αφαιρείται η μεταλλική κασετίνα, αλλά και το πλαστικό προστατευτικό περίβλημα, στα οποία ήταν αποθηκευμένη η μονάδα. Στη συνέχεια, βυθίζεται σε υδατόλουτρο των 37°C και ταυτόχρονα γίνονται μαλάξεις στη μονάδα έως ότου ξεπαγώσει πλήρως. Γίνεται σύνδεση του ασκού κρυοκατάψυξης με το σύστημα ασκών μεταμόσχευσης και πραγματοποιείται έγχυση του διαλύματος πλύσης/απόψυξης. Το διάλυμα πλύσης/απόψυξης είναι ένα ισοτονικό διάλυμα άλατος που περιέχει αλβουμίνη και HES και βοηθά στην ανασύσταση των κυττάρων του ΟΠ.Α. και τον καθαρισμό της από τυχόν «άχρηστα» συστατικά τα οποία δεν είχαν απομακρυνθεί κατά τη μείωση όγκου. Η έγχυσή του πραγματοποιείται με πολύ αργό ρυθμό, ενώ ταυτόχρονα η μονάδα αναδεύεται, μέχρι όλη ποσότητα του ΟΠ.Α. να μεταφερθεί από τον ασκό κρυοκατάψυξης στον ασκό μεταμόσχευσης. Οι δύο ασκοί διαχωρίζονται μεταξύ τους. Ο ασκός μεταμόσχευσης φυγοκεντρείται στα 450 g για 20 λεπτά, στους 10°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου με τη βοήθεια ειδικού αυτόματου εξαγωγέα (extractor). Το ίζημα που παραμένει στον ασκό μεταμόσχευσης αντιστοιχεί στο buffy coat, στο οποίο πραγματοποιήθηκε απόψυξη και ανασύσταση. Τέλος, λαμβάνονται τα εξής δείγματα από τον ασκό: 0,5 ml σε φιαλίδιο snap-cap, για μέτρηση των κυττάρων σε αιματολογικό αναλυτή και των κυτταρικών πληθυσμών και της βιωσιμότητάς τους στον κυτταρομετρητή ροής και 0,5 ml σε φιαλίδιο Falcon 15 ml, για μέτρηση δυναμικότητας των κυττάρων.

5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α.

5.1. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- Θάλαμος νηματικής ροής (Labguard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet), Nuair.
- Ζυγός Kern.
- Αιματολογικός αναλυτής, Automated Hematology Analyzer, NIHON-KODEN.
- Σύριγγα, 5 ml, Becton Dickinson.
- Φιαλίδιο γενικής αίματος, 4 ml, που περιέχει EDTA, Becton Dickinson.
- Φιαλίδιο snap-cap, 5 ml, Greiner.
- Αιθανόλη 70%.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Γίνεται εκκίνηση του θαλάμου νηματικής ροής, όπου πραγματοποιείται η λήψη δειγμάτων κάτω από άσηπτες συνθήκες στα ειδικά δωμάτια GMP δωμάτιο C (Good manufacturing practices room C). Απολυμαίνεται το στόμιο του ασκού συλλογής ΟΠ.Α. με αιθανόλη 70% και εισάγεται μία σύριγγα των 5 ml. Γίνεται ανάδευση του ασκού, ενώ ταυτόχρονα επαναλαμβάνεται η αναρρόφηση από τη σύριγγα τρεις φορές, με σκοπό τη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος. Ακολουθεί απομάκρυνση της επιθυμητής ποσότητας και μεταφορά της στο αντίστοιχο φιαλίδιο.

5.2. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ (Automated Hematology Analyzer, NIHON-KODEN).

Τα δείγματα που λήφθηκαν για μέτρηση των κυττάρων εισάγονται στον αιματολογικό αναλυτή. Στη συνέχεια, εμφανίζονται στην οθόνη του αναλυτή οι συγκεντρώσεις των λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων, του αιματοκρίτη, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων.

5.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- Μονοκλωνικό αντισώμα:
 - CD45-FITC, Beckman-Coulter.
 - CD34-PE, Beckman-Coulter.
 - CD45-PC5, Beckman-Coulter.
 - CD71-PE, Beckman-Coulter.
- Χρωστικές ουσίες για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων:
 - 7-AAD Viability Dye, Beckman-Coulter.
 - SYTO16 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain, Invitrogen.
- Διάλυμα λύσης κυττάρων, Lysing Solution, 1x, Beckman-Coulter.
- Μικροσφαιρίδια μέτρησης απόλυτου αριθμού κυττάρων (FLOW-COUNT Fluorospheres), Beckman-Coulter.
- Υγρό περιροής κυτταρομετρητή ροής (ISO-Flow Sheath), Beckman-Coulter.
- Υγρό καθαρισμού κυτταρομετρητή ροής (CLENZ), Beckman-Coulter.
- Αντιδραστήριο ελέγχου ευθυγράμμισης (FLOW-CHECK Fluorospheres), Beckman-Coulter.
- Απιονισμένο νερό (ddH₂O).
- Υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη).
- Πιπέττα μιας χρήσεως, 10 ml, Greiner.
- Πλαστικά ρύγχη για αυτόματη πιπέττα Gilson 200, 1000 μl, Greiner.
- Φιαλίδια Falcon, 50 ml, Greiner.
- Φιαλίδια πολυπροπυλενίου, 5 ml, Beckman-Coulter.
- Πιπέττες 20, 200 and 1000 μl, Gilson.
- Βοηθητικός προσαρμογέας αναρρόφησης για ορολογικές πιπέτες (Pipetting Aid), Gilson.
- Αναδευτήρας (Vortex), Hei dolph.
- Κυτταρομετρητής ροής, Beckman-Coulter Epics XL Flow Cytometer and Analysis Section with CD34 Analysis Template (Procount).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

I. Παρασκευή Διαλυμάτων.

- Διαλύματος λύσης κυττάρων 10%, από το διάλυμα λύσης 1x και ddH₂O.
- Διαλύματος χλωρίνης 25% με προσθήκη ddH₂O.

II. Προετοιμασία κυτταρομετρή ροής.

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.

III. Έλεγχος ευθυγράμμισης κυτταρομετρητή ροής.

Σε φιαλίδιο προπυλενίου προστίθεται μικρή ποσότητα του αντιδραστηρίου ελέγχου ευθυγράμμισης (FLOW-CHECK Fluorospheres) και ελέγχεται αν όλοι οι παράμετροι βρίσκονται στα επιτρεπτά όρια.

IV. Προετοιμασίας δειγμάτων.

Για κάθε μονάδα ΟΠ.Α. πραγματοποιείται μέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών και έλεγχος βιωσιμότητας και σε δείγματα που ελήφθησαν πριν και μετά τη μείωση όγκου. Για το δείγμα ΟΠ.Α. πριν τη μείωση όγκου, πραγματοποιείται έλεγχος για τη μέτρηση των κυττάρων CD34⁺ και για τη μέτρηση των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων, σε δύο διαφορετικά φιαλίδια. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και για το δείγμα ΟΠ.Α. μετά τη μείωση όγκου. Συγκεκριμένα για τη μέτρηση των κυττάρων CD34⁺:

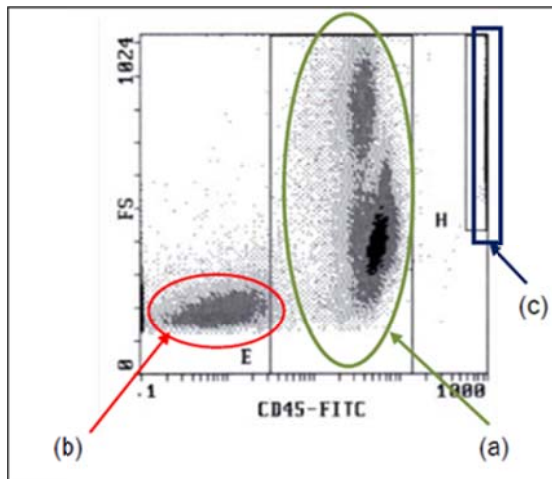
- Προσθήκη 20 μl μονοκλωνικού αντισώματος CD45-FITC στο σωληνάριο.
- Προσθήκη 20 μl μονοκλωνικού αντισώματος CD34-PE στο σωληνάριο.
- Προσθήκη 20 μl χρωστικής 7-AAD στο σωληνάριο.

Για τη μέτρηση των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων:

- Προσθήκη 20 μl μονοκλωνικού αντισώματος CD45-PC5 στο σωληνάριο.
- Προσθήκη 20 μl μονοκλωνικού αντισώματος CD71-PE στο σωληνάριο.
- Προσθήκη 20 μl χρωστικής SYTO16 στο σωληνάριο.

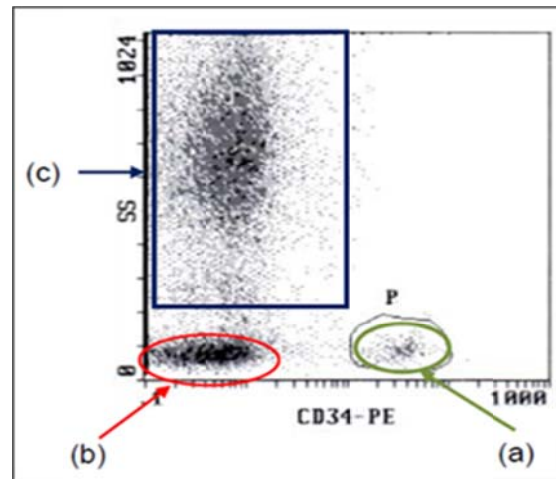
Στη συνέχεια, προστίθενται 100 μl δείγματος αίματος σε κάθε σωληνάριο προπυλενίου και όλα τα δείγματα αναδεύονται με τη χρήση Vortex. Τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά και στο τέλος της επώασης προστίθενται από 2 ml διαλύματος λύσης κυττάρων. Πραγματοποιείται ανάδευση στο Vortex και δεύτερη επώαση για 10 λεπτά. Στο τέλος της δεύτερης επώασης γίνεται προσθήκη 100 μl μικροσφαιριδίων (FLOW-COUNT) και τα δείγματα ανακινούνται ισχυρά (*πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων της StemKit*). Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται στη βάση του κυτταρομετρή (carousel) και επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα, βάσει του οποίου θα μετρηθεί ο αριθμός και η βιωσιμότητα των λευκών αιμοσφαιρίων, των κυττάρων CD34 και των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Γίνεται εκκίνηση του προγράμματος μέτρησης δειγμάτων και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη μορφή διαγραμμάτων, όπως θα περιγραφεί παρακάτω.

V. Ανάλυση διαγραμμάτων.



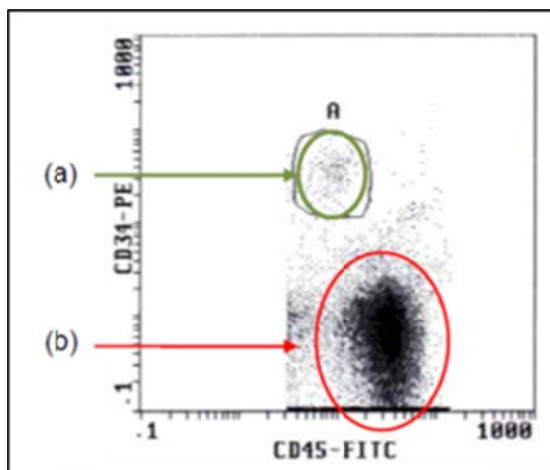
όνα 14. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος CD45-FITC:

- a: Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺ (λευκά αιμοσφαίρια).
- b: Πληθυσμός λυθέντων ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- c: Μικροσφαιρίδια (Beads).



