

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής κ.Τσακρής Αθανάσιος

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑΣ ΚΡΥΟΚΑΤΑΨΥΞΗΣ
ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΑΝΑΓΝΩΣΤΑΚΗΣ

ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Αθανάσιος Τσακρής

Καθηγητής Μικροβιολογίας

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Καθηγητής Α. Τσακρής

Μέλη: Καθηγητής Γ. Πάγκαλης

Καθηγητής Ι. Μελέτης

Ορισμός τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:	19/7/07
Ορισμός του θέματος της διδακτορικής διατριβής:	20/2/08
Ορισμός επταμελούς επιτροπής:	18/3/14

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Καθηγητής Μελέτιος Αθανάσιος Δημόπουλος

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Γ. Πάγκαλης
Καθηγητής Ι. Μελέτης
Καθηγητής Α. Τσακρής
Καθηγητής Β. Γοργούλης
Αν.Καθηγητής Π. Παναγιωτίδης
Αν. Καθηγήτρια Β. Κασιμάλη
Αν. Καθηγήτρια Β. Πιτυρίγκα

ΒΑΘΜΟΣ

« ΑΡΙΣΤΑ »

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αποτέλεσμα συνεργασίας του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και της Ελ.Τρ.Ο.Π.Α (Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος) που υπάγεται στο Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α (Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών).

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή της Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου κ.Αθανάσιο Τσακρή και επιβλέπων μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής καθώς και τους Καθηγητές Αιματολογίας και μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κ. Πάγκαλη Γεράσιμο και κ.Μελέτη Ιωάννη για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον Καθηγητή κ.Αθανάσιο Τσακρή για την πολύτιμη συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής. Η καταφανής επιστημονική του κατάρτιση, καθώς και οι συνεχείς συμβουλές και υποδείξεις του υπήρξαν αδιαμφισβήτητα ανεκτίμητες.

Αληθινή ευγνωμοσύνη επίσης, οφείλω στην κ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκιόκα, Διευθύντρια της Ελ.Τρ.Ο.Π.Α, χωρίς την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση της οποίας η προσπάθειά μου δε θα ήταν δυνατόν ούτε να ξεκινήσει.

Ευχαριστώ, τέλος, το προσωπικό της Ελ.Τρ.Ο.Π.Α και ιδιαίτερος τους κ.κ. Παππασάββα Ανδρέα, Μιχαλόπουλο Ευστάθιο και Χατζησταματίου Θεοφάνη για την συνεχή υποστήριξη που μου παρείχαν σε κάθε στάδιο της επίπονης, είναι αλήθεια, εκπόνησης της παρούσης διατριβής.

Ο Ὀρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγείαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρῆζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρῆζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄδ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήϊης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιπορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Ο Όρκος του Ιπποκράτη (μετάφραση)

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους θεούς και τις θεές, που βάζω μάρτυρες, ότι θα εκπληρώσω τον όρκο μου αυτό και το συμβόλαιο αυτό, σύμφωνα με τη δύναμη και την κρίση μου.

Ότι θα θεωρώ εκείνον, που μου δίδαξε την τέχνη αυτή ίσο με τους γονείς μου και θα τον κάνω κοινωνό του βίου μου και θα του προσφέρω από τα δικά μου ό,τι χρειάζεται· τους απογόνους του θα θεωρώ αδελφούς μου και θα τους διδάξω την τέχνη αυτή, αν επιθυμούν να τη μάθουν, χωρίς μισθό και χωρίς συμφωνία. Ότι θα μεταδώσω τους επαγγελματικούς κανόνες, τα θεωρητικά μαθήματα και τις υπόλοιπες κάθε είδους ασκήσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και σε μαθητές, που θα έχουν συνδεθεί μαζί μου με όρκο και συμβόλαιο, κατά τη συνήθεια των γιατρών και σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιήσω τη θεραπευτική δίαιτα μόνο για ωφέλεια των αρρώστων, όσο εξαρτάται από τη δύναμη και την κρίση μου και (υπόσχομαι ότι) θα τους προφυλάξω από κάθε βλάβη και αδικία.

Δεν θα χορηγήσω θανατηφόρο φάρμακο σε κανέναν, όσο κι αν παρακληθώ, ούτε θα υποδείξω τέτοια συμβουλή. Επίσης δεν θα δώσω σε γυναίκα φάρμακο εκτρωτικό.

Αγνή και καθαρή θα διατηρήσω τη ζωή και την τέχνη μου.

Δεν θα χειρουργήσω οπωσδήποτε αυτούς, που πάσχουν από πέτρα, αλλά θα αφήσω την πράξη αυτή στους εξασκημένους.

Σε όσα σπίτια προσκαλούμαι, θα μπαίνω για το καλό των αρρώστων, κρατώντας τον εαυτό μου μακριά από κάθε θεληματική αδικία ή άλλη διαφθορά και προ πάντων μακριά από κάθε αφροδισιακή πράξη σε σώματα γυναικών και ανδρών, ελευθέρων ή δούλων.

Όσα κατά τη διάρκεια της θεραπείας θα δω ή θα ακούσω ή και πέρα από τη θεραπεία στην καθημερινή ζωή, όσα δεν πρέπει ποτέ να κοινολογούνται στους έξω, θα τα αποσιωπήσω, θεωρώντας ότι αυτά είναι ιερά μυστικά.

Όσο λοιπόν θα τηρώ τον όρκο μου αυτό και δεν θα τον παραβιάζω, είτε να πετυχαίνω στη ζωή και στην τέχνη μου, έχοντας πάντοτε καλό όνομα ανάμεσα στους ανθρώπους· αν όμως τον παραβώ και γίνω επίορκος, να πάθω τα αντίθετα.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΝΑΓΝΩΣΤΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ-ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ : Αναγνωστάκης
ΟΝΟΜΑ : Ιωάννης
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ : Χρήστος
ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 08-03-1966
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ : Έγγαμος, 1 παιδί

ΒΑΣΙΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΠΤΥΧΙΟ ΣΧΟΛΗΣ : Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ.
ΕΤΟΣ ΑΠΟΦΟΙΤΗΣΗΣ : 1990

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

- A.** ΤΙΤΛΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ: **Ιατρική Βιοπαθολογία**
ΕΤΟΣ ΚΤΗΣΕΩΣ : **1999**
- B.** ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ.
ΙΔΡΥΜΑ : **Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας.**
ΕΤΟΣ ΚΤΗΣΕΩΣ: **2003**

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

A. ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗΣ

ΦΟΡΕΑΣ : Υπουργείο Εθνικής Άμυνας / ΑΣΥΕ.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ : Στρατιωτικός Ιατρός.

ΘΕΣΗ : Μέλος της Ανωτάτης Στρατιωτικής Υγειονομικής Επιτροπής.

B. ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

- 1993-99** Ειδικευόμενος στη Βιοπαθολογία (Μικροβιολογία) στο 401 ΓΣΝΑ για 1 έτος και στο Π.Γ.Ν.Α «Γ. Γεννηματάς» τα υπόλοιπα 4 έτη.
- 1999-2001** Δντης Μικροβιολογικού Εργαστηρίου Στρατιωτικού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης.
- 2001-02** Επιμελητής Μικροβιολογικού Εργαστηρίου 401 Γενικού Στρατιωτικού Νοσοκομείου Αθηνών.
- 2002-03** Μεταπτυχιακός Σπουδαστής στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας (Ε.Σ.Δ.Υ.) στο τμήμα Λειτουργών Δημόσιας Υγείας.
- 2003-04** Επιμελητής Μικροβιολογικού Εργαστηρίου 401 Γενικού Στρατιωτικού Νοσοκομείου Αθηνών.
- 2004-05** Τοποθετημένος στη Διεύθυνση Υγειονομικού του Γεν. Επιτελείου Εθν. Άμυνας ως χειριστής θεμάτων Προληπτικής Ιατρικής στις Ε.Δ.
- 2005-07** Επιμελητής Μικροβιολογικού Εργαστηρίου 417 Νοσηλευτικού Ιδρύματος Μετοχικού Ταμείου Στρατού.
- 2008-14** Μέλος της Ανωτάτης Στρατού Υγειονομικής Επιτροπής.

ΞΕΝΗ ΓΛΩΣΣΑ

Αγγλικά : (F.C.E. Cambridge).

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ-ΗΜΕΡΙΔΕΣ

1. 2^η Επιστημονική Ημερίδα της Ελληνικής Εταιρίας Λοιμώξεων, 20 Ιανουαρίου 1996, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.
2. FEMS 98 SUPPORTED MEETING “Little known organisms of clinical importance”, 16-18 Sept., Athens, GREECE.
3. Εργαστηριακές Μέθοδοι Μελέτης Οξέων Λευχαιμιών, 16 Μαΐου 1998, Ελληνική Αιματολογική Εταιρία.
4. 18^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας-Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 1-3 Απριλίου 1998, Ξενοδοχείο HILTON.
5. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής στο χώρο του Νοσοκομείου, 3-5 Μαρτίου 1999, Πολεμικό Μουσείο.
6. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Γλυφάδα, 9-11 Νοεμβρίου 2000.
7. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, 31 Οκτωβρίου ως 2 Νοεμβρίου 2001, Ξενοδοχείο DIVANI- CARAVEL.
8. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής στο χώρο του Νοσοκομείου, 21-23 Μαρτίου 2001, Πολεμικό Μουσείο Αθηνών.
9. 12^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 22-25 Νοεμβρίου 2001.
10. 20^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας- 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 13-16 Μαρτίου 2002, Αθήνα.
11. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών υγείας, 25-27 Φεβρουαρίου 2002, Αθήνα, Ξενοδοχείο DIVANI-CARAVEL.
12. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προαγωγής και αγωγής Υγείας, 5-6 Δεκεμβρίου 2002, Αθήνα.
13. 14^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 13-16 Νοεμβρίου 2003, Αλεξανδρούπολη.
14. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας. 16-18 Φεβρουαρίου, Αθήνα, Ξενοδοχείο DIVANI-CARAVEL.
16. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 31 Μαρτίου ως 3 Απριλίου 2004, Θεσσαλονίκη, Ξενοδοχείο MACEDONIA PALACE.
17. 30^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 27 Απριλίου ως 1 Μαΐου 2004, Αθήνα.

18. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, 11-13 Νοεμβρίου 2004, Αθήνα.
19. 15^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 24-28 Νοεμβρίου 2004, Αθήνα.
20. 2^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας-8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, 24-26 Φεβρουαρίου 2005, Πολεμικό Μουσείο.
21. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοχημείας, 14-17 Απριλίου 2005, Πολεμικό Μουσείο.
22. 16^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 16-19 Νοεμβρίου 2005, Θεσσαλονίκη.
23. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 12-15 Απριλίου 2006, Ξενοδοχείο HILTON.
24. 17^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.
25. Ημερίδα με θέμα: «Μεταβολισμός του σιδήρου και οι διαταραχές του», 3 Μαρτίου 2007, Αθήνα.
26. 33^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 5 Μαΐου 2007, Αθήνα.
27. 5^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 9-12 απριλίου 2008, Θεσσαλονίκη.
28. 6^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομιακών Λοιμώξεων 27 Φεβρουαρίου έως 1 Μαρτίου 2013, Αθήνα.
29. 5^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας 17 έως 19 Οκτωβρίου 2013, Αθήνα.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ-ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ

1. Μεταπτυχιακά Μαθήματα Κλινικής Βιοχημείας κατά το Ακαδημαϊκό έτος 1994-95, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών-Ιατρική Σχολή.
2. Ταχύρυθμο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας περιόδου Νοεμβρίου 1996- Φεβρουαρίου 1997.
3. Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα : Φάρμακο-Φαρμακοκινητική, Εργαστηριακή Διερεύνηση και Κλινική Πράξη, 27 Μαΐου 1995, Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Βιοχημείας.
4. Ταχύρυθμο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας περιόδου Νοεμβρίου 1997- Φεβρουαρίου 1998.
5. Επιστημονικές Συνεδρίες της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας της Περιόδου Οκτωβρίου 1996-Ιουνίου 1997.
6. Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα: «Τα Αυτοαντισώματα στην Κλινική Πράξη», 19 Σεπτεμβρίου 2001 ως 19 Δεκεμβρίου 2001, Ταμείο Υγείας Προσωπικού Αγροτικής Τράπεζας της Ελλάδος, Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας.

7. Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: «Η συμβολή της Μοριακής Βιολογίας στους τέσσερις Εργαστηριακούς κλάδους», 14 Μαρτίου 2002, Ξενοδοχείο INTERCONTINENTAL, 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας.
8. Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: « Αντιβιοτικά-Μικροβιακή αντοχή-κλινική επιλογή», 14 Μαρτίου 2002, Ξενοδοχείο INTERCONTINENTAL, 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας.
9. Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: « Η Εργαστηριακή Προσέγγιση των επιπολής και δέρματος μυκητιάσεων», 10 Δεκεμβρίου 2003, Ημέρες κλινικής Μικροβιολογίας, Πολεμικό μουσείο.
10. Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: « Οροδιαγνωστική των Ιώσεων», 11 Δεκεμβρίου 2003, Ημέρες κλινικής Μικροβιολογίας, Πολεμικό μουσείο.
11. Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: « Η συμβολή του μυελογράμματος στη διαγνωστική», 1 Απριλίου 2004, 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Ξενοδοχείο MACEDONIA PALACE.
12. Σεμινάριο με θέμα: « 2^{ος} Δεκάλογος στις Λοιμώξεις», 19 Φεβρουαρίου 2006, Αθήνα.
13. Κλινικό Φροντιστήριο: « Εργαστηριακή Προσέγγιση στη Φυματίωση», 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 12-15 Απριλίου 2006, Ξενοδοχείο HILTON.
15. Κλινικό Φροντιστήριο: « Η κυτταρομετρία ροής στη διάγνωση των αιματολογικών νοσημάτων», 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 12-15 Απριλίου 2006, Ξενοδοχείο HILTON.
16. Κλινικό Φροντιστήριο: « Το αντιβιογράμμα των Gram (+) κόκκων και η ερμηνία του», 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 9-12 Απριλίου 2008, Ξενοδοχείο MACEDONIA PALACE.
17. Κλινικό Φροντιστήριο: «Προβλήματα διάγνωσης στις παρασιτικές λοιμώξεις », 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 9-12 Απριλίου 2008, Ξενοδοχείο MACEDONIA PALACE.