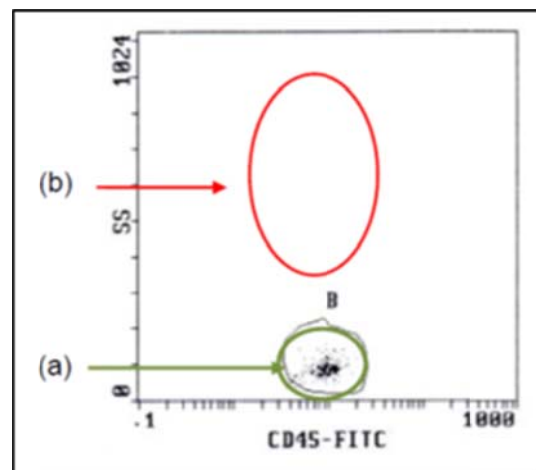
Εικόνα 15. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης⁶ (SS) και σήματος CD34-PE:

- a: Πληθυσμός κυττάρων CD34⁺.
- b: Πληθυσμός λυθέντων ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- c: Πληθυσμός εμπύρηνων κυττάρων, CD34⁺.



Εικόνα 16. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει σήματος CD34-PE και σήματος CD45-FITC:

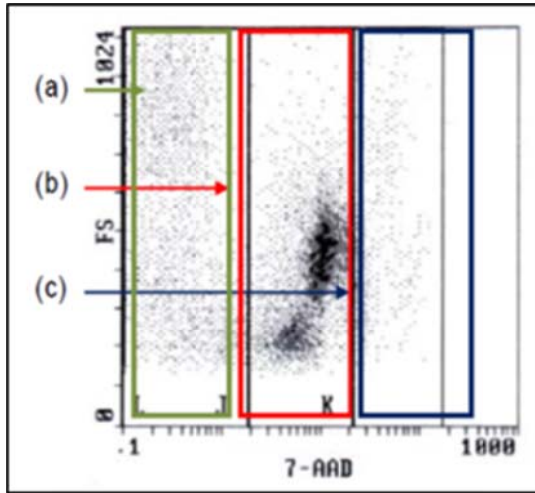
- a: Πληθυσμός διπλά θετικών κυττάρων CD45⁺ CD34⁺.
- b: Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺ CD34⁻.



Εικόνα 17. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD45-FITC:

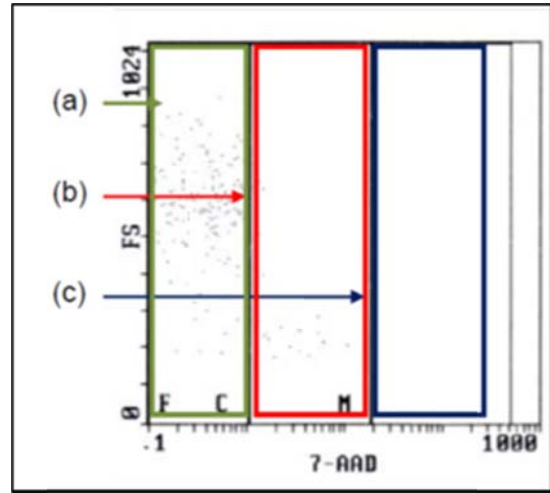
- a: Πληθυσμός των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.
- b: Δεν εμφανίζεται κάποιος κυτταρικός πληθυσμός με το τρέχον πρωτόκολλο.

⁶ Η πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FS) χαρακτηρίζει το μέγεθος ενός κυττάρου ενώ η πλάγια (Side Scatter, SS) την κοκκίωση.



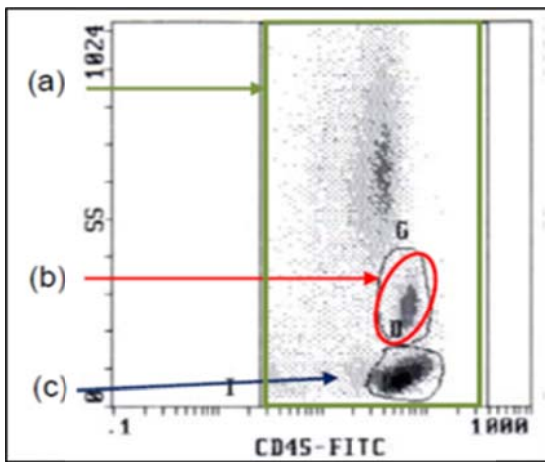
Εικόνα 18. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος 7-AAD :

- a: Πληθυσμός ζωντανών κυττάρων CD45⁺.
- b: Πληθυσμός αποπτωτικών κυττάρων CD45⁺.
- c: Πληθυσμός νεκρωτικών κυττάρων CD45⁺.



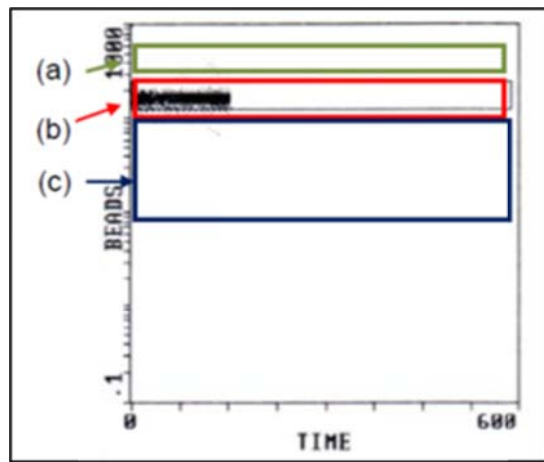
Εικόνα 19. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος 7-AAD:

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



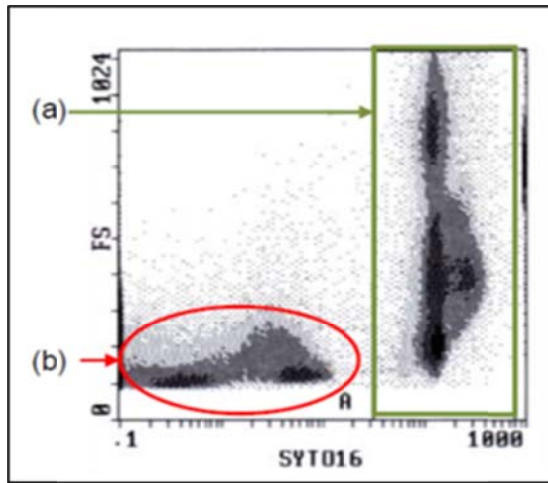
Εικόνα 20. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD45-FITC:

- a: Πληθυσμός ζωντανών κυττάρων CD45⁺.
- b: Πληθυσμός μονοκυττάρων.
- c: Πληθυσμός λεμφοκυττάρων.



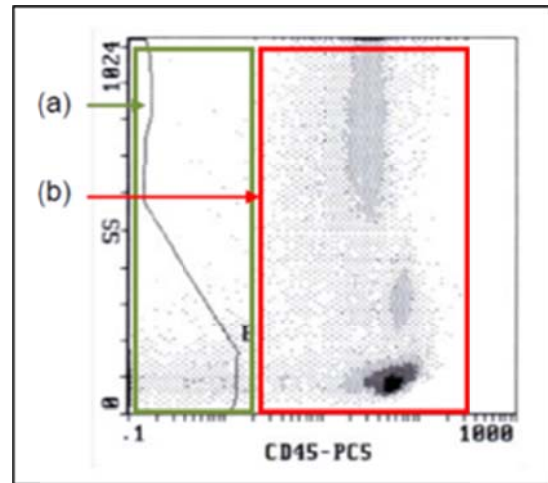
Εικόνα 21. Παράθυρο μικροσφαιριδίων:

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



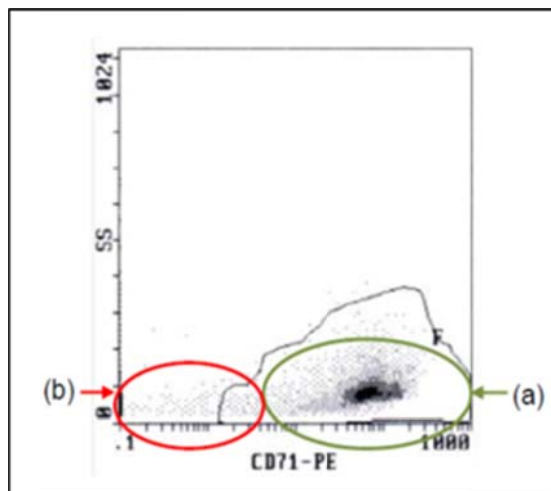
Εικόνα 22. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πρόσθιας σκέδασης (FS) και σήματος SYTO16:

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



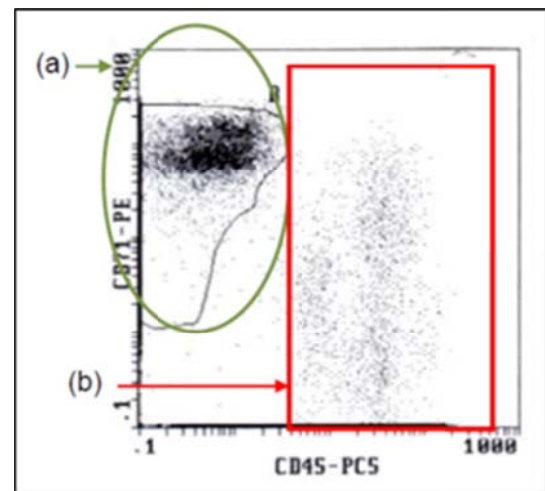
Εικόνα 23. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD45-PC5:

- a: Πληθυσμός κυττάρων CD45⁻.
- b: Πληθυσμός κυττάρων CD45⁺.



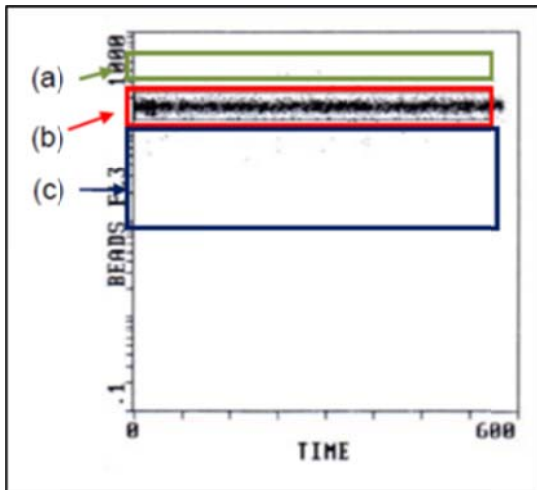
Εικόνα 24. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει πλάγιας σκέδασης (SS) και σήματος CD71-PE:

- a: Πληθυσμός κυττάρων CD71⁺.
- b: Πληθυσμός κυττάρων CD71⁻.



Εικόνα 25. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού βάσει σήματος CD71-PE και σήματος CD45-PC5:

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



Εικόνα 26. Παράθυρο μικροσφαιριδίων:

- a: Συσσωματώματα μικροσφαιριδίων.
- b: Μικροσφαιρίδια κατά τη μέτρηση.
- c: «Θραύσματα» μικροσφαιριδίων.