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ
ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. **SUCCESSFUL SHORT-TERM CRYOPRESERVATION OF VOLUME-REDUCED CORD BLOOD UNITS IN A CRYOGENIC MECHANICAL FREEZER: EFFECTS ON CELL RECOVERY, VIABILITY, AND CLONOGENIC POTENTIAL.**

Anagnostakis I, Papassavas AC, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Andriopoulou S, Tsakris A, Stavropoulos-Giokas C.

Hellenic Cord Blood Bank, Foundation for Biomedical Research, Academy of Athens; Department of Immunology and National Tissue Typing Center, "G. Gennimatas" General Hospital; Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece. Transfusion. 2014;54:211-223.

2. **CORD BLOOD BANKING OF VOLUME REDUCED DOUBLE CORD BLOOD SUBUNITS DERIVED FROM THE SAME HIGH VOLUME CORD BLOOD DONOR TO ENCOURAGE THE TRANSPLANTATION IN ADULTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCY**

A. Papassavas^{1,2}, V. Gioka¹, T. Chatzistamatiou¹, T. Kokkinos¹, I. Anagnostakis¹, G. Gecka¹, G. Paterakis², C. Stavropoulos-Giokas^{1,2}

¹Hellenic Cord Blood Bank, Foundation for Biomedical Research, Academy of Athens Athens, GREECE, ²Department of Immunology and National Tissue Typing Centre, General Hospital "G. Gennimatas", Athens, GREECE
ISCT 2005 Annual Meeting Abstracts, Cytotherapy, Volume 7: supplement 1 2005 ISSN 1465-3249

3. **THE HELLENIC CORD BLOOD BANK (HHCB): DEVELOPMENT OF A NEW STRATEGY FROM CORD BLOOD BANKING IN ORDER TO MAXIMIZE THE NUMBER OF THE HAEMATOPOIETIC STEM CELLS PROVIDED FOR TRANSPLANTATION**

A. Papassavas^{1,2}, T. Chatzistamatiou¹, V. Gioka¹, T. Kokkinos¹, I. Anagnostakis¹, G. Gecka¹, G. Paterakis², C. Stavropoulos-Giokas^{1,2}

¹Hellenic Cord Blood Bank, Foundation for Biomedical Research, Academy of Athens, Hellenic Cord Blood Bank, Athens, GREECE, ²Department of Immunology and National Tissue Typing Centre, General Hospital "G. Gennimatas", Athens, GREECE
EBMT Abstract Book (Prague, March 20-23 2005), Bone Marrow Transplantation, Volume 35, Supplement 2 ISSN 0268-3369.

4. **ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (Ελ.Τρ.ΟΠ.Α)**

Α. Παπασάββας^{1,4}, Β. Γκικόκα¹, Θ. Χατζησταματίου¹, Θ. Κόκκινος¹, Ι. Αναγνωστάκης¹, Γ. Γκέκα¹, Γ. Πατεράκης⁴, Μ. Σπυροπούλου-Βλάχου³, Α. Κουτσούκου³, Π. Σιδεράς², Α. Σταυροπούλου-Γκικόκα^{1,4}

¹Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος και ²Εργαστήριο Ανοσολογίας, Κέντρο Μεταμοσχεύσεων, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΠΒΕΑΑ), ³Μικροβιολογικό εργαστήριο, Νοσοκομείο «Κ.Α.Τ.», ⁴Τμήμα Ανοσολογίας & Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Γ. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ»
16^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 16-19 Νοεμβρίου 2005, Προφορική Ανακοίνωση

5. **ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΑΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΕΣ**

Α. Παπασάββας^{1,2}, Θ. Κόκκινος¹, Θ. Χατζησταματίου¹, Β. Γκικόκα¹, Ι. Αναγνωστάκης¹, Γ. Γκέκα¹, Γ. Πατεράκης², Α. Σταυροπούλου-Γκικόκα^{1,2}

¹Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΠΒΕΑΑ), ²Τμήμα Ανοσολογίας & Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Γ. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ»
16^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 16-19 Νοεμβρίου 2005, Αναρτημένη Ανακοίνωση

6. **ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΟΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Ι. Αναγνωστάκης¹, Α. Παπασάββας^{1,2}, Θ. Κόκκινος¹, Θ. Χατζησταματίου¹, Γ. Πατεράκης², Α. Σταυροπούλου-Γκικόκα^{1,2}

¹Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΠΒΕΑΑ), ²Τμήμα Ανοσολογίας & Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Γ. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ»
16^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 16-19 Νοεμβρίου 2005, Αναρτημένη Ανακοίνωση.

7. **THE CD133⁺ HAEMATOPOIETIC STEM CELLS CONTENT OF THE CORD BLOOD UNITS IS A BETTER PREDICTIVE INDEX OF THE COLONY FORMING UNITS THAN THE CD34⁺ STEM CELLS QUANTITY**

T. Kokkinos¹, A. Papassavas^{1,2}, T. Chatzistamatiou¹, I. Anagnostakis¹, G. Paterakis², C. Stavropoulos-Giokas^{1,2}

¹Hellenic Cord Blood Bank, Foundation for Biomedical Research, Academy of Athens, Hellenic Cord Blood Bank, Athens, GREECE, ²Department of Immunology and National Tissue Typing Centre, General Hospital “G. Gennimatas”, Athens, GREECE
EBMT 2006 (Hamburg, March 19-22 2006)

8. A STRATEGY OF SPLITTING INDIVIDUAL HIGH VOLUME CORD BLOOD UNITS INTO TWO HALF SUBUNITS PRIOR TO PROCESSING INCREASES THE RECOVERY OF CELLS AND FACILITATES *EX VIVO* EXPANSION OF THE INFUSED HAEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN ADULTS

A.C.Papassavas^{*†}, V. Gioka^{*}, T. Chatzistamatiou^{*}, T. Kokkinos^{*}, I. Anagnostakis^{*}, G. Gecka^{*}, I. Redoukas^{*}, G. Paterakis[†], C. Stavropoulos-Giokas^{*†}

^{*}Hellenic Cord Blood Bank, Foundation for Biomedical Research, Academy of Athens, Hellenic Cord Blood Bank, Athens, GREECE, [†]Department of Immunology and National Tissue Typing Centre, General Hospital “G. Gennimatas”, Athens, GREECE. Int J Lab Hematol. 2008 Apr;30(2):124-32.

	<u>Σελίδα</u>
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	19-20
<u>A. Γενικό μέρος</u>	
1. Στελεχιαία κύτταρα (Stem cells-SC)	
1.1 Εισαγωγή	21-23
1.2 Μηχανισμός διαφοροποίησης στελεχιαίων κυττάρων ενηλίκων	23-24
1.3 Μεσεγχυματικά κύτταρα και στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα	24-25
1.4 Στελεχιαία και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (Haemopoietic stem and progenitor cells-HSPCs)	25-27
2. Αιμοποιητικά κύτταρα(HSPCs) του ομφαλοπλακουντιακού αίματος (Ο.Π.Α)	
2.1. Εισαγωγή	27-28
2.2. In vitro μέθοδοι μελέτης των HSPCs του Ο.Π.Α	
2.2.1. Φαινοτυπικός καθορισμός	28-32
2.2.2. Λειτουργικές μέθοδοι διερεύνησης (Functional assays)-διαφορές μεταξύ αιμοποιητικών κυττάρων Ο.Π.Α και μυελού των οστών	33-35
2.3. In vivo μέθοδοι μελέτης των HSPCs του Ο.Π.Α	35-38
2.4. Μικροπεριβάλλον (microenvironment) αιμοποίησης	38-41
2.5. Πολλαπλασιασμός (Proliferation) και έκπτυξη (Expansion) των HSPCs	42-46
2.6. Παραγωγή λεμφικών και ενδοθηλιακών κυττάρων από CD34 ⁺ του Ο.Π.Α	46-47
Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης (Genetic manipulation) των HSPCs	47-48
3. Κρυοκατάψυξη στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων του Ο.Π.Α	
3.1. Εισαγωγή	49-50
3.2. Συνθήκες-μέθοδοι κρυοκατάψυξης	
3.2.1. Θερμοκρασία-Ρυθμός ψύξης (Freezing rate)	50-52
3.2.2. Διάρκεια-χρόνος παραμονής του Ο.Π.Α. στην κρυοσυντήρηση	52-53
3.2.3. Κρυοσυντηρητικές (cryopreservatives) ουσίες σε χρήση	53-54
3.2.4. Βέλτιστη συγκέντρωση κυττάρων (MNCs, HSPCs)	54
3.3. Απόψυξη-ανασύσταση της μονάδας Ο.Π.Α	55-56
3.4. Λοιμώδεις παράγοντες και κρυοσυντήρηση μονάδων ΟΠΑ	56-57
3.5. Ποιοτικός έλεγχος(QC) των μονάδων Ο.Π.Α	58-59

4. Μεταμόσχευση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων	
4.1. Εισαγωγή	59-62
4.2. Είδη μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων	
4.2.1. Αυτόλογη μεταμόσχευση	63
4.2.2. Συγγενής (syngeneic) μεταμόσχευση	63-64
4.2.3. Αλλογενής μεταμόσχευση	64-65
4.3. Μεταμόσχευση ομφαλοπλακουντιακού αίματος	
4.3.1. Κλινική σημασία της μεταμόσχευσης Ο.Π.Α	65-66
4.3.2. Κλινικά αποτελέσματα της μεταμόσχευσης με Ο.Π.Α.	67-70
5. Τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος	
5.1. Εισαγωγή	70-71
5.2. Διαφορές μεταξύ ιδιωτικών και δημοσίων τραπεζών Ο.Π.Α.	71-72
6. Γενικές επισημάνσεις σχετικά με τη χρήση του Ο.Π.Α	
6.1. Συστήματα λήψης του Ο.Π.Α	72-73
6.2. Συστήματα μεταφοράς	73-74
6.3. Επεξεργασία και κατάψυξη	74-75
6.4. Εξελίξεις στην μεταμόσχευση Ο.Π.Α	
6.4.1. Μεταμόσχευση πολλαπλών μονάδων Ο.Π.Α.	75-76
6.4.2. Μη μυελοκατασταλτική (non-myeloablative) προετοιμασία	76
6.4.3. Έκπτυξη των στελεχιαίων κυττάρων και μηχανική του μοσχεύματος	77-78
6.4.4. Πλαστικότητα (plasticity) των στελεχιαίων κυττάρων	78
B. <u>Ειδικό μέρος</u>	
1. Εισαγωγή	79-80
2. Σκοπός	80
3. Υλικά και μέθοδοι	
3.1. Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος	80-82
3.2. Ημιαυτόματη διαδικασία διαχωρισμού	82-83
3.3. Κρυοκατάψυξη	83-85
3.4. Απόψυξη και πλύσιμο	86-87
3.5. Μετρήσεις με τη χρήση αιματολογικού αναλυτή	87
3.6. Κυτταρομετρία ροής	
3.6.1. Εισαγωγή	88-89

3.6.2. Αρχή της δοκιμασίας	89-91
3.6.3. Διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων	91-96
3.7. In vitro κυτταροκαλλιέργειες για τον καθορισμό CFUs (colony-forming units)	
3.7.1. Εισαγωγή	96-97
3.7.2. Ανασύσταση του υποστρώματος της καλλιέργειας	97-98
3.7.3. Προετοιμασία των δειγμάτων	98
3.7.4. Επεξεργασία των κυττάρων	99
3.7.5. Έμβια χρώση κυανού του τρυπανίου για την εκτίμηση της ζωτικότητας	99-100
3.7.6. Καλλιέργεια των δειγμάτων	101-103
3.7.7. Ανακαλλιέργεια των CFU-GEMM	103-105
3.8. Στατιστική επεξεργασία	105
4. Αποτελέσματα	
4.1. Εισαγωγή	106-107
4.2. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στον αριθμό των κυττάρων	107-110
4.3. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στην ανάκτηση (recovery) των κυττάρων (TNC, MNC, CD34 ⁺ και CD133 ⁺)	110-112
4.4. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στην βιωσιμότητα (viability) των κυττάρων	112-114
4.5. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στα είδη των αποικιών των HSPCs (BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM)	115-116
4.6. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στον αριθμό των αποικιών (CFU-colony forming units) των HSPCs	116-117
4.7. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στην ανακαλλιεργητική ικανότητα των CFU-GEMM	118-120
5. Συζήτηση	121-132
6. Συμπεράσματα	132
7. Περίληψη	133-134
8. Περίληψη στα αγγλικά	135
9. Παράρτημα	136-141
Γ. <u>Βιβλιογραφία</u>	142-175

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠ.Α.) αποτελεί μια πολύτιμη πηγή στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (hematopoietic stem cells-HSCs) για αλλογενή μεταμόσχευση. Η πρώτη μεταμόσχευση ΟΠ.Α. διενεργήθηκε σε έναν ασθενή με αναιμία Fanconi το 1988. Ως δότης χρησιμοποιήθηκε η HLA-ταυτόσημη αδελφή η οποία, μετά από προγεννητικό έλεγχο, διαπιστώθηκε ότι δεν έπασχε από τη νόσο και είχε φυσιολογικό καρυότυπο. Η συλλογή του ΟΠ.Α. έγινε κατά την γέννηση, στη συνέχεια καταψύχθηκε και μετά από απόψυξη και επεξεργασία δόθηκε για μεταμόσχευση στον πάσχοντα και μέχρι τον παρόντα χρόνο ο συγκεκριμένος ασθενής εξελίσσεται ομαλά με πλήρη αιματολογική αποκατάσταση.

Αυτή η πρώτη επιτυχία άνοιξε νέους ορίζοντες στην αλλογενή μεταμόσχευση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων και έδειξε ότι μια μονάδα ΟΠ.Α. περιέχει αρκετά στελεχιαία και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα έτσι ώστε να γίνει πλήρης και μόνιμη ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος του δέκτη. Επίσης, μια μονάδα ΟΠ.Α. μπορεί να συλλεγεί κατά την γέννηση χωρίς να προκληθεί βλάβη στο νεογνό και ότι αυτή μπορεί να καταψυχθεί και στη συνέχεια να αποψυχθεί και να δοθεί για μεταμόσχευση χωρίς να χαθεί απαραίτητα η πολλαπλασιαστική ικανότητα των στελεχιαίων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων που περιέχονται σε αυτήν.