5.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CFU (COLONY FORMING UNIT).

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

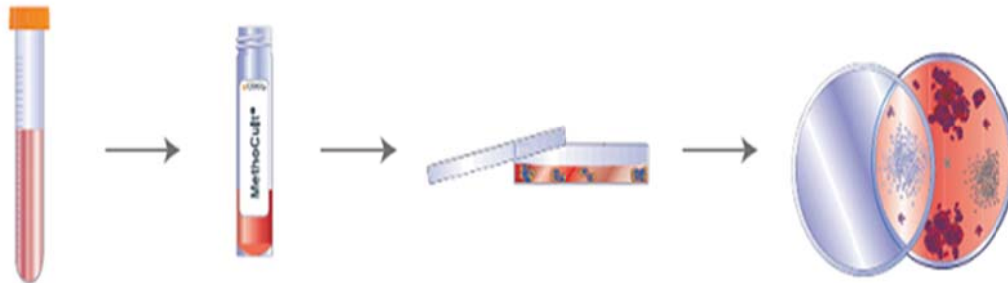
- MethoCult (StemCell Technologies,).
- Ενέσιμο διάλυμα νερού (Water For Injection, WFI).
- Θάλαμος νηματικής ροής (Labguard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet), Nuair.
- Αιματολογικός αναλυτής, Automated Hematology Analyzer, NIHON-KODEN.
- Ανάστροφο μικροσκόπιο, Leica DMIL microscope.
- Σύριγγα 5 ml, Becton Dickinson.
- Βελόνα διαμέτρου 18G.
- Κωνικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 ml.
- Τρυβλία Petri διαμέτρου 35 και 100 mm.
- Ορολογική πιπέτα 10 ml.
- CFU buffer (4,35 ml ddH₂O, 5 ml filtered EDTA, 100 Mm, 50 ml PBS 10x, 10ml FBS)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις στο δείγμα ως εξής: η πρώτη αραιώση (1:10) και η δεύτερη (1:100) με προσθήκη CFU buffer, ενώ η τρίτη αραιώση (1:1000) με προσθήκη στο θρεπτικό υλικό MethoCult. Γίνεται καλή ανάδευση του διαλύματος, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται σε δύο τρυβλία διαμέτρου 35 mm.

Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετούνται σε ένα δεύτερο τρυβλίο διαμέτρου 100 mm, μέσα στο οποίο υπάρχει ένα επιπλέον τρυβλίου διαμέτρου 35 mm χωρίς καπάκι, το οποίο περιέχει ενέσιμο διάλυμα νερού. Το τρυβλίο διαμέτρου 100 mm, μαζί με τα μικρότερα τρυβλία τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για δεκατέσσερις ημέρες. Μετά το πέρας αυτών, γίνεται αξιολόγηση και καταμέτρηση

των αποικιών που σχηματίστηκαν με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας της δοκιμασίας CFU (ανατύπωση από www.stemcell.com, access in 28/03/2014).

5.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή: MS office-Excel. Στο πρόγραμμα αυτό υπολογίστηκε η ανάκτηση (Recovery) των CD34 κυττάρων, των εμπύρηνων κυττάρων (Total nucleated cell, TNC), των μονοπύρηνων (Mononuclear cell, MNC) και των αιμοπεταλίων (Platelets, PLT), καθώς και η τιμή του αιματοκρίτη (HCT), μετά την ολοκλήρωση της μείωσης όγκου. Επίσης, οι μεταβλητές αυτές συγκρίθηκαν σε ζεύγη, πριν από την κατάψυξη και μετά απόψυξη, με τη δοκιμή t-test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος με ± 1 τυπική απόκλιση (SD) και σημαντικές τιμές θεωρούνται οι τιμές που δεν είναι μεγαλύτερες από 0,05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α.

Για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 60 μονάδες ΟΠ.Α., οι οποίες παραδόθηκαν στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α., από γονείς που επιθυμούσαν τη δωρεά. Οι μονάδες αυτές δεν προορίζονταν για κλινική χρήση, εφόσον δεν πληρούσαν τις προϋποθέσεις, βάσει των οποίων λειτουργεί η τράπεζα ΟΠ.Α.. Παρόλα αυτά είχε ληφθεί συναίνεση από τις μητέρες, για τη χρήση τους σε ερευνητικό επίπεδο.

Συνοπτικά, οι διαδικασίες που έλαβαν χώρα, μετά την παραλαβή της μονάδας ΟΠ.Α. στο εργαστήριο, ήταν οι εξής:

- Λήψη δείγματος από τον ασκό συλλογής, μέτρηση του αριθμού κυττάρων και της βιωσιμότητάς τους.

Εφόσον η μονάδα ΟΠ.Α. είχε κριθεί κατάλληλη για επεξεργασία, προχωρούσε στη διαδικασία της επεξεργασίας, η οποία περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Μείωση όγκου μονάδας ΟΠ.Α. με τη χειροκίνητη μέθοδο διπλής φυγοκέντρωσης ή με την ημιαυτόνομη μέθοδο AXP.
- Δεύτερη λήψη δειγμάτων από τον ασκό με το buffy coat της μονάδας ΟΠ.Α. και: εκ νέου μέτρηση του αριθμού κυττάρων, βιωσιμότητας και μέτρηση δυναμικότητας των κυτταρικών πληθυσμών μέσω καλλιέργειας CFU.

Εάν η μονάδα είχε κριθεί κατάλληλη για αποθήκευση ακολουθόνταν οι παρακάτω διαδικασίες:

- Κατάψυξη μονάδας ΟΠ.Α.
- Απόψυξη μονάδων ΟΠ.Α., μετά την πάροδο 3 μηνών κρυοσυντήρησης.
- Αξιολόγηση κυτταρικών πληθυσμών: μέτρηση αριθμού κυττάρων, βιωσιμότητας και καλλιέργεια CFU εκ νέου.

2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΟΠ.Α.

Για την επεξεργασία των μονάδων ΟΠ.Α. χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι μείωσης όγκου: 30 μονάδες ΟΠ.Α. επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο διπλής φυγοκέντρωσης με προσθήκη αντιδραστηρίου HES (μέθοδος Rubistein) και 30 μονάδες με την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP.

Πίνακας 5. Στοιχεία των μονάδων OPLA και αποτελέσματα των μετρήσεων με τις δύο μεθόδους επεξεργασίας: τη χειροκίνητη μέθοδο διπλής φυγοκέντρησης Rubinstein και την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP ανά κατηγορίες βάρους (≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr) [Αρχικός όγκος μονάδας (Initial volume), τελικός όγκος μονάδας (Final freezing volume), εμπύρνηνα κυττάρια (Total nucleated cells, TNCs), ανάκτηση TNCs (Recovery), ανάκτηση μονοπύρηνων κυττάρων (Recovery Mononuclear cells, MNCs), ανάκτηση αιμοπεταλίων (Recovery Platelets, PLTs) και η τιμή του αιματοκρίτη (HCT)]

	Initial Volume (ml)		Final Freezing Bag Volume (ml)		Initial TNCs ($\times 10^6$)		Final TNCs ($\times 10^6$)		TNC recovery (%)		CD34 recovery (%)		MNC recovery (%)		PLT recovery (%)		HCT (%)	
	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP	Rubinstein	AXP
≤ 130 g	86,23	84,9	20,1	19,9	1256,2	867,1	974,6	711,4	77,6	80,86	98,46	98,19	87,9	96,24	55,95	92,1	51,99	27,17
131-150 g	102,3	102,6	20,05	20,87	1438,5	1114,7	1109,6	916,4	77,57	81,4	84,38	98,2	90,06	98,5	47,2	87,61	50,97	27,32
151-170 g	119,9	118,6	20,21	20,79	1542,3	1195,3	1163	1022	75,8	83,26	84,55	94,6	91,52	97,57	40,23	80,35	53,42	26,67
171-190 g	137,9	130,3	20,3	20,8	1724,4	912,3	1271,9	665,3	74,22	80,9	80,57	98	90,56	92	33,88	80,96	53,47	24,15
≥ 191 g	158,1	162	20,12	20,9	1944,6	1423,2	1418,4	1208	73,02	82,56	83,4	89,93	86,71	94,09	31,8	80,4	53,31	26,55
Μέσος Όρος	120,88	119,7	20,15	20,65	1581,2	1102,5	1187,5	904,5	75,642	81,796	86,272	95,784	89,35	95,68	41,812	84,284	52,632	26,37
Τυπική Απόκλιση	28,38	29,18	0,099	0,42	264,60	225,39	167,65	223,8	2,02	1,068	7	3,6127	1,98	2,6414	9,93	5,333	1,11	1,283

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΟΠ.Α. ΜΕ ΤΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟ

I. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο μέσος αρχικός όγκος (Initial volume) των μονάδων ΟΠ.Α., οι οποίες επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο διπλής φυγοκέντρησης (Rubinstein), πριν την μείωση όγκου, ήταν 120,88 ml, ενώ ο μέσος αριθμός των εμπύρηνων κυττάρων (Total nucleated cells, TNCs) ήταν $1581,2 \times 10^6$.

Μετά τη μείωση όγκου των μονάδων ΟΠ.Α., ο μέσος τελικός όγκος (Final freezing volume) που υπολογίστηκε ήταν 20,15 ml. Ο μέσος αριθμός των TNCs ήταν $1187,5 \times 10^6$ και η μέση ανάκτησή τους (TNCs Recovery) ήταν 75,64 %. Επίσης, η μέση ανάκτηση των μονοπύρηνων κυττάρων (Mononuclear cells, MNCs Recovery) που υπολογίστηκε ήταν 89,35 %, ενώ η μέση ανάκτηση των αιμοπεταλίων (Platelets, PLTs Recovery) ήταν 41,81 %. Τέλος η μέση τιμή του αιματοκρίτη (HCT) που μετρήθηκε ήταν 52,63 %.

II. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μέση ανάκτηση των CD34 κυττάρων (Recovery), που μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής ήταν 86,27 %, ενώ η βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών, πριν τη μείωση όγκου που υπολογίστηκε ήταν 96 %, και μετά τη μείωση όγκου ήταν 97,2 %. Επίσης, μετρήθηκε η βιωσιμότητα των TNCs πριν τη μείωση όγκου, 87,3 %, και μετά τη μείωση όγκου, 87 %.

2.2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΟΠ.Α. ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟ AXP

I. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο μέσος αρχικός όγκος (Initial volume) των μονάδων ΟΠ.Α., οι οποίες επεξεργάστηκαν με την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP, πριν την μείωση όγκου, ήταν 119,7 ml, ενώ ο μέσος αριθμός των TNCs ήταν $1102,52 \times 10^6$.

Μετά τη μείωση όγκου των μονάδων ΟΠ.Α., ο μέσος τελικός όγκος (Final freezing volume) που υπολογίστηκε ήταν 20,65 ml. Ο μέσος αριθμός των TNCs

ήταν $904,5 \times 10^6$ και η μέση ανάκτησή τους ήταν 81,79 %. Επίσης, η μέση ανάκτηση των MNCs που υπολογίστηκε ήταν 95,68 %, ενώ η μέση ανάκτηση των αιμοπεταλίων ήταν 84,28 %. Τέλος, η μέση τιμή του αιματοκρίτη που μετρήθηκε ήταν 26,37 %.

II. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ο μέσος όρος ανάκτησης των CD34 κυττάρων (Recovery), που μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής ήταν 95,78 % , ενώ η βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών, πριν τη μείωση όγκου που υπολογίστηκε ήταν 98,1 %, και μετά τη μείωση όγκου ήταν 98,6 %. Επίσης, μετρήθηκε η βιωσιμότητα των TNCs πριν τη μείωση όγκου, 88,2 %, και μετά τη μείωση όγκου, 87,6 %.

3. ΚΑΤΑΨΥΞΗ-ΑΠΟΨΥΞΗ

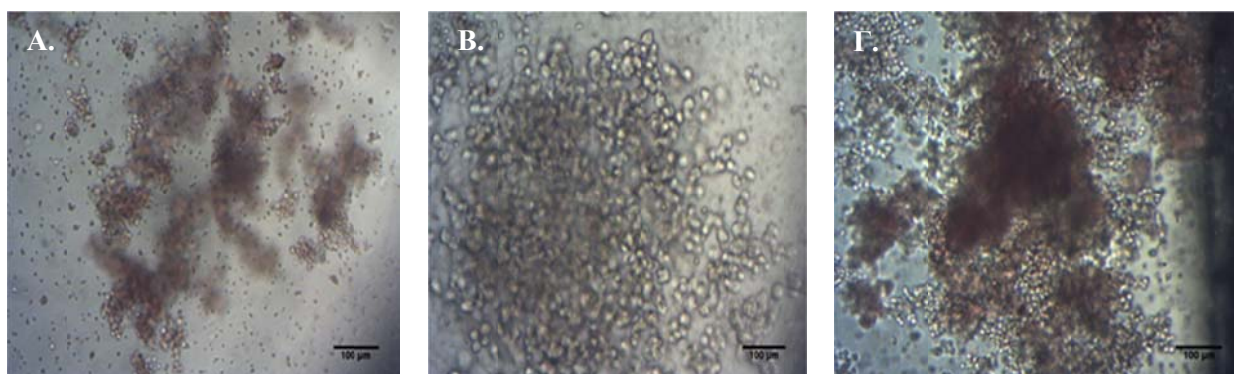
Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η μέθοδος επεξεργασίας επηρεάζει, αφενός την ικανότητα των κυττάρων να επιβιώνουν σε παρατεταμένες περιόδους κρυοσυντήρησης, αφετέρου δε την ικανότητα των κρυοσυντηρημένων κυττάρων να διαφοροποιούνται σε πληθυσμούς της αιμοποιητικής σειράς, οι μονάδες ΟΠ.Α. επεξεργάστηκαν με τις δύο μεθόδους μείωσης όγκου. Οι μονάδες αυτές, κρυοσυντηρήθηκαν σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια αποψύχθηκαν σε διάστημα 3 μηνών προκειμένου να μελετηθούν.

3.1. ΑΠΟΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α. ΠΟΥ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟ

Προκειμένου να διαπιστωθεί το ποσοστό των κυττάρων των μονάδων ΟΠ.Α που επιβίωσαν κατά την κρυοσυντήρηση, μετά την απόψυξη των μονάδων μετρήθηκε η μέση ανάκτηση των CD34 κυττάρων, η οποία ήταν 81,6 % και η μέση ανάκτηση των TNCs που ήταν 52,14.

3.1.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέτρηση δυναμικότητας των κυττάρων (CFUs) πραγματοποιήθηκε στις μονάδες ΟΠ.Α. πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξή τους. Ο μέσος αριθμός των CFUs πριν την κατάψυξη των μονάδων ήταν $1,06 \times 10^6$ κύτταρα, ενώ μετά την απόψυξη ήταν $0,63 \times 10^6$ κύτταρα. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχούσε και στα τρία κύρια είδη αποικιών, δηλαδή BFU-E, CFU-GM και CFU-GEMM (Εικόνα 28), γεγονός που αποδεικνύει τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των κυττάρων κατά την κρυοσυντήρηση.



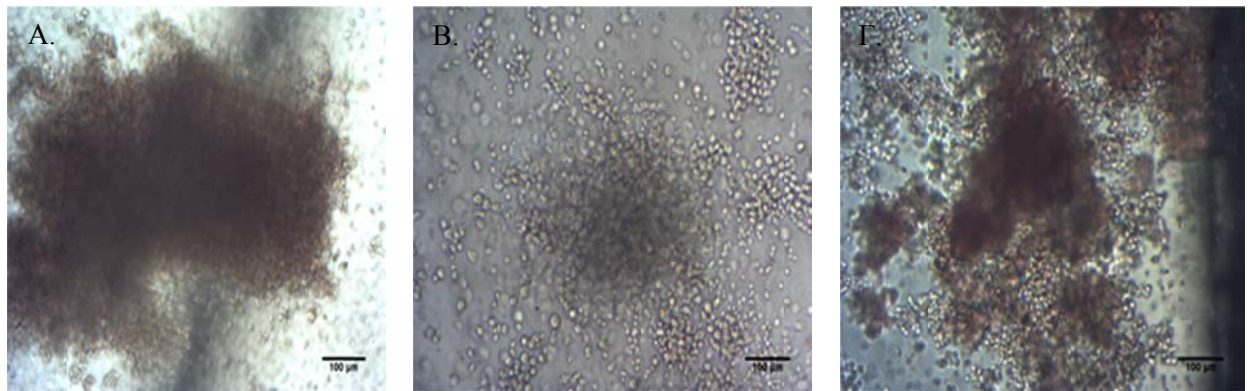
Εικόνα 28. Φωτογραφίες αποικιών Α. BFU-E, μεγέθυνση 10X, Β. CFU-GM, μεγέθυνση 20X και Γ. CFU-GEMM, μεγέθυνση 10X.

3.2. ΑΠΟΨΥΞΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΟΠ.Α. ΠΟΥ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΝΟΜΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΧΡ

Μετά την απόψυξη των μονάδων ΟΠ.Α. μετρήθηκε η μέση ανάκτηση των CD34 κυττάρων, η οποία ήταν 82,8 % και η μέση ανάκτηση των TNCs που ήταν 66,93 %.

3.2.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

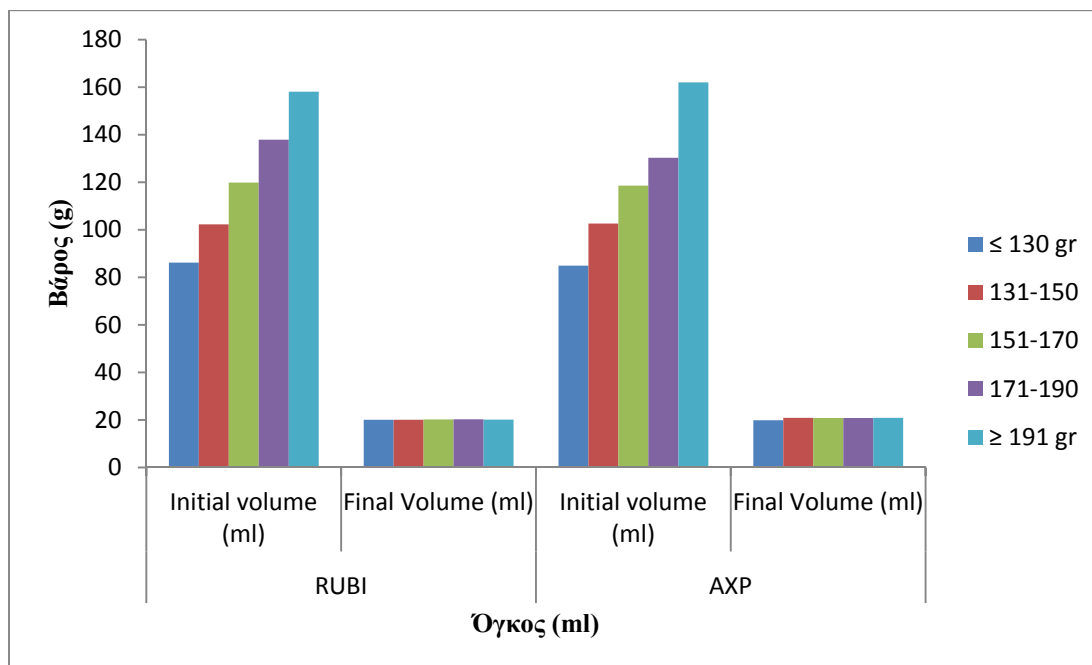
Η μέτρηση δυναμικότητας των κυττάρων (CFUs) πραγματοποιήθηκε στις μονάδες ΟΠ.Α. πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξή τους. Ο μέσος αριθμός των CFUs πριν την κατάψυξη των μονάδων ήταν $1,2 \times 10^6$ κύτταρα, ενώ μετά την απόψυξη ήταν $0,68 \times 10^6$ κύτταρα. Και σε αυτήν την περίπτωση η πολυδυναμικότητα των κυττάρων δεν επηρεάστηκε από την κρυοκατάψυξη, αφού παρατηρήθηκαν, τόσο πριν όσο και μετά την απόψυξη αποικίες BFU-E, CFU-GM και CFU-GEMM (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Φωτογραφίες αποικιών Α. BFU-E, μεγέθυνση 10X, Β. CFU-GM, μεγέθυνση 10X και Γ. CFU-GEMM, μεγέθυνση 10X.

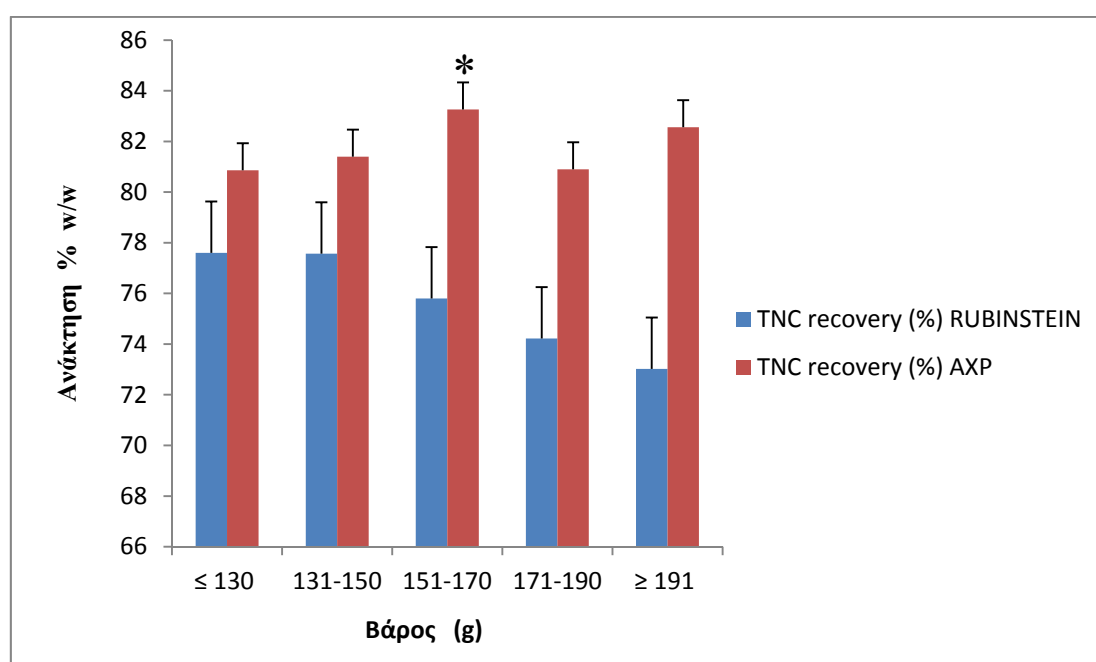
4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Προκειμένου να διευκολυνθεί η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων επεξεργασίας του ΟΠ.Α. με τις δύο μεθόδους, ομαδοποιήθηκαν με βάση το βάρος των μονάδων κατά τη συλλογή τους. Παρατηρήθηκε ότι ο καθαρός όγκος του ΟΠ.Α. που αντιστοιχούσε σε κατηγορίες βάρους ≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr, ήταν 86,23 ml, 102,3 ml, 119,9 ml, 137,9 ml και 158,1 ml αντίστοιχα, για τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο (Rubinstein), ενώ για τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP ήταν 84,9 ml, 102,64 ml, 118,56 ml, 130,3 ml και 162 ml αντίστοιχα για κάθε κατηγορία βάρους. Συγκεντρωτικά ο μέσος αρχικός όγκος συλλογής των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο ήταν $120,88 \text{ ml} \pm 28,38$ και με την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP ήταν $119,7 \text{ ml} \pm 29,18$. Αντίστοιχα ο μέσος τελικός όγκος των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο ήταν $20,15 \text{ ml} \pm 0,10$ και με την ημι-αυτόματη μέθοδο ήταν $20,65 \text{ ml} \pm 0,42$ (Εικόνα 30).