Από τότε που πραγματοποιήθηκε η πρώτη μεταμόσχευση ΟΠ.Α. έχουν αναπτυχθεί τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος με στόχο την συλλογή και την κρυοσυντήρηση των μονάδων ΟΠ.Α. μέχρι την χρήση τους. Περισσότερες από 400.000 μονάδες ΟΠ.Α. είναι πλέον διαθέσιμες για διεθνείς ανταλλαγές και τα αποτελέσματα των μεταμοσχεύσεων ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την αντιμετώπιση σειράς κακοήθων και μη αιματολογικών παθήσεων σε παιδιά και ενήλικους απέδειξαν ότι σε σχέση με άλλες πηγές στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων το ΟΠ.Α. έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα, οφειλόμενα κυρίως στην ανωριμότητα των νεογνικών κυττάρων.

Οι ιδιότητες του ΟΠ.Α όπως μεταξύ άλλων η ευχερής πρόσβαση σε μόσχευμα, μικρότερο ποσοστό GVHD (graft versus host disease) καθώς και η καλύτερη αποκατάσταση του αιμοποιητικού συστήματος μακροπρόθεσμα αντισταθμίζουν τον σχετικά μικρό αριθμό προγονικών και στελεχιαίων κυττάρων που περιέχονται σε μια μονάδα ΟΠ.Α. με αποτέλεσμα μια μονάδα να είναι αρκετή σε αρκετές περιπτώσεις για την επιτυχή ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος του λήπτη.

Αυτές οι ιδιότητες μπορούν να οδηγήσουν σε λιγότερο αυστηρά κριτήρια κατά HLA συμβατότητας δότη και λήπτη γεγονός που προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα διαχειριστικής φύσεως όπως ταχύτερη ανεύρεση μοσχεύματος από τις τράπεζες κρυσυντήρησης με τους ασθενείς να υποβάλλονται σε μεταμόσχευση με ΟΠ.Α 25 με 36 ημέρες νωρίτερα από εκείνους που μεταμοσχεύονται με μυελό των οστών δεδομένου και ότι η δεξαμενή των δοτών είναι κατα πολύ ευρύτερη λόγω της ανοχής 1-2 HLA mismatches από 6. Επίσης, η μεταμόσχευση με ΟΠ.Α παρουσιάζει μικρότερα ποσοστά μετάδοσης λοιμώξεων λόγω επιμολύνσεων με ιούς, απουσία κινδύνου για τον δότη και τέλος μεγαλύτερη συχνότητα ανεύρεσης σπάνιων απλότυπων HLA σε σχέση με τα αντίστοιχα ευρετήρια μυελού των οστών καθώς μπορεί ευκολότερα να στοχεύσει σε εθνικές μειονότητες.

Αρκετές πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι το μέλλον της μεταμόσχευσης ΟΠ.Α θα είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον όπως και το παρελθόν και το παρόν. Πρόοδος αναμένεται στην προσπάθεια για ταχύτερη εμφύτευση του μοσχεύματος (engraftment) καθώς και στην περί την μεταμόσχευση θνησιμότητα με μέσα όπως: διαφοροποίηση της επεξεργασίας του μοσχεύματος, με ενδοοστική έγχυση του ΟΠ.Α. ή με τη χρήση διπλών μονάδων. Επιπρόσθετα, το ΟΠ.Α. καθώς και ο πλακούντας εκτός από τα αιμοποιητικά κύτταρα περιέχει και μεγάλο αριθμό μη αιμοποιητικών κυττάρων η πιθανή χρήση των οποίων έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ανοίγει νέους δρόμους στη χρήση του ΟΠ.Α. για την εξέλιξη της αναγεννητικής ιατρικής.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Στελεχειαία κύτταρα (Stem cells-SC)

1.1. Εισαγωγή

Με τον όρο στελεχειαία κύτταρα (SC-stem cells) καθορίζονται εκείνα τα κύτταρα τα οποία διαθέτουν απεριόριστη δυνατότητα αυτοανανέωσης (self-renewal) και επιπλέον την ικανότητα να παράγουν θυγατρικά κύτταρα που να ανήκουν σε διαφορετικά είδη ιστών (asymmetric cell division)¹.

Αυτές οι δυο ιδιότητες των στελεχειαίων κυττάρων εξαρτώνται εν μέρει από το αν αυτά βρίσκονται in situ (στο φυσικό τους περιβάλλον) ή κάτω από εργαστηριακές συνθήκες (in vitro). Εμβρυϊκά στελεχειαία κύτταρα (ESC ή ES-embryonic cells) που προέρχονται από το έσω κυτταρικό μόρφωμα (ICM-inner cell mass) των εμβρύων των θηλαστικών, έχουν απεριόριστες ικανότητες αυτοανανέωσης και μπορούν να παράγουν κύτταρα όλων των εμβρυϊκών ιστών in vitro, ενώ in situ έχουν περιορισμένες ικανότητες αυτοανανέωσης και διαφοροποιούνται σε διάφορα είδη ιστών, χάνοντας όμως τον φαινότυπό του στελεχειαίου κυττάρου. Χιμαιρική ανάλυση των ES προερχομένων από ποντίκια απέδειξε την ικανότητά τους να παράγουν κύτταρα όλων των ιστών². Τα ES που προέρχονται από ποντίκια μπορούν να διατηρηθούν σε πολυδύναμη κατάσταση in vitro και ακόμη να οδηγηθούν να σχηματίσουν εμβρυϊκά σωματίδια τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα ιστών διαφορετικών τύπων³. Τα ES προερχόμενα από επίμυες έχουν χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης, των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, των βιολογικών οδών καθώς και για την ανάπτυξη μοντέλων μελέτης των ανθρωπίνων νόσων⁴.

Εμβρυϊκά στελεχειαία κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί γονιδιακή τροποποίηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα in vitro και να γίνουν συνεχής πηγή κυττάρων για μελέτη, με κάποια είδη κυττάρων να σχηματίζονται αυθόρμητα (κύτταρα μυοκαρδίου και ηπατοκύτταρα)

ενώ σε άλλα να χρειάζεται να προηγηθεί ένα βήμα ενίσχυσης με τη βοήθεια αυξητικών παραγόντων⁵. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης η δημιουργία αγγείων θα γίνει αυθόρμητα αν προστεθεί FGF (fibroblast growth factor). Επίσης, όταν προστεθεί VEGF (vascular endothelial growth factor) σε καλλιέργειες κυττάρων ES, ευνοείται η παραγωγή ενδοθηλιακών κυττάρων^{6,7}.

Κύτταρα ES FLK 1⁺ (FLK 1: υποδοχέας για τον Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε αιμοποιητικά, ενδοθηλιακά και κύτταρα λείων μυϊκών ινών, μιμούμενα με αυτό τον τρόπο την φυσιολογική ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος που συμβαίνει στον λεκιθικό ασκό του εμβρύου⁸. Με ανάλογο τρόπο κύτταρα ES μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες και θα σχηματίσουν οστικούς κονδύλους που περιέχουν εναποθέσεις ασβεστίου η δε συχνότητα σχηματισμού των αυξάνει σημαντικά αν προστεθούν στην καλλιέργεια φωσφορικά, δεξαμεθαζόνη και ασκορβικό οξύ⁹.

Τόσο τα ανθρώπινα ES όσο και αυτά από επίμυες μπορούν να προέρχονται και από PCG κύτταρα (primordial germ cells). Παρόμοια με τα κύτταρα ES που προέρχονται από το ICM, τα PCG κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν εμβρυϊκά σωματίδια που μπορούν να εκφράσουν δείκτες που αντιπροσωπεύουν και τις τρεις γενετικές στοιβάδες: ενδόδερμα, εξώδερμα και μεσόδερμα¹⁰. Έχει βρεθεί ότι διαφορετικές ES-PCG κυτταρικές σειρές σχηματίζουν εμβρυϊκά σωματίδια σε χαμηλή συχνότητα¹¹ και ότι τα κύτταρα που προέρχονται από αυτά μπορούν να οδηγηθούν να εκφράσουν κυτταρικούς δείκτες αντιπροσωπευτικούς διαφόρων ειδών κυττάρων (αιμοποιητικών, αγγειακού ενδοθηλίου, νευρικών, ενδοδέρματος και μυϊκών). Επίσης, ES κύτταρα που έχουν υποστεί μικρό αριθμό ανακαλλιεργιών και χειρισμών (low-passage), τα οποία συγκρίθηκαν με περισσότερο επεξεργασμένα (high-passage) κύτταρα, δεν εμφάνισαν ουσιαστικές διαφορές όσον αφορά τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης γεγονός το οποίο είναι ενδεικτικό ότι αυτές οι κυτταρικές σειρές μπορούν να συντηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και έχουν ιδιότητες παρόμοιες με στελεχειαία κύτταρα που προέρχονται από το ICM της βλαστοκύστης.

Όσον αφορά τα ES ανθρωπίου προελεύσεως (hu-ES) έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ιδιότητες παρόμοιες με εκείνα που προέρχονται από επίμυες, με ορισμένες διαφορές: και τα δύο είδη

απαιτούν leukaemia inhibitory factor (LIF) για να διατηρηθούν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση ενώ ορισμένες κυτταρικές σειρές ES απαιτούν και bFGF (fibroblast growth factor) καθώς ο LIF δεν επαρκεί ώστε τα κύτταρα να διατηρηθούν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση^{12,13}. Τα hu-ES έχουν ελεγχθεί εργαστηριακά όσον αφορά την έκφραση γονιδίων με PCR και έχουν καλλιεργηθεί για να διαπιστωθεί τόσο η ικανότητά τους για μεταμόρφωση όσο και το εύρος αυτής. Η απομάκρυνση του LIF από την καλλιέργεια hu-ES τα οδηγεί να σχηματίσουν εμβρυϊκά σωματίδια τα οποία με τη σειρά τους θα σχηματίσουν ένα σχηματισμό που μοιάζει με βλαστοκύστη και διαθέτει χαρακτηριστικά ενδοδέρματος, μεσοδέρματος και εξωδέρματος. Αυτά τα hu-ES κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν μυοκύτταρα, κύτταρα ομοιάζοντα με νευρώνες και αιμοποιητικά κύτταρα¹⁴⁻¹⁶.

Η δυνατότητα αυτοανανέωσης (self-renewal) που χαρακτηρίζει τα ES και η ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων, τα έχει κάνει να φαίνονται η ιδανική λύση για ιστική θεραπεία και αποκατάσταση¹⁷, αυτή όμως η δυνατότητα χρήσης των ανθρώπινων ES έθεσε ηθικά και νομικά διλήμματα¹⁸. Επίσης, ο αριθμός των διαθέσιμων για έρευνα εμβρύων ανθρώπινης προέλευσης είναι περιορισμένος τόσο γιατί υπάρχει εγγενής δυσκολία ανεύρεσής τους, όσο και γιατί αυτά έχουν χαμηλό βαθμό ανάκτησης από την βαθειά κατάψυξη. Ένα δευτερεύον πρόβλημα που περιορίζει τη χρήση των ανθρώπινων ES είναι ότι απαιτείται HLA συμβατότητα των παραγόμενων κυττάρων ή ιστών με τον λήπτη, συνέπεια του οποίου είναι να απαιτείται μια τράπεζα αρκετών χιλιάδων κυτταρικών σειρών ES έτσι ώστε οι κυτταρικές ή οι γονιδιακές θεραπείες να έχουν πρακτική αξία¹⁹.

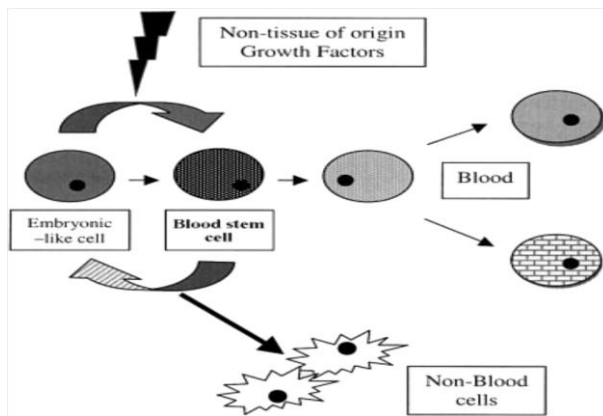
1.2. Μηχανισμός διαφοροποίησης των στελεχιαίων κυττάρων ενηλίκων

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα κύτταρα του δότη ενοποιούνται κατά μια έννοια με εκείνα του λήπτη και ακολουθούν την ίδια νομοτελειακή πορεία²⁰⁻²². Σε μια άλλη μελέτη νευρικά στελεχιαία κύτταρα καλλιεργήθηκαν μαζί με C2C12 κύτταρα (μυοβλαστική κυτταρική σειρά ποντικού) οπότε τα νευρικά μετατράπηκαν σε μυϊκά αλλά απαιτείτο η επαφή των δύο ειδών κυττάρων. Ομάδες νευρικών στελεχιαίων κυττάρων που δεν είχαν επαφή με C2C12 κύτταρα, δεν

διαφοροποιήθηκαν σε μυϊκά και ακόμη όταν τα νευρικά στελεχιαία κύτταρα μπήκαν στη διαδικασία της διαφοροποίησης σε C2C12, έχασαν την ικανότητά τους να μεταπέσουν σε νευρικά

23

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός διαφοροποίησης είναι εκείνος που βασίζεται σε κυτταρικά σήματα. Για παράδειγμα, ένα στελεχιαίο αιμοποιητικό κύτταρο στον μυελό των οστών θα δεχθεί περιοριστικά σήματα κυτταρικής σειράς έτσι ώστε να εξελιχθεί σε κύτταρο του αίματος, παρόλα αυτά όμως τοποθετώντας το στο ήπαρ του επιτρέπουμε να λάβει οργανοειδικά του ήπατος σήματα, γεγονός το οποίο αλλάζει τον προγραμματισμό του με αποτέλεσμα να εξελίσσεται σε ένα λειτουργικό ηπατοκύτταρο, όπως έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς λήπτες μυελού των οστών^{24,25}.