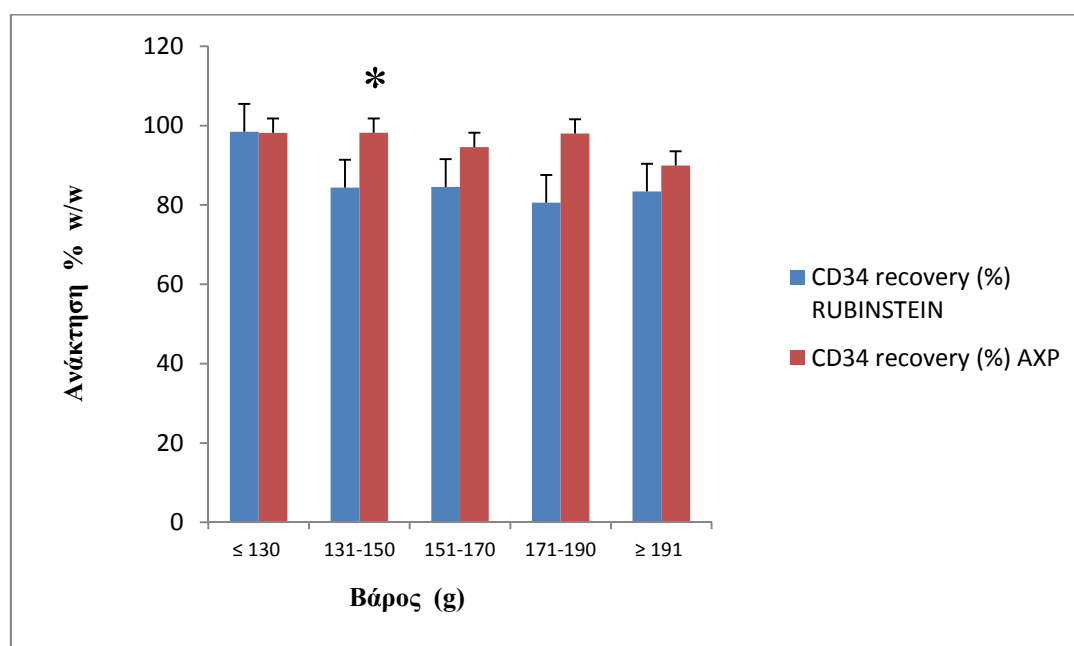
Εικόνα 30. Σύγκριση του αρχικού και τελικού όγκου των μονάδων ΟΠ.Α. που χρησιμοποιήθηκαν στις δύο μεθόδους μείωσης όγκου, πριν την επεξεργασία: χειροκίνητη μέθοδος (Rubinstein) και την ημι-αυτόματη μέθοδος AXP, ανά κατηγορίες βάρους (≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr).

Παρατηρήθηκε ότι η ανάκτηση του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων (TNC Recovery) που αντιστοιχούσε σε κατηγορίες βάρους ≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr, ήταν 77,6 ml, 77,57 ml, 75,8 ml, 74,22 ml και 73,02 ml για τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο, ενώ για τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με την ημι-αυτόματη μέθοδο ήταν 80,86 ml, 81,4 ml, 83,26 ml, 80,9 ml και 82,56 ml αντίστοιχα για κάθε κατηγορία βάρους. Συγκεντρωτικά η μέση ανάκτηση των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο ήταν $75,64 \% \pm 2,02$ και με την ημι-αυτόματη μέθοδο $81,79 \% \pm 1,06$. Η ανάκτηση των TNCs, των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP ήταν πιο αυξημένη σε σχέση με τη χειροκίνητη μέθοδο, ενώ επίσης παρατηρήθηκε ότι με τη δεύτερη μέθοδο η ανάκτηση των TNCs μειώνονταν όσο αυξάνονταν το αρχικό βάρος συλλογής. Αντίθετα οι μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP δεν παρουσίασαν εξάρτηση του αρχικού βάρους συλλογής και της ανάκτησης των TNCs (Εικόνα 31).

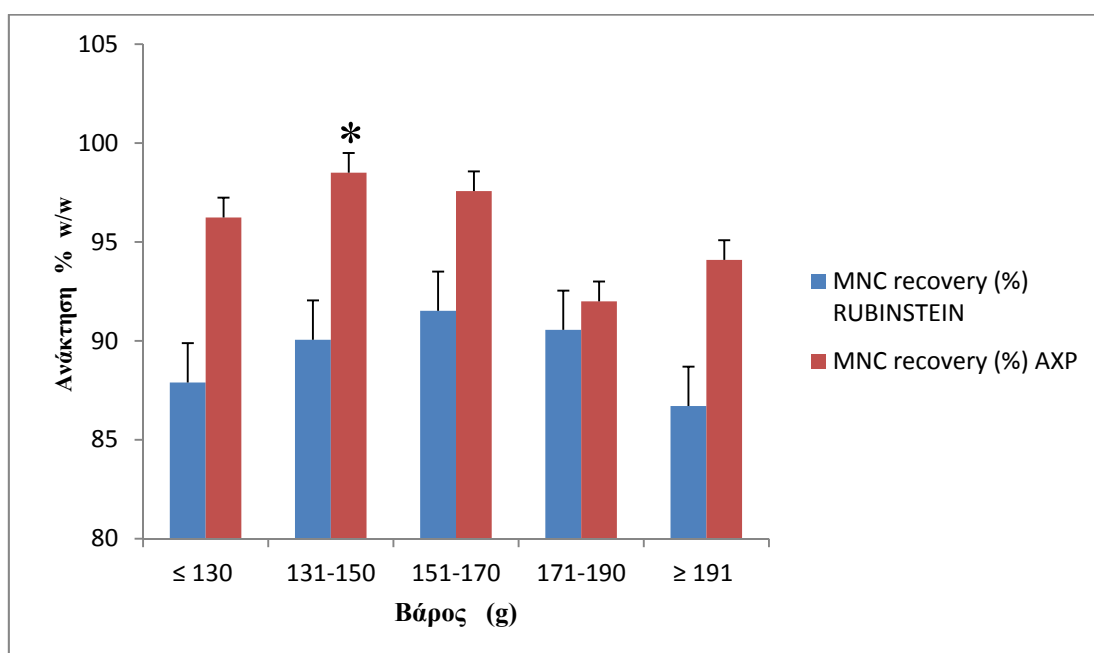


Εικόνα 31. Σύγκριση του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων (TNCs) των μονάδων που καταψύχθηκαν, ανάμεσα στη χειροκίνητη μέθοδο (Rubistein) και την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP, ανά κατηγορίες βάρους (≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr). *Στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάκτηση των TNC των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP και με τη μέθοδο Rubinstein, $p < 0,05$.

Η ανάκτηση των CD34 κυττάρων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubistein στις κατηγορίες βάρους ≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr ήταν 98,46 %, 84,38 %, 84,55 %, 80,57 % και 83,4 %, ενώ με τη μέθοδο AXP ήταν 98,19 %, 98,2 %, 94,6 %, 98 % και 89,93 % αντίστοιχα για κάθε κατηγορία βάρους. Η μέση ανάκτηση των CD34 κυττάρων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubistein ήταν $86,27 \% \pm 7$ και με τη μέθοδο AXP $95,78 \text{ ml} \pm 3,61$. Το ποσοστό ανάκτησης των κυττάρων, των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP ήταν αυξημένο σε σχέση με αυτό των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του ποσοστού ανάκτησης των CD34 κυττάρων και του αρχικού βάρους συλλογής σε καμία από τις δύο μεθόδους επεξεργασίας (Εικόνα 32).



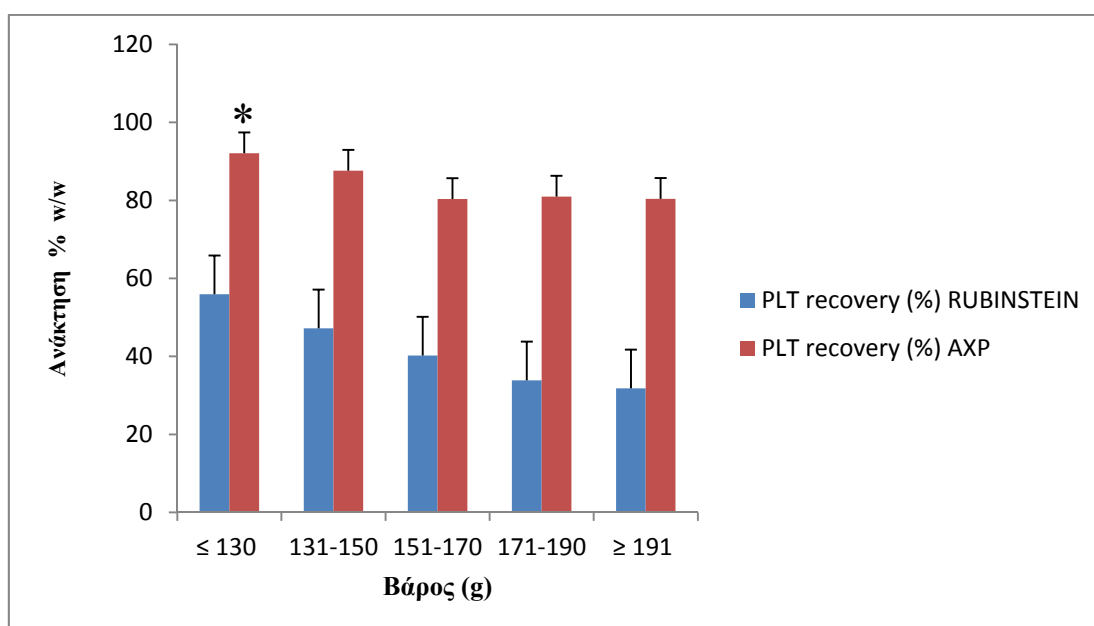
Εικόνα 32. Σύγκριση του αριθμού των CD34 κυττάρων αιμοπεταλίων των μονάδων που καταψύχθηκαν, ανάμεσα στη χειροκίνητη μέθοδο (Rubistein) και την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP, ανά κατηγορίες βάρους (≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr). *Στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάκτηση των CD34 των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP και με τη μέθοδο Rubinstein, $p < 0,05$.



Εικόνα 33. Σύγκριση του αριθμού των μονοπύρηνων κυττάρων (MNCs) των μονάδων που καταψύχθηκαν, ανάμεσα στη χειροκίνητη μέθοδο (Rubinstein) και την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP, ανά κατηγορίες βάρους (≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr). *Στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάκτηση των MNC των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP και με τη μέθοδο Rubinstein, $p < 0,05$.

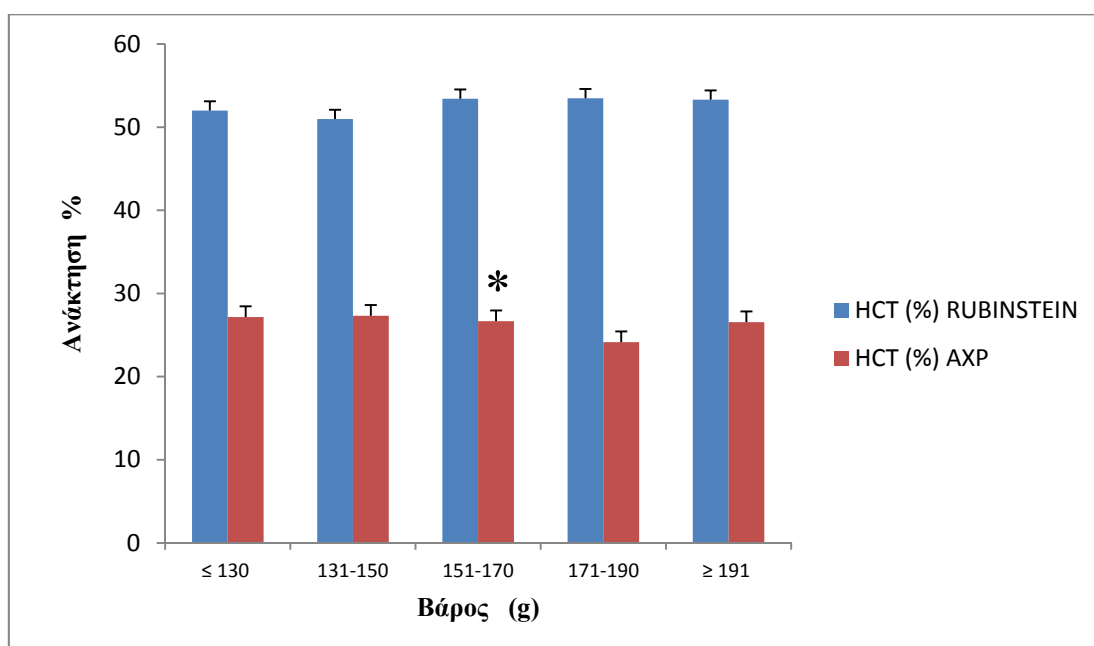
Η ανάκτηση των μονοπύρηνων κυττάρων (MNC recovery) που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubinstein στις κατηγορίες βάρους ≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr ήταν 87,9 %, 90,06 %, 91,52 %, 90,56 % και 86,71 %, ενώ με τη μέθοδο AXP ήταν 96,24 %, 98,5 %, 97,57 %, 92 % και 94,09 % αντίστοιχα για κάθε κατηγορία βάρους. Η μέση ανάκτηση των μονοπύρηνων κυττάρων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubinstein ήταν $89,35 \% \pm 1,98$ και με τη μέθοδο AXP $95,68 \% \pm 2,64$. Οι μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό ανάκτησης των MNCs σε σχέση με το ποσοστό ανάκτησης των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubinstein. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του ποσοστού ανάκτησης των MNCs και του αρχικού βάρους συλλογής σε καμία από τις δύο μεθόδους επεξεργασίας (Εικόνα 33).

Παρατηρήθηκε ότι η ανάκτηση των αιμοπεταλίων (PLT recovery) που αντιστοιχούσε σε κατηγορίες βάρους ≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr, ήταν 55,95 %, 47,2 %, 40,23 %, 33,88 % και 31,8 % για τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο, ενώ για τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με την ημι-αυτόματη μέθοδο ήταν 92,1 %, 87,61 %, 80,35 %, 80,96 % και 80,4 % για κάθε κατηγορία βάρους. Η μέση ανάκτηση των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο ήταν $41,81 \% \pm 9,93$ και με την ημι-αυτόματη μέθοδο $84,28 \% \pm 5,33$. Παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση της ανάκτησης των PLTs των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP σε σύγκριση με εκείνη των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubinstein. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση της ανάκτησης των PLTs όσο αυξάνονταν το αρχικό βάρος συλλογής. Αντίθετα, οι μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP δεν παρουσίασαν εξάρτηση του αρχικού βάρους συλλογής και της ανάκτησης των PLT (Εικόνα 34).

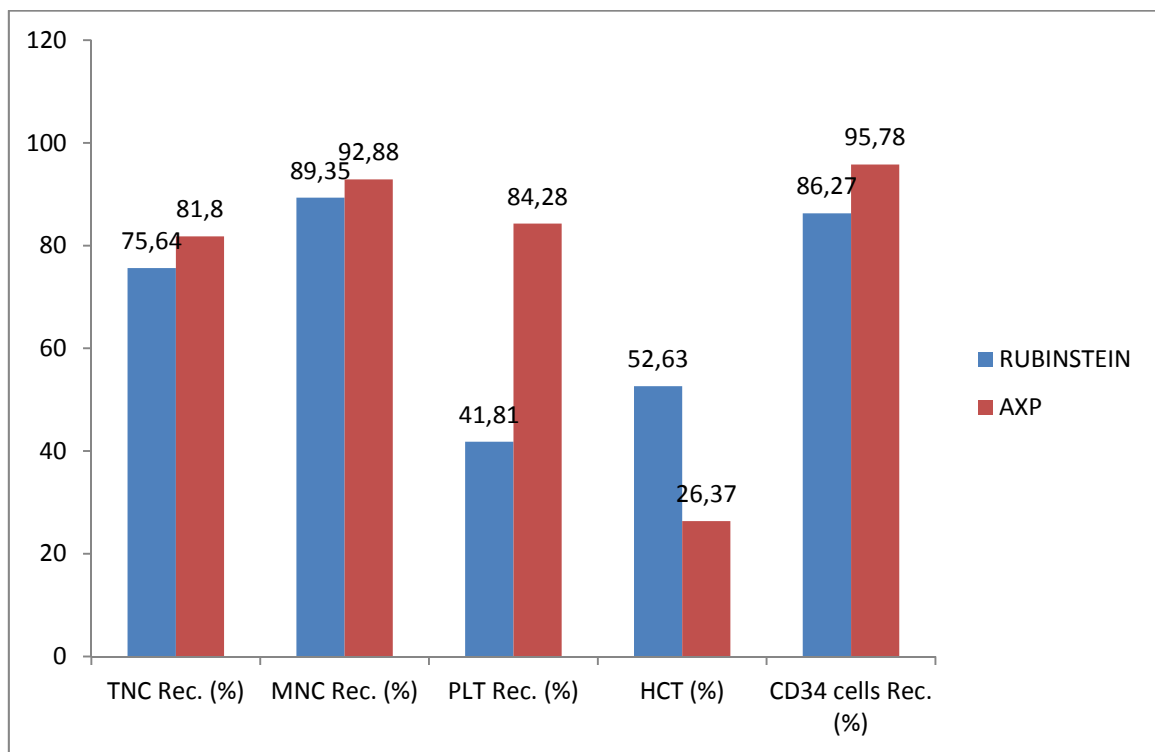


Εικόνα 34. Σύγκριση του αριθμού των αιμοπεταλίων (PLTs) των μονάδων που καταψύχθηκαν, ανάμεσα στη χειροκίνητη μέθοδο (Rubinstein) και την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP, ανά κατηγορίες βάρους (≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr). *Στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάκτηση των PLT των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP και με τη μέθοδο Rubinstein, $p < 0,05$.

Η τιμή του αιματοκρίτη (HCT) των μονάδων ΟΠ.Α. που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubistein στις κατηγορίες βάρους ≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr ήταν 51,99 %, 50,97 %, 53,42 %, 53,47 % και 53,31 %, ενώ για τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με την ημι-αυτόματη μέθοδο ήταν 27,17 %, 27,32 %, 26,67 %, 24,15 % και 26,55 % για κάθε κατηγορία βάρους. Η μέση τιμή του αιματοκρίτη στις μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubinstein είναι $52,63 \% \pm 1,11$ και με τη μέθοδο AXP $26,37 \% \pm 1,28$. Παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά μεταξύ των τιμών των δύο μεθόδων επεξεργασίας, αφού στη μέθοδο Rubinstein ήταν πολύ αυξημένη. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της τιμής του HCT και του αρχικού βάρους συλλογής σε καμία από τις δύο μεθόδους επεξεργασίας (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Σύγκριση της τιμής του αιματοκρίτη (HCT) στις μονάδες ΟΠ.Α. που καταλύχθηκαν, ανάμεσα στη χειροκίνητη μέθοδο (Rubistein) και την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP, ανά κατηγορίες βάρους (≤ 130 gr, 131-150 gr, 151-170 gr, 171-190 gr, ≥ 191 gr). *Στατιστικά σημαντική διαφορά της τιμής του HCT των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP και με τη μέθοδο Rubinstein, $p < 0,05$.



Εικόνα 36. Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα όλων των παραμέτρων που διερευνήθηκαν για την σύγκριση των δύο μεθόδων μείωσης όγκου των μονάδων ΟΠ.Α

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μέθοδος AXP είναι μία ημι-αυτόματη μέθοδος, στην εκτέλεση της οποίας, η επίδραση του ανθρώπινου παράγοντα είναι περιορισμένη. Η κατανομή των έμμορφων στοιχείων του ΟΠ.Α. στους κατάλληλους ασκούς, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αισθητήρων, οι οποίοι ελέγχουν τον όγκο και τη ροή του αίματος. Για το λόγο αυτό, η μέθοδος έχει ως αποτέλεσμα τη συλλογή πιο ποιοτικής και μεγάλης ποσότητας τελικού προϊόντος (buffy coat) (Solves, 2012). Η χειροκίνητη μέθοδος διπλής φυγοκέντρησης απαιτεί λεπτούς χειρισμούς και εξειδικευμένο προσωπικό για τον διαχωρισμό των στοιχείων του ΟΠ.Α.. Λόγω του ότι υπεισέρχεται ο ανθρώπινος παράγοντας, η ανάκτηση των επιθυμητών κυτταρικών πληθυσμών και η ποιότητα της μονάδας ως μόσχευμα δεν είναι πάντα η βέλτιστη. Επίσης, πολύ σημαντικός παράγοντας για τη χειροκίνητη μέθοδο, είναι η χρήση HES, το οποίο όμως χρησιμοποιείται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς και δεν έχει εγκριθεί προς το παρόν για κλινική χρήση (Fasouliotis J Sozos, 2000).