Στην διπλανή εικόνα εμφανίζεται διαγραμματικά ο παραπάνω μηχανισμός, παρόλα αυτά οι μελέτες που προτείνουν κάτι τέτοιο δεν διαχωρίζουν μεταξύ της πιθανότητας του επαναπρογραμματισμού του στελεχιαίου κυττάρου και του ότι το στελεχιαίο κύτταρο

μπορεί να ανταποκριθεί σε σήματα, στα οποία συνήθως δεν εκτίθεται. Τέλος, σε μια σχετικά πρόσφατη έρευνα, χρησιμοποιήθηκε πυρήνας B λεμφοκυττάρου για μεταφορά πυρήνα σωματικού κυττάρου σε ωκύτταρα, με σκοπό τη δημιουργία λειτουργικών ES κυττάρων²⁶. Ο επαναπρογραμματισμός του πυρήνα του κυττάρου που παρατηρείται, πιθανά οφείλεται σε διατάραξη της φυσιολογικής κατάστασης της χρωματίνης και του τρόπου μεθυλίωσης του DNA που προκύπτουν εξαιτίας της έκθεσης της χρωματίνης σε νέους κυτταροπλασματικούς παράγοντες του κυττάρου λήπτη²⁷.

1.3. Μεσεγγυματικά και στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα

Ο μυελός των οστών αποτελείται από αιμοποιητικά και κύτταρα του στρώματος του μυελού ή μεσεγγυματικά κύτταρα, που είναι επίσης ικανά για διαφοροποίηση σε πολλαπλές μη αιματολογικές σειρές κυττάρων. Αυτά τα μεσεγγυματικά κύτταρα είναι θετικά για α -smooth

muscle actin, SH2, SH3, SH4 (μεσεγγυματικοί κυτταρικοί δείκτες), παράγοντα von Willebrand (vWF; Ενδοθηλιακών κυττάρων) και φιβρονεκτίνη και τα είδη των κυττάρων που μπορούν να παραχθούν με αυτό τον τρόπο είναι πολλά^{28,29}.

Μελέτες έχουν καταδείξει την ικανότητα των μεσεγγυματικών κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό των οστών να ωριμάζουν σε νευρικά^{30,31}, μυϊκά^{32,33} και ηπατικά^{24,25}. Μεμονωμένα μεσεγγυματικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν ακόμη και 120 διαιρέσεις και να δίνουν κύτταρα όλων των γενετικών στρωμάτων (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα) και απαιτούν LIF για την επιβίωση τους ενώ τα κύτταρα αυτά εκφράζουν επίσης τους ES κυτταρικούς δείκτες OCT-4, Rex-1 και SSEA-1. Στελεχειαία κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών έχουν επίσης την ικανότητα να παράγουν ηπατοκύτταρα και έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία^{24,25}.

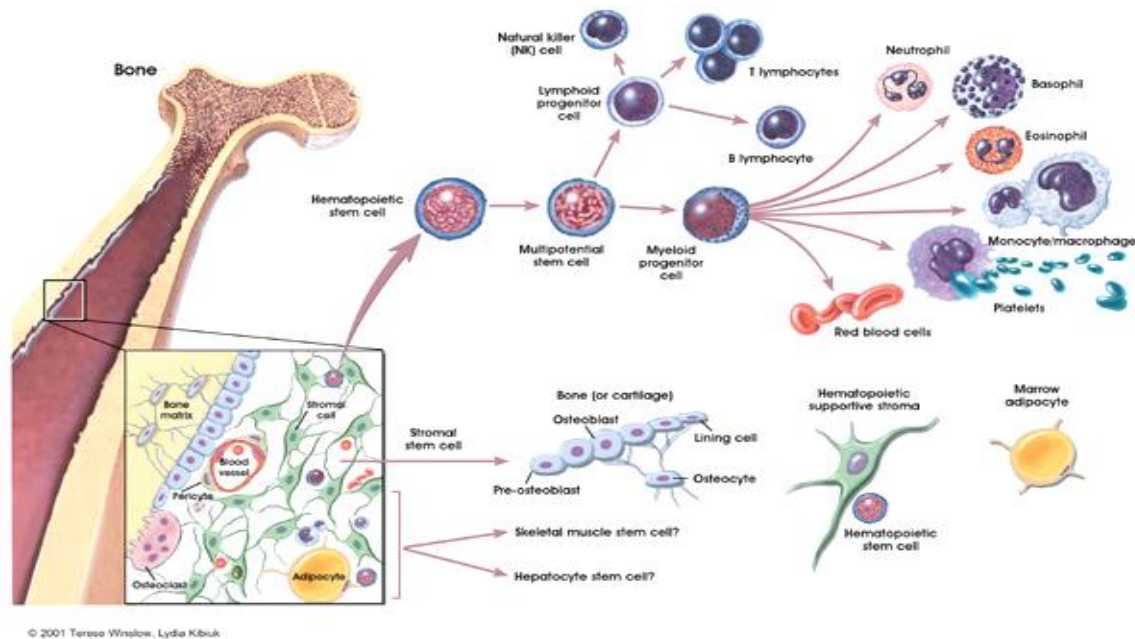
Σε μια άλλη μελέτη, HSCs (haemopoietic stem cells) ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται, χρησιμοποιώντας LTR (Long term repopulation) τεχνικές σε ακτινοβοληθέντες λήπτες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτά τα κύτταρα αποίκισαν το μυελό των οστών του λήπτη αλλά και ότι μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε επιθηλιακά κύτταρα ήπατος, πνεύμονα, γαστρεντερικού συστήματος και δέρματος³⁴.

1.4. Στελεχειαία και προγονία αιμοποιητικά κύτταρα (Haemopoietic stem and progenitor cells-HSPCs)

Μία εναλλακτική πηγή στελεχειαίων κυττάρων μπορεί να είναι τα πιο εξειδικευμένα ιστικά στελεχειαία κύτταρα που βρίσκονται σε ενήλικες. Για παράδειγμα, τέτοιες ασφαλείς πηγές στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων είναι ο μυελός των οστών, το περιφερικό αίμα ή το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, ενώ δεν μπορεί να ειπωθεί το ίδιο και για τα νευρικά ή κύτταρα άλλης προέλευσης, τα οποία δεν είναι τόσο άμεσα διαθέσιμα για συλλογή. Αν και τα νευρικά στελεχειαία κύτταρα είναι ικανά να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια και να επαναποικίσουν τον εγκέφαλο επίμυος ή αρουραίου, εντούτοις δεν είναι εύκολο να παραληφθεί εγκεφαλικός ή νευρικός ιστός

γενικά, για την καλλιέργεια και παραγωγή νευρικών κυττάρων.

Η ύπαρξη στελεχιαίων κυττάρων ενηλίκων διαφαίνεται καλύτερα στο αιμοποιητικό σύστημα. Η μεταμόσχευση του μυελού των οστών έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία αιματολογικών παθήσεων, κληρονομικές ανοσοανεπάρκειες και άλλες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος³⁵.



Η φυσιολογική πορεία και μετάβαση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων σε ωριμότερα κύτταρα στο μυελό των οστών παρουσιάζεται σχηματικά στην παραπάνω εικόνα.

Τα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα μπορούν να εξαχθούν από περιφερικό αίμα, από το μυελό των οστών και από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, με κυριότερη πηγή τον δεύτερο, με απαραίτητη προϋπόθεση την HLA συμβατότητα.

Υπάρχουν δύο είδη αιμοποιητικών κυττάρων που βοηθούν στην αναγέννηση του αιμοποιητικού συστήματος μετά τη μεταμόσχευση: (α) Τα προγονικά κύτταρα, τα οποία διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα ανανέωσης και (β) Στελεχιαία κύτταρα, τα οποία εμπεριέχονται στον πληθυσμό των προγονικών κυττάρων, αλλά έχουν πολύ μεγαλύτερη δυνατότητα αυτοανανέωσης³⁶. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι συνθήκες καλλιέργειας που οδηγούν σε αύξηση του αριθμού των στελεχιαίων/προγονικών κυττάρων, όπως αυτά καταμετρώνται με *in vitro* μεθόδους, για παράδειγμα CFU (colony forming units) ή LTC-IC (long-term cell-initiating culture), δεν οδηγούν σε αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των μακράς διάρκειας εμφυτευόμενων (long-term engrafting)

κυττάρων^{37,38}.

Η «δεξαμενή» των στελεχιαίων κυττάρων είναι μικρή και φαίνεται ότι υπάρχει μια σταθερή κατάσταση που διατηρείται κατά τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού αν και ένα στελεχιαίο κύτταρο μπορεί να διαιρεθεί και να παράγει δύο νέα στελεχιαία κύτταρα, δύο θυγατρικά κύτταρα ή ένα από το κάθε είδος^{39,40}. Συνεπώς, το κρίσιμο σημείο στην *in vitro* έκπτυξη των στελεχιαίων κυττάρων είναι να μειωθεί η απώλεια των αυτο-ανανεωθέντων στελεχιαίων κυττάρων που συμβαίνει κατά τη διάρκεια του κατευθυνόμενου πολλαπλασιασμού.

Για να μπορέσει ένα στελεχιαίο κύτταρο να δώσει γένεση σε δύο νέα στελεχιαία κύτταρα, είναι απαραίτητο να διακοπεί η διαδικασία της διαφοροποίησης ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό του πριν ξεκινήσει αυτή, αν και οι προσπάθειες για να γίνει κάτι τέτοιο δεν έχουν σημειώσει ιδιαίτερη επιτυχία, δεδομένου ότι οι παράγοντες ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται έχουν τόσο μιτογόνες όσο και διαφοροποιητικές δράσεις⁴¹.

2. Αιμοποιητικά κύτταρα (HSPCs) του ομφαλοπλακουντιακού αίματος (ΟΠ.Α)

2.1. Εισαγωγή

Η παρουσία στελεχιαίων και προγονικών αιμοποιητικών αιμοποιητικών κυττάρων (HSPC-Hemopoietic stem and progenitor cells) στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UCB-umbilical cord blood) υποδείχθηκε από τον Knudtzon⁴² το 1974. Μετά από μια δεκαετία περίπου, ο Ogawa και συν. απέδειξαν την παρουσία προγονικών HSPCs στο UCB^{43,44}, αλλά μόνο το 1989 δημοσιεύθηκαν πειραματικές και κλινικές μελέτες που ήταν υποδείκνυαν ότι το ΟΠ.Α μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλινικό επίπεδο⁴⁵. Το ίδιο έτος, η Gluckman και συν. ανακοίνωσαν την πρώτη μεταμόσχευση όπου ως πηγή αιμοποιητικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ΟΠ.Α στη θέση του μυελού των οστών. Με αυτό τον τρόπο έγινε ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος ενός παιδιού με αναιμία Fanconi με ΟΠ.Α προερχόμενο από HLA-ταυτόσημο συγγενή δότη⁴⁶. Από τότε υπάρχει ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον αφορά τη χρήση του ομφαλοπλακουντιακού αίματος σαν μια εναλλακτική πηγή HSPCs στη μεταμόσχευση⁴⁷ και μέχρι

σήμερα εκατοντάδες τέτοιες μεταμοσχεύσεις έχουν πραγματοποιηθεί παγκόσμια, για ασθενείς κυρίως παιδιά-με διάφορες αιματολογικές και γενετικές παθήσεις όπως λεμφογενή και μυελογενή λευχαιμία, αναιμία Fanconi, απλαστική αναιμία, σύνδρομο Hunter, σύνδρομο Hunter, σύνδρομο Wiskott-Aldrich, β-θαλασσαιμία και νευροβλάστωμα.

Με την αναγνώριση του γεγονότος ότι το ΟΠ.Α μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική πηγή προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, σε σχέση με το μυελό των οστών δημιουργήθηκαν τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος που κρατούν αποθηκευμένες στην κρυοσυντήρηση, (θερμοκρασίες από -80°C έως -196°C) μονάδες ΟΠ.Α, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση σε όποιον έχει ανάγκη. Οι πρώτες τράπεζες ΟΠ.Α, με «δημόσιο» χαρακτήρα ιδρύθηκαν το 1993 στη Ν.Υόρκη (New York Blood Center), στο Μιλάνο (Milan Cord Blood Bank-Italy) και στο Ντύσσελντορφ (Bone Marrow Donor Center-Dusseldorf, Germany). Αυτές οι εξελίξεις οδήγησαν αρκετές ερευνητικές ομάδες να διερευνήσουν τα χαρακτηριστικά των HPSCs του ΟΠ.Α τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, με τελικό στόχο τη βελτίωση όσο και την επέκταση του κλινικού τους ρόλου.

2.2. In vitro μέθοδοι μελέτης των HSPCs του ΟΠ.Α

2.2.1. Φαινοτυπικός καθορισμός

Το CD34^+ αντιγόνο, μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 90-120kD, είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος δείκτης όσον αφορά τα HSPCs ανθρώπινης προέλευσης⁴⁸⁻⁵⁵. Αν και οι λειτουργίες του δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένες, φαίνεται ότι σχετίζεται με την ρύθμιση της προσκόλλησης (adhesion) των αιμοποιητικών κυττάρων στα κύτταρα του στρώματος (stromal cells) του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος⁵⁶.

Ο CD34^+ φαινοτυπικός δείκτης δεν μπορεί μόνος του να διαχωρίσει στελεχιαία από ωριμότερα προγονικά κύτταρα ή υποκατηγορίες κυττάρων ενδιάμεσα και βρίσκεται επίσης σε κύτταρα άλλων κατηγοριών (για παράδειγμα, ενδοθηλιακά)⁵⁷, όμως κύτταρα που εκφράζουν έντονα το CD34^+ αντιγόνο (CD34^{+++}) φαίνεται ότι ανήκουν σε πληθυσμό που περιλαμβάνει τα

αωρότερα των κυττάρων του πληθυσμού⁵³.

Η συχνότητα των CD34⁺ κυττάρων στο μυελό των οστών των ενηλίκων κυμαίνεται μεταξύ 1 έως 3% όλων των εμπύρηνων κυττάρων⁴⁸⁻⁵¹. Η περιεκτικότητα των CD34⁺ κυττάρων στο ΟΠ.Α έχει βρεθεί επίσης να είναι περίπου το 1% των εμπύρηνων κυττάρων⁵⁸⁻⁶¹. Η περιεκτικότητα των CD34⁺ κυττάρων στο ΟΠ.Α μειώνεται ανάλογα με την ηλικία του κύηματος, για παράδειγμα τη 17^η εβδομάδα της κύησης τα CD34⁺ κύτταρα αποτελούν το 11% περίπου των μικρών μονοπυρήνων κυττάρων (MNC), όταν την 38 εβδομάδα αποτελούν μόνο το 1%⁶².