Είναι πολύ σημαντικό το τελικό προϊόν να έχει μεγάλο αριθμό εμπύρηνων κυττάρων, μονοπύρηνων και κυρίως μεγάλο αριθμό αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, τα οποία εκφράζονται με το δείκτη CD34, καθώς επίσης και αιμοπετάλια, ο αριθμός των οποίων είναι μικρότερος σε σχέση με τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς. Όπως παρατηρήθηκε, η μέση ανάκτηση των CD34 κυττάρων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP ($95,78 \text{ ml} \pm 3,61$), καθώς και η μέση ανάκτηση των TNCs ($81,79 \text{ ml} \pm 1,06$) ήταν φανερά αυξημένη σε σύγκριση με τη μέση ανάκτηση των CD34 κυττάρων ($86,27 \% \pm 7$) και τη μέση ανάκτηση των TNCs ($75,64 \% \pm 2,02$) των μονάδων που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο Rubistein. Εξίσου σημαντικό είναι το buffy coat να είναι απαλλαγμένο από ερυθροκύτταρα, τα οποία δημιουργούν προβλήματα στην συμβατότητα των ομάδων αίματος κατά ABO και Reshus. Επίσης, κατά την κρυσταντήρηση τους, τα ερυθροκύτταρα δεν προστατεύονται από την ποσότητα του DMSO με αποτέλεσμα να «διαλύονται» και να απελευθερώνουν στο περιεχόμενο της μονάδας τα συστατικά

τους τα οποία μπορεί να είναι τοξικά για τα υπόλοιπα στοιχεία του αίματος. Κατά συνέπεια, θα πρέπει η τιμή του αιματοκρίτη των μονάδων να είναι χαμηλή, ακριβώς όπως παρατηρήθηκε στις μονάδες ΟΠ.Α., οι οποίες επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο AXP ($26,37 \% \pm 1,28$), σε αντίθεση με τις μονάδες που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο Rubinstein, στις οποίες η τιμή του αιματοκρίτη ήταν πολύ αυξημένη ($52,63 \% \pm 1,11$). Οι παράμετροι αυτοί είναι καθοριστικής σημασίας για την ποιότητα του μοσχεύματος, την επιλογή του από τα μεταμοσχευτικά κέντρα και την έκβαση της μεταμόσχευσης στον ασθενή (*Rubistein, 2009, Zingsem, 2003*).

Κατά την απόψυξη των μονάδων που επεξεργάστηκαν και με τις δύο μεθόδους μείωσης όγκου σε διάστημα 3 μηνών παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει μεγάλη απώλεια των CD34 κυττάρων και των TNCs σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων που είχαν οι μονάδες ΟΠ.Α. όταν κρυοσυντηρήθηκαν. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό για την ποιότητα των μονάδων και αποδεικνύει την ορθότητα των μεθόδων επεξεργασίας και κρυοσυντήρησης των μονάδων.

Μία εξίσου σημαντική παράμετρος που συμβάλλει στην πρόβλεψη του αποτελέσματος μιας μεταμόσχευσης είναι η ικανότητα των κυττάρων να σχηματίσουν αποικίες συγκεκριμένων κυττάρων της αιμοποιητικής σειράς (CFUs) (*Broxmeyer, 1989*). Όπως παρατηρήθηκε μετά τις αποψύξεις των μονάδων ΟΠ.Α. που επεξεργάστηκαν και με τις δύο μεθόδους επεξεργασίας, η δυναμικότητα και η ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων δεν επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό. Προσφάτως, διαπιστώθηκε ότι η επιτυχής έκβαση μιας μεταμόσχευσης συνδέεται πολύ στενά με τις μετρήσεις των CFU, ενώ λιγότερο στενά συνδέεται με το συνολικό αριθμό εμπύρηνων κυττάρων της μονάδας ΟΠ.Α. (*Page, 2012*).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι οι μονάδες ΟΠ.Α., οι οποίες επεξεργάστηκαν με την ημι-αυτόματη μέθοδο AXP είχαν σταθερά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό σημαίνει, ότι η ανάκτηση των κυτταρικών πληθυσμών (TNCs, MNCs, CD34), οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μόσχευμα, ήταν αυξημένη, χωρίς να επηρεάζεται από τον αρχικό όγκο των μονάδων. Αντίθετα, οι μονάδες ΟΠ.Α., οι οποίες επεξεργάστηκαν με την χειροκίνητη μέθοδο διπλής φυγοκέντρησης Rubinstein, εμφάνισαν μειωμένη ανάκτηση των TNC και των αιμοπεταλίων συγκρινόμενες με την ημι αυτόματη μέθοδο. Επίσης, οι μονάδες αυτές είχαν υψηλή τιμή του αιματοκρίτη, γεγονός που επηρεάζει πολύ την ποιότητα του μεσχεύματος και την επιλογή του από τα μεταμοσχευτικά κέντρα.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Συνιστάται περαιτέρω διερεύνηση της παρούσας μελέτης, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και ενδεχομένως συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους μείωσης όγκου (χειροκίνητη μέθοδος διπλής φυγοκέντρησης Rubinstein και ημι-αυτόματη μέθοδος AXP) με μία τρίτη, αυτόματη μέθοδο, όπως είναι το Sepax.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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., A closed system for the clinical banking of umbilical cord blood. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35(3):389-97.
- Ali H, Al-Mulla F. Defining umbilical cord blood stem cells. *Stem Cell Discovery*, 2012, 2(1):15-23.
- Alkindi S, Dennison D., Umbilical Cord Blood Banking and Transplantation: A short review. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2011, 11(4):455-61.
- Altin G. Joseph, Erica K. Sloan, The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation, *Immunology and Cell Biology*, 1997, 75, 430-445
- Amy H. Yin, Sheri Miraglia, Esmail D. Zanjani, Graca Almeida-Porada, Makio Ogawa, Anne G. Leary, Johanna Olweus, John Kearney and David W. Buck, AC133 a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells, *Blood*, 2014, 1997 90: 5002-5012.
- Apperley J., Carreras E., Gluckman E., Gratwohl A., Masszi T., Haematopoietic stem cell transplantation, *European School of Haematology*, revised edition, France, 2008.
- Armson BA., Umbilical cord blood banking: implications for perinatal care providers. *J Obstet Gynaecol Can*, 2005, 27(3):263-90.
- Brown Michael and Wittwer Carl, *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*, Clinical Chemistry, 2000, 1221–1229.
- Broxmeyer H.E., G.W. Douglas, Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic/stem progenitor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 86, 1989, 3828–3832.
- Derek K. Marsee, Geraldine S. Pinkus, and Hongbo Yu, CD71 (Transferrin Receptor) An Effective Marker for Erythroid Precursors in Bone Marrow Biopsy Specimens, *American Society for Clinical Pathology*, 2010.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315-7.
- Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE., Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, 2012, 3;10(2):120-36.
- Duchez Pascale, Jean Chevaleyre, Philippe Brunet de la Grange, Marija Vlaski, Jean-Michel Boiron, Guy Wouters, and Zoran Ivanovic, Cryopreservation of hematopoietic stem and

progenitor cells amplified ex vivo from cord blood CD34+ cells, *TRANSFUSION*, 2013, 53:2012-2019.

- Dunckley H., HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol*, 2012, 882:9-25.
- Fasouliotis J. Sozos, Joseph G. Schenker, Human umbilical cord blood banking and transplantation: a state of the art, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 90, 2000, 13–25.
- Fey P. L. Van Der DIJs, Gita A. van den Berg, John G. Schermer, Fred D. Muskiet, Hans Landman, Frits A. J. Muskiet, Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassemia by HPLC, 1992, *CLIN. CHEM.* 38/9, 1864-1869.
- Gluckman Eliane, Hal E. Broxmeyer, Arleen D. Auerbach, Henry S. Friedman, Gordon W. Douglas, Agnès Devergie, Hélène Esperou, Dominique Thierry, Gérard Socie, Pierre Lehn, Scott Cooper, Denis English, Joanne Kurtzberg, Judith Bard, and Edward A. Boyse, *N Engl J Med* 1989; 321:1174-1177 1989DOI: 10.1056/NEJM198910263211707
- Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med.* 1997; 337:373-381.
- Gluckman E, Ruggeri A, Rocha V, Baudoux E, Boo M, Kurtzberg J, Welte K, Navarrete C, van Walraven SM, Family-directed umbilical cord blood banking. *Haematologica*, 2011, 96(11):1700-7.
- Goldsby R., Kindt T., Osborne B, Kuby J. *Ανοσολογία*, 5η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα..
- Harris DT., Collection, Processing, and Banking of Umbilical Cord Blood Stem Cells for Clinical Use in Transplantation and Regenerative Medicine. *LabMedicine.*, 2008, 39(3):173-178.
- Harris DT., Optimizing cord blood sample cryopreservation. *Cytotherapy*, 2012, 14(3):359-65.
- Hoffbrand A. V., Moss P. A. H. and Pettit J. E., *Βασική Αιματολογία*, 5η έκδοση, επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2009, ISBN: 978-960-394-579-6.
- Kita K, Lee JO, Finnerty CC, Herndon DN., Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. *Stem Cells Int*, 2011, 276193.
- Kumo Takeshi, Yuichi Tomizawa, Mikiko Kita, Haruo Takabayashi, Eiichi Tamiya and Yuzuru Takamura, Concentration and extraction chip of fetal nucleated red blood cell (NRBC) by micro gap with diaphragm for fetal DNA diagnosis from maternal blood., *CBMS*, 2010, 978-0-9798064-3-8.
- 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., Prospective flow cytometric evaluation of nucleated red blood cells in cord blood units and relationship with nucleated and CD34(+) cell quantification. *Transfusion*, 2006, 46(3):403-6.

- Laura E. Sidney, Matthew J. Branch, Siobhan E. Dunphy, Harminder S. Dua, Andrew Hopkinson, Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors, *Stem Cells*, 2014.
- Laurenti E, Dick JE., Molecular and functional characterization of early human hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1266:68-71.
- Lensch MW., An evolving model of hematopoietic stem cell functional identity. *Stem Cell Rev*, 2012, 8(2):551-60.
- Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001;86:1099-1100.
- Mayani H, Lansdorp PM., Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 1998, 16(3):153-65.
- Merlin G. Butler, Jay E. Menitove, Umbilical cord blood banking: an update, *Stem Cell Biology*, 2011, 28:669–676.
- Navarrete C, Contreras M., Cord blood banking: a historical perspective. *Br J Haematol*, 2009, 47(2):236-45.
- 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., Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood*, 2011), 118(23):e180-3.
- Oscar K. Lee, Tom K. Kuo, Wei-Ming Chen, Kuan-Der Lee, Shie-Liang Hsieh and Tain-Hsiung Chen, Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, *Blood*, 2004 103: 1669-1675.
- Page KM, Zhang L., Mendizabal A., Wease S., Carter S., Shoulars K., Gentry T., Balber AE, Kurtzberg J. The Cord Blood Agar: a novel scoring system to optimize selection of banked cord blood grafts for transplantation (CME). *Transfusion* 2012;52:272-83
- Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, Balber AE, Kurtzberg J., 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*, 2011, 17(9):1362-74.
- Pelosi E, Castelli G, Testa U., 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*, 2012, 15;49(1):20-8.
- Picardi A, Arcese W., Quality assessment of cord blood units selected for unrelated transplantation: a transplant center perspective. *Transfus Apher Sci*, 2010, 42(3):289-97.
- Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarrat A, Marit G, Moulinier J, Broustet A., Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol.*, 1986, 14:312-5.