Στον μυελό των οστών του ενήλικα, τα CD34⁺ κύτταρα αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων όπου η μεγάλη πλειοψηφία εκφράζει επίσης HLA-DR καθώς και CD38 αντιγόνα^{55,63-65}. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περιεκτικότητες των CD34⁺CD38⁻ και CD34⁺HLA/DR⁻ κυττάρων στο ΟΠ.Α είναι υψηλότερες από αυτές στο μυελό των οστών του ενηλίκου (τα CD34⁺CD38⁻ κύτταρα είναι περίπου το 4% των CD34⁺ κυττάρων στο ΟΠ.Α ενώ μόλις το 1% στο μυελό των οστών ενηλίκου⁵⁵), γεγονός που υποδεικνύει ότι το ΟΠ.Α περιέχει άωρα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι ο μυελός των οστών.

Τα CD34⁺ του ΟΠ.Α, με βάσει την έκφραση των αντιγόνων επιφανείας CD45RA και CD71, μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις υποπληθυσμούς που αντιστοιχούν σε CFU-GEMM, CFU-GM και BFU-E κύτταρα. Τα CD34⁺ που έχουν πολύ χαμηλή ή μη ανιχνεύσιμη έκφραση CD45RA και CD71 σχετίζονται με τα CFU-GEMM τα οποία αποτελούν έως και το 47% των CFC (Colony forming cells). Τα CD34⁺CD45RA⁺CD71^{lo} σχετίζονται με προγονικά κύτταρα κοκκιοκυττάρων (CFU-GM) που αντιστοιχούν με υψηλό ποσοστό 9 (έως 90%) των CFCs, ενώ τα CD34⁺CD45RA^{lo}CD71⁺, αντιστοιχούν σε προγονικά κύτταρα ερυθροποιητικών κυττάρων (BFU-E και CFU-E)^{66,67}. Αρκετά άλλα αντιγόνα επιφανείας, όπως το thy1⁶⁸, το c-kit⁶⁹ και το Flt3/Flk-2^{70,71} καθώς και η έμβια χρωστική rhodamine 123^{72,73} έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η ωριμότητα των κυττάρων.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα CD34⁺ αιμοποιητικά κύτταρα που μπορούν να κάνουν ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος σε SCID (Severe combined immunodeficient) ποντίκια, εκφράζουν το αντιγόνο Thy-1(CD90)^{74,75}. Το 20-30% των CD34⁺CD45RA^{lo}CD71^{lo}

κυττάρων του ΟΠ.Α επίσης εκφράζουν Thy-1 ενώ αυτός ο πληθυσμός $CD34^+CD45RA^{lo}CD71^{lo}Thy-1^+$ κυττάρων είναι πλούσιος σε HPC-CFC (Hematopoietic progenitor cells-colony forming cells). Το αντιγόνο Thy-1 φαίνεται ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων, πιθανά μέσω της διαμεσολάβησης στην μεταφορά ενός αρνητικού σήματος που οδηγεί στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁷⁶.

Το c-kit πρωτο-ογκογονίδιο κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα (CD 117) με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης που εκφράζεται στα HSPCs⁷⁷⁻⁷⁹.

Ο σύνδεσμος του c-kit, ο παράγων του Steel ή mast cell growth factor ή SCF (Stem cell factor), σχετίζεται με την βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των HPSCs⁷⁸⁻⁸⁰. Το 60% των $CD34^+$ κυττάρων του ΟΠ.Α συνεκφράζει το c-kit⁸¹ και αυτός ο πληθυσμός των $CD34^+c-kit^+$ κυττάρων διαθέτει υψηλότερη ικανότητα αυτοανανέωσης όπως αυτή αποτυπώνεται σε ημιστερεές καλλιέργειες σε σχέση με $CD34^+$ κύτταρα που δεν εκφράζουν το c-kit. Επίσης όλα τα κύτταρα $CD34^+Thy-1^+$ του ΟΠ.Α εκφράζουν και το c-kit, αν και σε χαμηλότερα επίπεδα⁷⁴.

Η μεγάλη πλειοψηφία των $CD34^+$ κυττάρων του ΟΠ.Α (90%) συνεκφράζει το FLT3(CD135), τον υποδοχέα για την πρωΐμως-δρώσα (early-acting) κυττοκίνη FLT3-ligand (FL) και μόνο το 5% εκφράζει τον υποδοχέα για το M-CSF(CD 115)⁷⁵.

Το 80% των $CD34^+$ κυττάρων του ΟΠ.Α έχουν την ικανότητα να προσροφούν rhodamine-123(Rh^{high})⁷³, μια έμβια φθοριοχρωστική που συνδέεται με τα μιτοχόνδρια των ζώντων κυττάρων⁸². Τα κύτταρα ΟΠ.Α $CD34^+Thy-1^+c-kit^{low}$ είναι επίσης Rh^{low} και φαίνεται ότι όλα τα LTC-IC εμπεριέχονται σε αυτό τον πληθυσμό⁷³. Μετά από όλα τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα περισσότερα πρώιμα HPSCs, βρίσκονται στο ΟΠ.Α σε συχνότητα 1/30.000 εμπυρήνων κυττάρων περίπου, είναι μορφολογικά μικρά MNC (mononuclear cells) και έχουν τον παρακάτω φαινότυπο: $CD34^+CD38^-CD45RA^{lo}CD71^{lo}Thy-1^+c-kit^{low}Rh^{low}$.

Η έκφραση αντιγόνων της λεμφικής ή της μυελικής σειράς στα $CD34^+$ κύτταρα του ΟΠ.Α, έχει επίσης αποδειχθεί. Στα $CD34^+$ κύτταρα του ΟΠ.Α, σε αντίθεση με εκείνα του μυελού των οστών ενηλίκων όπου το 25% των $CD34^+$ κυττάρων εκφράζει τον δείκτη επιφανείας CD10 και το 18% εκφράζει το CD19, τα $CD10^+CD19^+$ είναι σχετικά σπάνια ενός του κλάσματος των $CD34^+$

κυττάρων του ΟΠ.Α⁸³. Το CD13⁺ φαίνεται ότι εκφράζεται από την πλειοψηφία των CD34⁺ κυττάρων, το ίδιο και το CD133⁺, αν και αυτό το τελευταίο φαίνεται ότι δεν εκφράζεται στα περισσότερα αρχέγονα CD34⁺. Επίσης παρατηρήθηκε η παρουσία πολλών μορίων προσκόλλησης στα CD34⁺ κύτταρα του ΟΠ.Α, παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν στα CD34⁺ κύτταρα του μυελό των οστών.

Σχεδόν όλα τα CD34⁺ εκφράζουν CD11 και CD18 αλύσους ιντεγκρινών, ενδεικτικό της ύπαρξης LFA-1 ετεροδιμερών. Όλα τα CD34⁺ κύτταρα εκφράζουν τα LFA-1 ligant, LFA-3 (CD 58) και ICAM-1 όπως επίσης και ιντεγκρίνες της β1 οικογένειας-σημαντικές στην προσκόλληση μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριου ουσίας- ειδικά το VLA-4 και VLA-5.

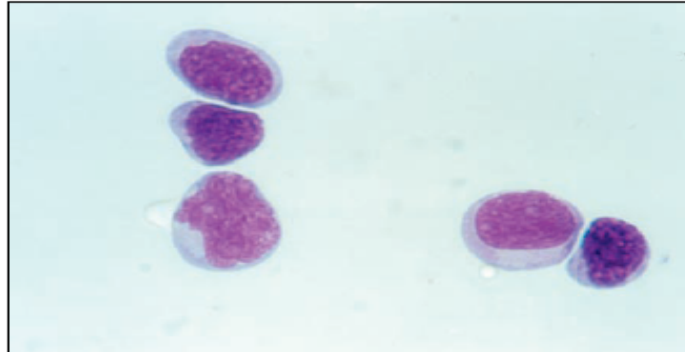
Τέλος, τα CD44 και LAM-1, υποδοχείς προσκόλλησης που σχετίζονται με το homing των αιμοποιητικών κυττάρων, έχουν ισχυρή έκφραση στα CD34⁺⁸³. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει σε περίληψη ορισμένα από τα στοιχεία που προαναφέρθηκαν.

Αντιγονική έκφραση των CD34+ κυττάρων του ΟΠ.Α

Αντιγόνο	% Θετικά κύττ.	Αντιγόνο	% Θετικά κυττ.
CD13	70± 13	CD54	>98
CD18	94± 5	CD58	>98
CD19	4 ±2	CD71	30± 9
CD33	78± 12	CD90	40 ±16
CD38	97± 2	CD115	5± 1
CD44	>98	CD117	61± 17
CD45RA	55 ±11	CD135	92± 3
CD51	4 ±2	HLA-DR	89± 8

Τα αποτελέσματα στον πίνακα εκφράζονται ως mean±SD του σχετικού ποσοστού των κυττάρων που περιέχονται εντός του πληθυσμού CD34⁺ κυττάρων του ΟΠ.Α και εκφράζουν το αντίστοιχο αντιγόνο.

Στα πλεονεκτήματα του φαινότυπου συμπεριλαμβάνεται η ταχύτητα σε σχέση με τις λειτουργικές μεθόδους, όπως αυτές που προσδιορίζουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων, καθώς και οι δυνατότητες του διαχωρισμού και εμπλουτισμού των κυττάρων. Στην πιο κάτω εικόνα εμφανίζονται κύτταρα HSPCs που είναι



$CD34^+CD45Re^{lo}CD71^{lo}Thy-1(CD90)^+$, προερχόμενα από ΟΠ.Α.

Παρόλα αυτά όμως ο φαινότυπος δεν δίνει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα αυτοανανέωσης, πολλαπλασιασμό ή την ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων αν δεν συνδυαστεί με κάποια μέθοδο που να εκτιμά λειτουργικά τον συγκεκριμένο πληθυσμό των κυττάρων.

Επίσης, ο φαινότυπος δεν έχει πάντα σταθερή έκφραση. Έχει βρεθεί ότι αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα μπορούν να βρεθούν και στον $CD34^-$ πληθυσμό κυττάρων^{84,85} και η συσχέτιση μεταξύ $CD34^+$ και $CD34^-$ μπορεί να γίνει πιο περίπλοκη εξαιτίας της πολυμορφίας και της προκλητότητας των $CD34$ αντιγόνων⁸⁶. Μετά από ex-vivo διαδικασίες έκπτυξης (expansion), αρκετά προγονικά κύτταρα δεν εκφράζουν $CD34$ αντιγόνα⁸⁷.

Γενικά, τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα του ΟΠ.Α, κατά το μεγαλύτερο μέρος εκφράζουν τους ίδιους φαινοτυπικούς δείκτες με τα ομόλογά τους στο μυελό των οστών ενηλίκων, εκτός από τα HLA-DR αντιγόνα η έκφραση των οποίων είναι ελάχιστη ή απουσιάζει παντελώς από τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών, ενώ στα αντίστοιχα κύτταρα του ΟΠ.Α εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα^{72,88}.

2.2.2. Λειτουργικές μέθοδοι διερεύνησης (Functional assays)-διαφορές μεταξύ αιμοποιητικών κυττάρων ΟΠ.Α και μυελού των οστών

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την εκτίμηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας in vitro και της ικανότητας διαφοροποίησης των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων.

Για τα προγονικά και για τους περισσότερο ώριμους πληθυσμούς των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων- που συνήθως δεν έχουν μακράς διάρκειας, in vivo ικανότητα για επαναποικισμό του μυελού των οστών- αυτές χρησιμοποιούν την ανάπτυξη των κυττάρων σε ημιστερεό καλλιεργητικό υλικό όπως άγαρ, αγαρόζη, ή μεθυλλοκυτταρίνη, ή καλλιέργειες σε διάλυμα⁸⁹⁻⁹¹. Το ημιστερεό θρεπτικό υλικό επιτρέπει την ανάπτυξη διαχωρισμένων αποικιών με τις αποικίες αυτές να προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα τα οποία είτε είναι στελεχιαία κύτταρα, με περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, είτε προγονικά κύτταρα^{53,43,92-95}.

Οι κυτταρικές καλλιέργειες μπορούν να ξεχωρίσουν κύτταρα όπως στελεχιαία, υψηλής πολλαπλασιαστικής ικανότητας κύτταρα σχηματίζοντας αποικίες (high proliferation potential colony forming cells;HPP-CFCs), πολυδύναμες μονάδες σχηματισμού αποικιών CFU-GEMM (Granulo-,erythroid-, macrophage- και megacaryocyte-), CFU-GM (Granulo- macrophage-), CFU-G (Granulo-), CFU-M (Macrophage-), CFU-Mega (Megacaryocyte-) και BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid). Η δυνατότητα της ανακαλλιέργειας μεμονωμένων αποικιών από ένα τρυβλίο σε ένα άλλο, με σχηματισμό δευτερογενών αποικιών προσφέρει μια εκτίμηση της ικανότητας αυτοανανέωσης του αρχικού κυττάρου που παρήγαγε την αρχική αποικία, ειδικά αν τόσο οι πρωτογενείς όσο και οι δευτερογενείς αποικίες είναι πολυδύναμες.

Αν και οι CFU-GEMM ,CFU-GM ,CFU-G ,CFU-M ,CFU-Mega και BFU-E θεωρείται ότι προέρχονται από προγονικά κύτταρα χωρίς ικανότητα αυτοανανέωσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι μερικοί υποπληθυσμοί CFU-GEMM μπορούν να ταξινομηθούν σε μια ωριμότερη κατηγορία στελεχιαίων κυττάρων, παρά σε κάποια πρώιμη κατηγορία προγονικών κυττάρων^{92,93,95}.

Το ΟΠ.Α έχει παρατηρηθεί ότι περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση HSPCs, σε σχέση με το μυελό των οστών^{45,95,96}. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας βασίζεται στην καταμέτρηση του

αριθμού των αποικιών που αναπτύσσονται σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων που καλλιεργούνται και ουσιαστικά αυτή η εκτίμηση του αριθμού των CFU-GEMM, CFU-GM και BFU-E που οδήγησε στην υπόθεση ότι το ΟΠ.Α μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή αιμοποιητικών κυττάρων⁴⁵ με ευεργετικά αποτελέσματα τόσο στα παιδιά όσο και σε ενήλικες^{45,96}. Ακόμη περισσότερο, τόσο η πολλαπλασιαστική ικανότητα (proliferative capacity)^{45,53,54,55,95, 96,97-99} όσο και η ικανότητα ανακαλλιέργειας (replating ability)-μέτρο της ικανότητας αυτοανανέωσης, για ορισμένους ερευνητές^{43,53,92,93,95}, των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων που περιέχονται στο ΟΠ.Α, αποδείχθηκε ότι είναι μεγαλύτερες από εκείνες των αντιστοίχων κυττάρων του μυελού των οστών.

Μακράς διάρκειας καλλιέργειες κυττάρων LTC-CIC (Long term, culture-initiating cell) σε υγρό θρεπτικό υλικό όπου τα κύτταρα υποστηρίζονται θρεπτικά από στοιχεία των κυττάρων του στρώματος (stromal cells) και /ή κυτταροκίνες έχουν στοιχειοθετήσει τα υπέρτερα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά των προγονικών κυττάρων του ΟΠ.Α^{87,95,97,99-104} σε σχέση με εκείνα που προέρχονται από το μυελό των οστών. Εκτεταμένες LTC-CIC κατέδειξαν ότι τα CD34⁺ CD38⁻ κύτταρα του ΟΠ.Α έχουν μεγαλύτερη κλωνική απόδοση, πολλαπλασιάζονται ταχύτερα αντιδρώντας σε κυττοκίνες και παράγουν 7-πλασιο αριθμό θυγατρικών κυττάρων σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα του μυελού¹⁰⁵.

Όλες οι μελέτες έχουν αποδείξει ότι η συγκέντρωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στο ΟΠ.Α είναι αυξημένη σε σχέση με αυτή στο μυελό των οστών, παρ'όλα αυτά όμως δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων του ΟΠ.Α και εκείνων του μυελού των οστών. Η αωρότητα των HSPCs του ΟΠ.Α έχει διερευνηθεί με κυτταρογεννητικές μελέτες χρησιμοποιώντας το μήκος των τελομερών¹⁰⁶. Μελέτες με κύτταρα επίμυος επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι μεμονωμένα στελεχιαία κύτταρα από τον μυελό των οστών, εμβρυϊκό αίμα ή αίμα νεογνού παράγουν παρόμοιες κατηγορίες κυττάρων λεμφικής ή ερυθροειδούς προέλευσης¹⁰⁷.

Αν και τα HSPCs του ΟΠ.Α έχουν μεγάλη ικανότητα για εκτεταμένο πολλαπλασιασμό^{45,53-55,96}, η ανάλυση της κινητικής του κυτταρικού κύκλου τους με τη βοήθεια σεσημασμένης

θυμιδίνης και κυτταρικών καλλιιεργειών, έδειξε ότι όταν αυτά ληφθούν άμεσα μετά τη γέννηση, τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε στατική κατάσταση από άποψης πολλαπλασιασμού^{94,95,97,108,109}, γεγονός που έρχεται σε οξεία αντίθεση με τον σχετικά αυξημένο πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων στο μυελό των οστών.

Παρ'όλα αυτά τα HSPCS του ΟΠΛΑ ανταποκρίνονται άμεσα στην επίδραση παραγόντων ενισχυτικών του πολλαπλασιασμού^{45,53-55,95-97,108,109} και αυτή η ιδιότητα τους σχετίζεται άμεσα με την αυξημένη ικανότητα της ex vivo έκπτυξης (expansion) των κυττάρων αυτών.

2.3. In vivo μέθοδοι μελέτης των HSPCs του ΟΠΛΑ

Τα στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα που επαναποικίζουν το μυελό των οστών διερευνήθηκαν και με τη βοήθεια μεθόδων που χρησιμοποιούν ζωικά πρότυπα in vivo.

Σε αυτά τα πρότυπα (models), η διερεύνηση της μακράς διάρκειας επαναποικιστικής ικανότητας (long term repopulation) των κυττάρων του δότη που δόθηκαν σε ποντίκι ακτινοβολημένο θανατηφόρα (lethally irradiated mice), γίνεται είτε σε περιβάλλον μη ανταγωνιστικό ή σε συνδυασμό με τη χορήγηση κυττάρων ισοδύναμων με αυτόλογα¹¹⁰⁻¹¹⁴.

Είναι αρκετά πιθανό, με βάση τα παραπάνω, τα πρόσφατα in vivo πρότυπα (models) όπου χρησιμοποιούνται ποντίκια διαφόρων βαθμών ανοσοανεπάρκειας (SCID) ως δέκτες ανθρώπινων κυττάρων να μπορούν να λειτουργήσουν ως μέθοδοι για τη διερεύνηση μακράς διάρκειας επαναποικίζοντα το μυελό των οστων κυττάρων (LTCs)^{112, 115-121}.

Το πρότυπο SCID-mouse (severe combined immunodeficient mouse) είναι από τα δημοφιλέστερα και σε αυτό η SCID μετάλλαξη είναι η απώλεια (deletion) του γονιδίου της DNA-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-PK). Το ποντίκι που είναι ομόζυγο για την scid μετάλλαξη δεν διαθέτει λειτουργικά B και T λεμφοκύτταρα εξαιτίας ανωμαλιών στον ανασυνδυασμό των V(D)J αλύσεων καθώς και την επισκευή ρηγμάτων στις διπλή έλικα του DNA, με αποτέλεσμα αυτό να καθίσταται μη επαρκές λειτουργικά όσον αφορά τόσο την κυτταρική όσο και την χημική ανοσία.

Στο πρότυπο NOD (non-obese diabetic) -SCID εκτός της ελαττωματικής κυτταρικής και

χημικής ανοσίας παραβλάπεται και η λειτουργικότητα των NK κυττάρων και σε αυτό το πρότυπο η εμφύτευση (engraftment) των προγονικών κυττάρων προερχόμενων από τον ανθρώπινο μυελό των οστών βρέθηκε να είναι τουλάχιστον πενταπλάσια εν σχέση με προγενέστερα πρότυπα ενώ τα μεταμοσχευθέντα κύτταρα εμφυτεύονται σε ποσοστά από 10% έως 30%, αναλόγως του αριθμού τους και της προέλευσής τους¹²¹⁻¹²³.

Τα προαναφερθέντα προγονικά κύτταρα (NOD/SCID-repopulating cells/SRCs) βρέθηκαν να είναι μόνο ένα μικρό μέρος των κυττάρων με ισχυρή έκφραση CD34 και απουσία CD38 αντιγόνων στην επιφάνειά τους¹¹⁹. Η συγκέντρωση των SRCs στο ΟΠ.Α βρέθηκε να είναι 1 σε $9,3 \times 10^5$ κύτταρα, σημαντικά μεγαλύτερη από το 1 σε 3×10^6 κύτταρα του μυελού των οστών και το 1 σε 6×10^6 του κινητοποιημένου περιφερικού αίματος (PBSCs)¹²¹.

Τα κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται μετά τη μεταμόσχευση στο NOD-SCID είναι κυρίως της Β-σειράς (CD19⁺) και μικρές ομάδες μυελοειδών κυττάρων (CD14⁺ και CD11b⁺). Ωριμα ερυθρά καθώς και προγονικά ερυθροποιητικά κύτταρα δεν μπορούν να προσδιοριστούν στο NOD-SCID ποντίκι που έχει μεταμοσχευθεί με CD34⁺ μυελού των οστών¹²⁴. Πρόσφατες εργασίες έχουν δείξει ότι τα ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα στο NOD/SCID ποντίκι προέρχονται από δύο πληθυσμούς CD34⁺ κυττάρων: Το «πρώτο κύμα» των κυττάρων προέρχεται από προγονικά κύτταρα με μικρού χρόνου ικανότητα δράσης (Short term). Το «δεύτερο κύμα» των κυττάρων επικαλύπτει το πρώτο και προέρχεται από προγονικά κύτταρα περισσότερο μακρόβια¹²⁵. Πιθανά το πρώτο κύμα αφορά κύτταρα που έχουν φαινότυπο CD34⁺CD38⁺ και το δεύτερο CD34⁺CD38⁻, αντίστοιχα.

Το NOD/SCID μοντέλο έδωσε τα πρώτα στοιχεία σχετικά με την ύπαρξη πληθυσμού ανθρώπων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων που δεν εκφράζουν CD34(CD34⁻). Όταν στα NOD/SCID ποντίκια έγινε έγχυση CD34⁻ κυττάρων τότε παρήχθησαν προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και ώριμα κύτταρα σε αριθμούς συγκρίσιμους εκείνων που προέρχονται από την έγχυση CD34⁺ κυττάρων¹²⁶. Αρκετά από τα θυγατρικά κύτταρα στους NOD/SCID δέκτες που μεταμοσχεύθηκαν με CD34⁻ κύτταρα εξέφρασαν CD34⁺ γεγονός που υποδεικνύει ότι τα CD34⁻ μπορούν να δώσουν CD34⁺ στα NOD/SCID ποντίκια^{126,127}.

Με το σκοπό να βελτιώσουν το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη ανθρώπων κυττάρων σε ανοσοανεπαρκείς μύες, δημιουργήθηκε η σειρά των SCID-hu (humanized) μοντέλων ποντικών. Αρχικά, τμήματα εμβρυϊκού ανθρώπινου θύμου τοποθετήθηκαν κάτω από τη νεφρική κάψα ενός SCID ποντικίου. Στην πλειονότητα αυτών των πειραματόζωων, ανθρώπια κύτταρα τόσο T- λεμφοκυτταρικής όσο και μυελικής προέλευσης, ανιχνεύονταν στο περιφερικό αίμα αυτών για 6 έως 12 μήνες αν και σε χαμηλά επίπεδα. Εξέταση των οργάνων τους αποκάλυψε την παρουσία προγονικών κοκκιοκυττάρων (CFU-GM) και προγονικών ερυθροποιητικών κυττάρων (BFU-E) ανθρώπινης προέλευσης¹²⁸. Επιπρόσθετα, αυτά τα πειραματόζωα περιείχαν ένα πλήρες φάσμα διαφοροποιούμενων T-λεμφοκυττάρων μεταξύ των οποίων και $CD3^+/CD4^+ CD8^+$, $CD3^+/CD4^- CD8^+$, και $CD3^+/CD4^+ CD8^-$ κύτταρα¹²⁹.

Συνήθως, τα ανθρώπια T- κύτταρα σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια παράγουν θανατηφόρο GHVD. Παρ'όλα αυτά, ανθρώπινα εμφυτεύματα θύμου σε SCID-hu Thy-Liv ποντίκια (μεταμοσχευθέντα με ανθρώπια εμβρυϊκά κύτταρα θύμου και ήπατος) βρέθηκαν να περιέχουν μυϊκά δενδριτικά κύτταρα, γεγονός που εξηγεί τόσο την ανοχή όσο και την μακρου χρόνου παραγωγή ανθρώπινων T- κυττάρων χωρίς GVHD¹³⁰. Η ανοχή των μοσχευμάτων και η παραγωγή ανθρώπινων T- λεμφοκυττάρων και μυελικών κυττάρων είναι αποδεικτικό στοιχείο της «ανθρώπινης» αιμοποίησης προερχόμενης από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα στο SCID-hu Thy-Liv μοντέλο.

Η τελευταία βελτίωση στη σειρά SCID-hu είναι το SCID-hu πρότυπο. Σε αυτό, τμήματα εμβρυϊκού οστού μεταμοσχεύονται υποδορίως σε SCID ποντίκι. Τα τμήματα του οστού αποκτούν αγγείωση στη διάρκεια 4 με 6 εβδομάδων, παρέχοντας το «ανθρώπινο» αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον, στο οποίο χαμηλοί αριθμοί προγονικών μυελικών κυττάρων και B κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για 12 εβδομάδες ή περισσότερο¹³¹. Το SCID ποντίκι που περιέχει εμφυτεύματα εμβρυϊκού οστού, θύμου και σπλήνα (BTS) είναι γνωστό ως SCID-hu BTS. Το SCID-hu BTS ποντίκι μπορεί να υποστηρίξει ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα όλων των σειρών για τουλάχιστον 36 εβδομάδες¹³². Το SCID-hu BTS μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί και για τον καθορισμό του φαινοτύπου των ανθρώπινων HSCs. Κύτταρα $CD34^+ Lin^- Thy-1^+$ τα εγχύθηκαν στα

τιμήματα εμβρυϊκού οστού σε SCID-hu BTS ποντίκι, εμπλουτίζονται σημαντικά σε κύτταρα που παράγουν HSCs καθώς και ωριμότερα κύτταρα ^{132,133}.

2.4. Μικροπεριβάλλον (microenvironment) αιμοποίησης

Ο πολλαπλασιασμός, η αυτοανανέωση, η επιβίωση και η διαφοροποίηση των στελεχιαίων αιμοποιητικών και προγονικών κυττάρων θεωρείται ότι ρυθμίζεται από το μικροπεριβάλλον (microenvironment).

Στο μυελό των ενηλίκων, το μικροπεριβάλλον αποτελείται από αιμοποιητικά και μη-αιμοποιητικά κύτταρα. Οι προσπάθειες που έγιναν για να καθορίσουν τους ρυθμιστικούς παράγοντες στα πλαίσια του μικροπεριβάλλοντος αυτού υποδεικνύουν ότι οι οστεοβλάστες είναι ρυθμιστικά στοιχεία του θυλάκου (niche) του αιμοποιητικού κυττάρου *in vivo* επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη λειτουργικότητα του άωρου αιμοποιητικού κυττάρου μέσω της ενεργοποίησης του Notch ¹³⁴ και πρωτεϊνών μορφοποίησης οστού ¹³⁵.

Τα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα έχουν εκτεταμένη ικανότητα αυτοανανέωσης. Αν και ο Leukemia inhibitory factor (LIF) συνδέεται με την ικανότητα αυτοανανέωσης των εμβρυϊκών στελεχιαίων κυττάρων του μυός, οι παράγοντες που ρυθμίζουν την ικανότητα αυτοανανέωσης των εμβρυϊκών κυττάρων του ανθρώπου δεν έχουν καθοριστεί με σαφήνεια ^{136,137}.