- Regan DM, Wofford JD, Wall DA., Comparison of cord blood thawing methods on cell recovery, potency, and infusion. *Transfusion*, 2010, 50(12):2670-5.
- Rocha Vanderson, Gluckman Eliane, Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group, Clinical Use of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2006, 12:34-41.
- Rubinstein Pablo, Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2009, 44(10):635-42.
- Salem HK, Thiemermann C., Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, 2010, 31;28(3):585-96.
- Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm J, Ward W, McNiece IK, Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 2002;8(7):368-76.
- Smith A., A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 2006, 441:1060.
- Solves P, Mirabet V, Roig R., Volume reduction in routine cord blood banking. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010, 5(4):362-6.
- Solves Pilar, Planelles Dolores, Vicente Mirabet, Amando Blanquer, Francisco Carbonell-Uberos, Qualitative and quantitative cell recovery in umbilical cord blood processed by two automated devices in routine cord blood banking: a comparative study, *Blood Transfus* 2013, 11: 405-11 DOI 10.2450/2012.0037-12.
- Spellman R. Stephen, Mary Eapen, Brent R. Logan, Carlheinz Mueller, Pablo Rubinstein, Michelle I. Setterholm, Ann E. Woolfrey, Mary M. Horowitz, Dennis L. Confer, and Carolyn K. Hurley, A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation, *Blood*, 2012, July 12; 120(2): 259–265, PMID: PMC3398760.
- Tse W, Laughlin MJ., Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005, 377-83.
- Wilkerson MJ., Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2012, 42(1):53-71.
- Xiong Jian-Ping, Thilo Stehle, Beate Diefenbach, Rongguang Zhang, Reinhardt, Dunker, David L. Scott, Andrzej Joachimiak, Simon L. Goodman, and M. Amin Arnaout, Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha V\beta 3$, NIH Public Access, 2001 October 12; 294(5541): 339–345.
- Γερμενής Ε. Αναστάσιος, *Ιατρική Ανοσολογία*, 1η έκδοση, εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, 2000, ISBN: 960-02-1397-6.
- Ιωαννίδου Α. Παπακωνσταντίνου, *Αιματολογία Ι*, 1η έκδοση, Βήτα Ιατρικές Εκδόσεις, Αθήνα, 2003, ISBN: 987-960-8071-57-5.

- Ιωαννίδου Παπακωνσταντίνου Α., Αιματολογία II, Βήτα Ιατρικές Εκδόσεις, Αθήνα, ISBN: 978-960-452-042-8.
- Πάγκαλης Α. Γεράσιμος, Αιματολογία στην κλινική πράξη, εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης ΕΠΕ, Αθήνα, 2008, ISBN: 978-960-399-776-4.

Πίνακας 6. Μονάδες ΟΠ.Α. που επεξεργάστηκαν με την ημι-αυτόματη μέθοδο ΑΧΡ.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΩΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ	ΩΡΑ ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ	ΩΡΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΠΟΨΥΞΗΣ	ΩΡΑ ΑΠΟΨΥΞΗΣ
ΑΧΡ 1	31/10/2013	18:30	01/11/2013	11:00	01/11/2013	13:00	03/02/2014	11:30
ΑΧΡ 2	06/11/2013	15:45	07/11/2013	10:30	07/11/2013	12:30	07/02/2014	13:00
ΑΧΡ 3	05/11/2013	20:00	07/11/2013	10:30	07/11/2013	12:30	07/02/2014	13:00
ΑΧΡ 4	07/11/2013	13:20	08/11/2013	12:00	08/11/2013	14:00	10/02/2014	12:30
ΑΧΡ 5	10/11/2013	08:00	12/11/2013	11:15	12/11/2013	13:30	12/02/2014	13:30
ΑΧΡ 6	13/11/2013	22:15	15/11/2013	10:00	15/11/2013	12:45	17/02/2014	12:00
ΑΧΡ 7	14/11/2013	00:30	15/11/2013	10:00	15/11/2013	12:45	17/02/2014	12:00
ΑΧΡ 8	14/11/2013	14:45	15/11/2013	10:00	15/11/2013	12:45	17/02/2014	12:00
ΑΧΡ 9	18/11/2013	09:10	20/11/2013	12:00	20/11/2013	12:00	20/02/2014	11:30
ΑΧΡ 10	20/11/2013	11:00	21/11/2013	11:30	21/11/2013	13:30	21/02/2014	11:30
ΑΧΡ 11	24/11/2013	23:20	26/11/2013	11:45	26/11/2013	14:00	26/02/2014	12:00
ΑΧΡ 12	25/11/2013	14:30	26/11/2013	11:45	26/11/2013	14:00	26/02/2014	12:00
ΑΧΡ 13	28/11/2013	12:30	29/11/2013	12:00	29/11/2013	14:10	03/03/2014	11:15
ΑΧΡ 14	30/11/2013	07:30	02/12/2013	10:45	02/12/2013	12:45	03/03/2014	11:15
ΑΧΡ 15	30/11/2013	12:20	02/12/2013	10:45	02/12/2013	12:45	04/03/2014	12:20
ΑΧΡ 16	01/12/2013	15:40	02/12/2013	10:45	02/12/2013	12:45	04/03/2014	12:20
ΑΧΡ 17	05/12/2013	10:00	06/12/2013	11:00	06/12/2013	13:30	06/03/2014	11:45
ΑΧΡ 18	05/12/2013	13:15	06/12/2013	11:00	06/12/2013	13:30	06/03/2014	11:45
ΑΧΡ 19	10/12/2013	18:40	11/12/2013	13:00	11/12/2013	15:00	11/03/2014	12:00
ΑΧΡ 20	11/12/2013	13:00	13/12/2013	11:15	13/12/2013	13:30	13/03/2014	13:00
ΑΧΡ 21	12/12/2013	07:30	13/12/2013	11:15	13/12/2013	13:30	13/03/2014	13:00
ΑΧΡ 22	15/12/2013	22:40	17/12/2013	10:00	17/12/2013	12:30	17/03/2014	12:30
ΑΧΡ 23	16/12/2013	06:00	17/12/2013	10:00	17/12/2013	12:30	17/03/2014	12:20
ΑΧΡ 24	16/12/2013	21:00	18/12/2013	11:00	18/12/2013	13:15	18/03/2014	13:20
ΑΧΡ 25	17/12/2013	02:30	18/12/2013	11:00	18/12/2013	13:15	18/03/2014	13:20
ΑΧΡ 26	17/12/2013	22:15	18/12/2013	11:00	18/12/2013	13:15	18/03/2014	13:20
ΑΧΡ 27	26/12/2013	17:50	27/12/2013	11:30	27/12/2013	13:40	27/03/2014	13:00
ΑΧΡ 28	28/12/2014	00:45	30/12/2013	10:30	30/12/2013	12:50	31/03/2014	12:30
ΑΧΡ 29	29/12/2013	18:15	31/12/2013	11:20	31/12/2013	13:40	02/04/2014	11:30
ΑΧΡ 30	30/12/2013	10:10	31/12/2013	11:20	31/12/2013	13:40	02/04/2014	11:30

Πίνακας 7. Μονάδες ΟΠ.Α. που επεξεργάστηκαν με τη χειροκίνητη μέθοδο διπλής φυγοκέντρησης.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΩΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ	ΩΡΑ ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ	ΩΡΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΠΟΨΥΞΗΣ	ΩΡΑ ΑΠΟΨΥΞΗΣ
RUBI 1	02/10/2013	23:20	04/11/2013	11:30	04/11/2013	13:30	03/02/2014	11:30
RUBI 2	04/11/2013	14:30	05/11/2013	11:45	05/11/2013	14:00	07/02/2014	12:00
RUBI 3	04/11/2013	12:30	05/11/2013	11:45	05/11/2013	14:00	07/02/2014	12:00
RUBI 4	05/11/2013	07:30	06/11/2013	12:00	06/11/2013	14:10	10/02/2014	11:15
RUBI 5	10/11/2013	08:00	11/11/2013	11:15	11/11/2013	13:30	11/02/2014	13:30
RUBI 6	13/11/2013	22:15	13/11/2013	10:00	13/11/2013	12:45	13/02/2014	12:00
RUBI 7	14/11/2013	00:30	13/11/2013	10:00	13/11/2013	12:45	13/02/2014	12:00
RUBI 8	14/11/2013	14:45	14/11/2013	10:30	14/11/2013	13:00	14/02/2014	12:30
RUBI 9	18/11/2013	10:10	19/11/2013	11:00	19/11/2013	13:00	19/02/2014	11:30
RUBI 10	21/11/2013	08:00	22/11/2013	12:30	22/11/2013	14:30	24/02/2014	11:30
RUBI 11	23/11/2013	22:20	25/11/2013	11:45	25/11/2013	15:00	25/02/2014	12:00
RUBI 12	24/11/2013	10:30	25/11/2013	11:45	25/11/2013	15:00	25/02/2014	12:00
RUBI 13	26/11/2013	04:30	27/11/2013	10:00	27/11/2013	12:10	27/02/2014	11:15
RUBI 14	26/11/2013	23:30	28/11/2013	11:30	28/11/2013	13:45	28/02/2014	11:15
RUBI 15	01/11/2013	12:20	03/12/2013	10:45	03/12/2013	12:45	05/03/2014	13:20
RUBI 16	02/12/2013	14:40	03/12/2013	10:45	03/12/2013	12:45	05/03/2014	13:20
RUBI 17	04/12/2013	09:00	05/12/2013	10:30	05/12/2013	12:30	07/03/2014	13:00
RUBI 18	04/12/2013	10:45	05/12/2013	10:30	05/12/2013	12:30	07/03/2014	13:00
RUBI 19	07/12/2013	20:40	09/12/2013	11:00	09/12/2013	13:10	09/03/2014	13:30
RUBI 20	08/12/2013	12:30	09/12/2013	11:00	09/12/2013	13:10	09/03/2014	13:30
RUBI 21	12/12/2013	07:30	12/12/2013	10:15	12/12/2013	12:30	12/03/2014	12:00
RUBI 22	15/12/2013	22:40	16/12/2013	10:45	16/12/2013	13:00	19/03/2014	11:20
RUBI 23	16/12/2013	06:00	16/12/2013	10:45	16/12/2013	13:00	19/03/2014	11:20
RUBI 24	16/12/2013	21:00	19/12/2013	11:00	19/12/2013	13:15	19/03/2014	11:20
RUBI 25	17/12/2013	02:30	19/12/2013	11:00	19/12/2013	13:15	19/03/2014	11:20
RUBI 26	17/12/2013	22:15	19/12/2013	11:00	19/12/2013	13:15	19/03/2014	11:20
RUBI 27	21/12/2013	17:50	23/12/2013	10:00	23/12/2013	12:10	24/03/2014	11:00
RUBI 28	22/12/2014	00:45	23/12/2013	10:00	23/12/2013	12:15	24/03/2014	11:00
RUBI 29	29/12/2013	18:15	03/01/2014	11:50	03/01/2014	14:00	03/04/2014	12:30
RUBI 30	30/12/2013	10:10	03/01/2014	11:50	03/01/2014	14:00	03/04/2014	12:30