Οι κυτταροκίνες (cytokines) και οι χυμοκίνες (chemokines)-καθώς και οι υποδοχείς τους-δρουν μόνες ή σε συνδυασμό για τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων ¹³⁹⁻⁴³, γεγονός που περιλαμβάνει τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου καθώς και σημεία ελέγχου σε αυτόν ⁹⁵.

Οι κυτταροκίνες και άλλα ενδοκυττάρια μόρια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και/ή στην αυτοανανέωση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τα παρακάτω συνδετικά μόρια (ligands) και υποδοχείς (receptors): stem cell factor/steel factor/c-kit, Flt3 ligand ¹⁴³, Notch ligands/Notch ¹⁴⁴⁻¹⁴⁹, και Wnt3a/Frizzled ¹⁵⁰⁻¹⁵³. Ενδοκυττάρια μόρια που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και/ή στην αυτοανανέωση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων περιλαμβάνουν τα: p21cip1/waf1 ^{154,155}, HoxB4/PBX1 ¹⁵⁶⁻¹⁶¹, Bmi-

1^{162,163} και η μεμβρανική (stromal cell-derived) πρωτεΐνη mKIRRE¹⁶⁴. Επίσης, έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των στελεχιαίων εμβρυϊκών κυττάρων και οι παράγοντες Nanog¹⁶⁵⁻¹⁶⁷, Stat3¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ καθώς και ο Hex¹⁷¹.

Είναι επίσης πιθανό ότι τα ενδοκυττάρια μόρια που σχετίζονται με τη ρύθμιση των εμβρυϊκών και των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων μπορούν επίσης να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού (proliferation) και της αυτο-ανανέωσης (self-renewal) που τα χαρακτηρίζει. Ο Stat3 έχει συσχετιστεί με την in vivo ρύθμιση της αιμοποίησης¹⁷² και η φωσφορυλίωση υπολείμματος Ser στον Stat3, έχει συνδεθεί με τον πολλαπλασιασμό των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων σε απάντηση της συνδυασμένης διέγερσης από τον SCF (stem cell factor) και τον GM-CSF (granulo-macrophage colony-stimulating factor) ή της IL-3 (interleukin-3)¹⁷³.

Η υπερέκφραση του Hex έχει συσχετιστεί με αυξημένο πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς¹⁷⁴. Ο Stat5 έχει κρίσιμο ρόλο για τον Flt3 ligand στην διέγερση της ίδιας σειράς κυττάρων¹⁷⁵, ενώ το ενδοκυττάριο μόριο-σηματοδότης SHIP έχει συσχετιστεί με την ρύθμιση των αιμοποιητικών προγονικών¹⁷⁶ και στελεχιαίων¹⁷⁷ αιμοποιητικών κυττάρων.

Άλλες κυτταροκίνες που μπορεί να επηρεάζουν το πολλαπλασιασμό καθώς και/ή την αυτοανανέωση των στελεχιαίων κυττάρων είναι η θρομβοποιητίνη, η ογκοστατίνη M και η IL-20. Η θρομβοποιητίνη είναι μία πρωΐμως-δρώσα (early-acting) κυτταροκίνη¹⁷⁸ που σχετίζεται με την ανάπτυξη της αιμαγγειοβλάστης¹⁷⁹ και είναι ένα από τα στοιχεία που χρησιμοποιούνται από διάφορους ερευνητές, μαζί με τον SCF (Stem cell factor) και τον Flt3 ligand για την έκπτυξη (expansion) των στελεχιαίων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων in vivo^{37,180}.

Η ογκοστατίνη M είναι μια κυτταροκίνη που παράγεται από τα T1-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και ρυθμίζει την ομοιόσταση των προγονικών κυττάρων¹⁸¹.

Η IL-20, ένα σχετικά νέο μέλος της οικογένειας των ιντερλευκινών^{182,183}, είναι ένα δρών μόριο με ειδικότητα για τα CFU-GEMM μεταξύ άλλων προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς¹⁸⁴.

Η IL-20 έχει την ικανότητα να αυξάνει τους αριθμούς των CFU-GEMM τόσο σε

κυτταροκαλλιέργειες προγονικών κυττάρων προερχόμενα τόσο από μυελό όσο και από ΟΠ.Α, ανθρώπινης και ζωϊκής προέλευσης, με την παρουσία SCF(Stem cell factor) και ερυθροποιητίνης in vitro, ενώ δεν έχει επίσης in vitro, καμμία δράση σε προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα της ερυθρής, κοκκιώδους-μακροφαγικής ή μεγακαρυοτικής σειράς.

Επίσης, η IL-20 επίμυος αυξάνει τον αριθμό των CFU-GEMM αλλά όχι άλλων προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς και είναι με αυτό τον τρόπο η πρώτη κυτταροκίνη για την οποία αναφέρθηκε τέτοια ειδικότητα¹⁸⁴.

Επειδή τα CFU-GEMM μπορούν να ανακαλλιεργηθούν in vitro κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες συγκέντρωσης κυτταροκινών (SCF ± πλάσμα ΟΠ.Α)^{92,93,95}, είναι πιθανό ότι η IL-20 μπορεί να έχει θετική επίδραση τόσο στην πολλαπλασιαστική όσο και στην ικανότητα αυτοανανέωσης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων.

Η IL-20 συνδέεται και με τα δύο είδη είδη υποδοχέων της IL-20(R) I και II¹⁸⁵. Ο IL-20(R) I υποδοχέας αποτελείται από IL-20(R)α και IL-20(R)β υπομονάδες, ενώ ο IL-20(R) II από το IL-20(R)β τμήμα καθώς και ένα τμήμα της IL-22R. Τόσο ο IL-20(R) I όσο και ο IL-20(R) II διενεργούν ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω του Stat3¹⁸⁶. Ο Stat3 παίζει ουσιώδη ρόλο στην ομοίωση της ενδογενούς ανοσίας, σχετίζεται με σήματα αυτοανανέωσης που ενισχύονται από τον LIF στα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα^{168,169} και μαζί με τον JAK2 ενισχύει την ικανότητα αυτοανανέωσης σε στελεχιαία κύτταρα γενετικής προελεύσεως από Δροσόφιλα¹⁷⁰.

Όταν συνδυάζεται με ένα συνδιεγερτικό σήμα είτε από τον SCF/c-kit ή Flt3ligand/Flt3, ο Stat3 ενισχύει την ικανότητα αυτοανανέωσης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων¹⁸⁶.

Η αυτοανανέωση απαιτεί κυτταρική διαίρεση χωρίς απώλεια της ιδιότητας του στελεχιαίου κυττάρου (stemness) καθώς και παραμονή της ιδιότητας του πολυδύναμου (pluripotentiality) σε τουλάχιστον ένα από τα θυγατρικά κύτταρα¹⁸⁷.

Η διαδικασία κατά την οποία καθορίζεται η μοίρα του κυττάρου καθορίζεται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Το σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου (MSAC) εξασφαλίζει ότι ο κυτταρικός κύκλος δεν εξελίσσεται από την μετάφαση στην ανάφαση έως ότου όλα τα ζεύγη των χρωματίδων να έχουν τοποθετηθεί σωστά κατά μήκος του πεδίου της

μετάφρασης. Το MSAC έχει κριτική σημασία για την ορθή ρύθμιση της ικανότητας αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης, με την συμβολή πάντα διαφόρων μιτωτικών πρωτεϊνών.

Ο αναστολέας p21^{cip1/waf1} της εξαρτώμενης από την κυκλίνη κινάσης έχει συσχετιστεί με την συνεργική ενεργοποίηση, μαζί με τον SCF, του πολλαπλασιασμού των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων^{191,192} καθώς και με την ρύθμιση της λειτουργίας των στελεχιαίων κυττάρων^{154,155}.

Επειδή ο p21^{cip1/waf1} έχει επίσης συσχετιστεί με την ορθή λειτουργία του MSAC, ο MSAC μπορεί να εμπλέκεται στο πολλαπλασιασμό και/ή της αυτοανανέωσης των στελεχιαίων κυττάρων. Ακόμη περισσότερο, επειδή ο p21^{cip1/waf1} σχετίζεται με συνεργική δράση κυτταροκινών και οι κυτταροκίνες πιθανότατα επιδρούν της λειτουργία των στελεχιαίων κυττάρων¹⁹³, αυτές μπορούν να δρουν στα στελεχιαία κύτταρα μέσω του p21^{cip1/waf1} και του MSAC.

Επιπρόσθετα, οι κυτταροκίνες έχουν συσχετιστεί και με την επιβίωση/αντιαπόπτωση των προγονικών και στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων. Ένα από αυτά τα μόρια είναι η CXC χυμοκίνη, ο SDF-1/CXCL12, που σηματοδοτεί και ενισχύει τη δράση του μέσω του υποδοχέα του, CXCR4¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Έχει γίνει η υπόθεση ότι η τροποποίηση ακόμη και ενός ακόμη γενετικού στοιχείου μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα αυτοανανέωσης (self-renewal) καθώς και την ικανότητα διαφοροποίησης των άωρων αιμοποιητικών κυττάρων¹⁹⁷.

Πιθανά η συστηματική μελέτη της δράσης των προαναφερθέντων κυτταροκινών να δώσει την κρίσιμη ώθηση στην ερευνητική προσπάθεια για την δυνατότητα των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται *ex vivo* κάτω από εργαστηριακές συνθήκες καλλιέργειας (expansion), γεγονός που θα δώσει επιπλέον ώθηση στις θεραπευτικές εφαρμογές του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

2.5. Πολλαπλασιασμός (Proliferation) και έκπτυξη (Expansion) των HSPCs

Το δυναμικό πολλαπλασιασμού των HSPCs (καθοριζόμενο ως η ικανότητά τους να διαιρούνται και να παράγουν νέα θυγατρικά κύτταρα) καθώς και το δυναμικό έκπτυξης (η ικανότητα να παράγουν προγονικά κύτταρα) φαίνεται ότι είναι βιολογικοί παράμετροι που εξαρτώνται από ενδογενείς βιολογικούς παράγοντες.

Αυτοί οι παράγοντες σχετίζονται με το αν το προγονικό κύτταρο είναι ήδη ταγμένο να διαφοροποιηθεί σε μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και αν είναι έτσι από το είδος της σειράς καθώς και η ωριμότητά του. Παρ'όλα αυτά η ικανότητα του κυττάρου να εμφανίσει τέτοιο δυναμικό εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες που περιλαμβάνουν τα διάφορα είδη κυττάρων και κυτταροκίνες που αποτελούν μέρος του μικροπεριβάλλοντος μέσα στο οποίο το κύτταρο αναπτύσσεται ¹⁹⁸. Ο in vitro πολλαπλασιασμός και η έκπτυξη των HSPCs εξαρτάται επίσης από παραμέτρους όπως το καλλιεργητικό υλικό, η θερμοκρασία, η παρουσία ή η απουσία ορού, ο αριθμός των κυττάρων που καλλιεργούνται ανά τρυβλίο, κ.λ.π ¹⁹⁹.

Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει το αντικείμενο της έκπτυξης (expansion) in vitro καθώς και του πολλαπλασιασμού των HSPCs χρησιμοποιώντας είτε ολικά CD34⁺ κύτταρα ή CD34⁺ υποπληθυσμούς. Σε γενικές γραμμές, είναι φανερό ότι πρώιμοι πληθυσμοί CD34⁺(π.χ. CD34⁺Rhlo, CD34⁺ CD38⁻, CD34⁺ CD45RA^{lo}CD71^{lo}, CD34⁺CD45RA^{lo}CD71^{lo} Thy-1⁺) ^{55,67,68,200,201}, διαθέτουν αρκετά μεγαλύτερο δυναμικό έκπτυξης (expansion potential) από ότι οι περισσότερο ώριμοι αντίστοιχοι. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε υγρές καλλιέργειες που βασίζονται στην παρουσία κυττάρων στρώματος (stromal cells) ή σε απουσία αυτών των κυττάρων, αλλά με την παρουσία κυτταροκινών. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι προγονικά κύτταρα με μεγάλη ικανότητα έκπτυξης, μπορεί να έχουν χαμηλότερη δυνατότητα πολλαπλασιασμού από ότι κύτταρα με χαμηλότερη ικανότητα έκπτυξης. Πράγματι, μεταξύ τριών υποπληθυσμών κυττάρων CD34⁺ που ταυτοποιήθηκαν με βάση την έκφραση CD45RA και CD71, τα CD34⁺ CD45RA^{lo} CD71^{lo} κύτταρα δείχνουν την μεγαλύτερη ικανότητα έκπτυξης, ενώ τα CD34⁺ CD45^{RAlo} CD71⁺ είναι αυτά με τη μεγαλύτερη δυνατότητα πολλαπλασιασμού⁶⁷.

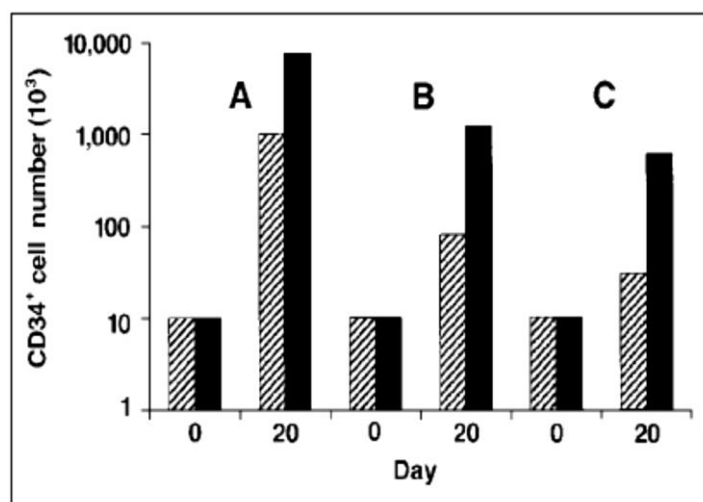
Ένα μεγάλο πρόβλημα στην προσέγγιση της ικανότητας έκπτυξης/πολλαπλασιασμού των

CD34⁺ κυττάρων είναι η ετερογένειά τους. Έτσι, όταν τέτοια κύτταρα καλλιεργούνται σε ογκώδεις καλλιέργειες, είναι εφικτό να εκτιμηθεί η ικανότητα έκπτυξης/πολλαπλασιασμού του πληθυσμού ως σύνολο, αλλά όχι η αυτή η ικανότητα κάθε είδους διαφορετικού τύπου κυττάρων ξεχωριστά. Για παράδειγμα, αν και έχει αποδειχθεί ότι τα CD34⁺CD45RA^{lo}CD71^{lo} κύτταρα αποτελούν τον πρωϊμότερο κυτταρικό υποπληθυσμό στο ανθρώπινο ΟΠ.Α έως σήμερα, αυτά εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια⁶⁷. Μεταξύ των προγονικών κυττάρων με αυτό το φαινότυπο, το 79% αποτελείται από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα καθώς και διδύναμα (GM) προγονικά κύτταρα, ενώ το 21% αποτελείται από μονοδύναμα προγονικά κύτταρα ερυθροκυτταρικής και μυελικής σειράς²⁰².

Ανάμεσα στα δεσμευμένα HPSCs, τα προγονικά κύτταρα της ερυθροκυτταρικής σειράς εμφανίζουν το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (proliferation potential) αποδίδοντας περίπου 9×10^6 κύτταρα από ένα προγονικό ενώ, σε αντίθεση, τα προγονικά κύτταρα των μακροφάγων εμφάνισαν το υψηλότερο δυναμικό έκπτυξης (expansion potential), παράγοντας έως 9×10^3 κύτταρα από ένα μοναδικό κύτταρο.

Η δυνατότητα των HPSCs να εκφράζουν δυναμικό πολλαπλασιασμού και έκπτυξης in vitro εξαρτάται και από το είδος των κυτταροκινών που είναι παρούσες στην καλλιέργεια.

Όπως φαίνεται στο επόμενο διάγραμμα, η έκπτυξη in vitro των CD34⁺ εξαρτάται τόσο από ενδογενείς (βιολογικές παράμετροι του κυτταρικού υποπληθυσμού) όσο και από εξωγενείς παράγοντες (κυτταροκίνες και συνθήκες καλλιέργειας).



Στην περίπτωση αυτή, υγρές καλλιέργειες κυττάρων ενοφθαλμίστηκαν με UCB-43

προερχόμενα κύτταρα με φαινότυπους $CD34^+CD45RA^{lo}CD71^{lo}$ (A), $CD34^+CD45RA^+CD71^{lo}$ (B) και $CD34^+CD45RA^+CD71^+$ (C). Στις καλλιέργειες προστέθηκε: SCF+IL-6+IL-3+Epo (διαγραμισμένες μπάρες) και SCF+IL-6+PIXY(πρωτεΐνη fusion GM-CSF-IL-3)+M-CSF+G-SCF (σκιασμένες μπάρες).

Μετά από 20 ημέρες καλλιέργειας, ο αριθμός των $CD34^+$ υπολογίστηκε και στους τρεις υποπληθυσμούς, με τον $CD34^+CD45RA^{lo}CD71^{lo}$ πληθυσμό (ο οποίος περιέχει τα περισσότερα άωρα HSPCs), να εμφανίζει το μεγαλύτερο δυναμικό έκπτυξης (expansion potential) σε σχέση με τους υπόλοιπους κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Επίσης βρέθηκε ότι ανεξάρτητα από τον υποπληθυσμό που καλλιεργήθηκε, ο συνδυασμός κυτταροκινών SCF+IL6+PIXY+M+CSF+G-SCF ήταν περισσότερο αποτελεσματικός στην προώθηση της έκπτυξης (expansion) των $CD34^+$ κυττάρων.

Όπως αποδεικνύεται, η ικανότητα των HPSCs να εκφράζουν ενδογενές δυναμικό έκπτυξης (expansion potential) καθώς και δυναμικό πολλαπλασιασμού (proliferation potential), εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το είδος των κυτταροκινών που είναι παρούσες στην καλλιέργεια. Όσον αφορά την έκπτυξη (expansion) των HSPCs, τα καλύτερα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί με τη χρήση συνδυασμούς κυτταροκινών που περιλαμβάνουν πρωίμως δρώντες παράγοντες όπως SCF, FL και Tpo.

Πράγματι, μια από τις μεγαλύτερες εκπτώξεις (expansion) των προερχομένων από ΟΠ.Α $CD34^+$ κυττάρων που έχει αναφερθεί έως σήμερα- 146×10^3 πλάσια έκπτυξη (expansion) στον αριθμό των $CD34^+$ και 2×10^6 πλάσια αύξηση του αριθμού των CFCs (Colony Forming Cells)-έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας FL και TPO¹⁰³.

Χρήση οψίμως-δρώντων παραγόντων, όπως EPO, συνήθως οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου αριθμού ωρίμων κυττάρων, παρ'όλα αυτά όμως δεν φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στην έκπτυξη^{66,67}.

Table 3. Ex vivo expansion of UCB CD34⁺ cells

Input cells	Cytokines	Days	CFC Expansion	CD34 ⁺ Expansion	Ref.
CD34 ⁺	SF, IL-3	30	5,000	nr	[68]
CD34 ⁺	SF, IL-1, IL-3	42	160	nr	[73]
CD34 ⁺	SF, IL-1, IL-3, IL-6	28	10	nr	[71]
CD34 ⁺	SF, IL-1, IL-3, E	21	2,364	nr	[75]
CD34 ⁺	FL, TPO	175	2 × 10 ⁶	146,000	[77]
CD34 ⁺ 4HC ^{ms}	SF, IL-3	7	92	nr	[76]
CD34 ⁺ HLA-DR ⁺	SF, IL-3	5	10	nr	[10]
CD34 ⁺ Rh ^{high}	SF, E	7	2.5	nr	[48]
CD34 ⁺ Rh ^{low}	SF, E	7	94	nr	[48]
CD34 ⁺ 45RA 71 Thy-1 ⁻	SF, IL-6, PX, G, M, E	40	241	900	[40]
CD34 ⁺ 45RA 71 Thy-1 ⁺	SF, IL-6, PX, G, M, E	40	4,719	32,000	[40]

Results represent mean fold expansion in CFC and CD34⁺ cell numbers in liquid cultures of CD34⁺ cells supplemented with the cytokine combinations shown and for the culture period (days) indicated. nr = not reported; E = Epo; G = G-CSF; M = M-CSF; PX = PIXY-321.

Στον παραπάνω πίνακα εμφανίζονται περιληπτικά αποτελέσματα μελετών που αφορούν την *in vitro* έκπτυξη (expansion) προερχόμενων από το ΟΠ.Α CD34⁺ κυττάρων.

Σε αντίθεση με τις κυτταροκίνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, οι αιμοποιητικοί αναστολείς, όπως οι TGF (transforming growth factor)-β, ο TNF-α και η IP (inflammatory protein)-1^α έχει βρεθεί ότι μειώνουν σημαντικά τόσο την έκπτυξη όσο και τον πολλαπλασιασμό διαφορετικών CD34⁺ κυτταρικών υποπληθυσμών από ΟΠ.Α ²⁰³. Πράγματι, ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποίησαν anti-transforming growth factor-β μονοκλωνικό αντίσωμα, μαζί με διεγερτικές της έκπτυξης κυτταροκίνες, με σκοπό να επιτύχουν σημαντική έκπτυξη των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων ⁵⁵.

Έκπτυξη (expansion) και πολλαπλασιασμός (proliferation) των HPSCs του ΟΠ.Α έχει επίσης μελετηθεί παρουσία πλάσματος τόσο από ΟΠ.Α όσο και από περιφερικό αίμα ενηλίκου οπότε και διαπιστώθηκε ότι το πλάσμα που προέρχεται από ΟΠ.Α, αυξάνει σημαντικά την έκπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των CD34⁺ κυττάρων σε σχέση με το πλάσμα περιφερικού αίματος ενηλίκου, γεγονός που υποδεικνύει ότι το πλάσμα που προέρχεται από ΟΠ.Α περιέχει κάποιο παράγοντα σημαντικό για την ανάπτυξη των HSPCs του ΟΠ.Α, ο οποίος απουσιάζει από το πλάσμα περιφερικού αίματος ενηλίκου ⁸⁷.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι η έκπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των HSPCs του ΟΠ.Α

επιηρεάζεται και από την πυκνότητα των κυττάρων στην καλλιέργεια. Ο Χiao και συν. σύγκριναν την δυνατότητα έκπτυξης και πολλαπλασιασμού των CD34⁺⁺⁺ κυττάρων όταν αυτά σε συγκέντρωση από 1 έως 5000 κύτταρα/per well, με την παρουσία ανασυνδυασμένων κυτταροκινών. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός ήταν εντονότερος σε καλλιέργειες με 1 κύτταρο ενώ η έκπτυξη προηγείτο σε καλλιέργειες με 5000 κύτταρα⁹⁸. Οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της έκπτυξης που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με μεγάλο αριθμό κυττάρων πιθανά οφείλεται στην μεγαλύτερη επαφή μεταξύ των κυττάρων οπότε υπάρχει ενεργοποίηση μεμβρανικών κυτταροκινών και επίσης ότι απαιτείται η συμπληρωματική προσθήκη κυτταροκινών επιπλέον των ήδη υπάρχοντων στην καλλιέργεια για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή έκπτυξη.

2.6. Παραγωγή λεμφικών και ενδοθηλιακών κυττάρων από CD34⁺ του ΟΠ.Α

Οι περισσότερες από τις μελέτες που αφορούν την in vitro ανάπτυξη των CD34⁺ κυττάρων του ΟΠ.Α έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή κυττάρων ερυθροειδούς, μυελοειδούς και μεγακαρυοτικής προέλευσης. Παρόλα αυτά έχει αποδειχθεί ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, που περιλαμβάνουν τη χρήση ορισμένων κυτταρικών σειρών προερχόμενων από ποντίκια, τα CD34⁺ κύτταρα του ΟΠ.Α μπορούν επίσης να παράγουν B λεμφοκύτταρα.

Ο Rawlings και συν.²⁰³, καλλιέργησαν CD34⁺ κύτταρα ΟΠ.Α στην κυτταρική σειρά στρώματος (murine stomal cell line) S17 και παρακολούθησαν την ανάπτυξη τους για περισσότερο από 12 εβδομάδες οπότε παρατήρησαν μια παροδική ανάπτυξη μυελικών κυττάρων ακολουθούμενη από προγονικά B κύτταρα. Καλλιέργειες που περιείχαν >90% πρώιμα B λεμφοκύτταρα (CD10⁺CD19⁺CD20⁻CD22⁻CD23⁻CD38⁺CD45⁺ κύτταρα) διατηρήθηκαν για περισσότερο από 12 εβδομάδες χωρίς την προσθήκη παραγόντων ανάπτυξης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα κύτταρα αυτά δεν ανταποκρίνονταν στις pre-B κυτταροκίνες IL-7 και SCF γεγονός που υποδεικνύει ότι η υποστήριξη της ανάπτυξης επιτυγχάνεται από έναν παράγοντα διασταυρούμενης δράσης που παράγεται από τα κύτταρα της S17 σειράς. Σε αυτού του είδους τις

καλλιέργειες μπορούσαν να παραχθούν $>10^8$ λεμφοκύτταρα από ένα τυπικό δείγμα ΟΠ.Α ²⁰⁴.

Σε άλλη μελέτη, διερευνήθηκε επίσης η παραγωγή των $CD10^+CD19^+$ Β κυττάρων σε καλλιέργειες $CD34^+ Lin^-$ κυττάρων που καλλιεργήθηκαν πάνω στην Sys-1 κυτταρική σειρά στρώματος ποντικού και σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, προστέθηκαν στην καλλιέργεια IL-6 και leukemia inhibitory factor. Από τα αποτελέσματα της έρευνας εκτιμήθηκε ότι περίπου το 1% των $CD34^+ Lin^-$ κυττάρων είναι ικανά να παράγουν τόσο μυελικής προελεύσεως όσο και Β λεμφοκύτταρα ²⁰⁵. Έχει αποδειχθεί ότι όταν τα $CD34^+ Lin^-$ καλλιεργούνται μαζί με MS-5 κύτταρα ποντικού, χωρίς την παρουσία εξωγενών κυτταροκινών, για περίοδο 6 εβδομάδων το 7% των $CD34^+CD38^-CD19^-$ κυττάρων είναι τόσο λεμφικά ($CD19^+$) και μυελοειδή ($CD11b^+$) ²⁰⁶.

Πιο πρόσφατα, η παραγωγή ενδοθηλιακών κυττάρων από ΟΠ.Α $CD34^+$ κύτταρα έχει επίσης αποδειχθεί. Σε μία μελέτη παρατηρήθηκε ότι όταν καλλιεργούνταν παρουσία ανασυνδυασμένης IL-2 και ρυθμισμένο διάλυμα κυττάρων της 5637 κυτταρικής σειράς καρκινώματος ανθρώπινης ουροδόχου κύστης, τα ΟΠ.Α $CD34^+$ κύτταρα δίνουν γένεση σε κυτταρική στοιβάδα που αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν παράγοντα von Willebrand, CD31, CD54, και CD62. Αυτά τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά για τη σχέση μεταξύ προγονικών κυττάρων ενδοθηλίου και $CD34^+$ κύτταρων ΟΠ.Α ²⁰⁷.

2.7. Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης (Genetic manipulation) των HSPCs

Η γενετική τροποποίηση των ανθρώπινων κυττάρων (συμπεριλαμβανομένων των HSPCs του ΟΠ.Α) είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα από την άποψη της βιοϊατρικής έρευνας εξαιτίας της πιθανής συσχέτισής της με τη θεραπεία συγκεκριμένων διαταραχών ²⁰⁸. Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει την επιτυχή εισαγωγή διαφόρων γονιδίων σε HSPCs μυελού των οστών ²⁰⁹⁻¹¹ ενώ παρόμοιες προσπάθειες έχουν γίνει και με τα HSPCs του ΟΠ.Α.

Σε μια μελέτη από τον Moritz και συν. έγινε σύγκριση της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς γονιδίων σε MNCs προέλευσης τόσο από το ΟΠ.Α όσο και από μυελό των οστών. Δύο γονίδια αναλύθηκαν, το TK-neo (το οποίο αφορά την ανθεκτικότητα στο G418- ένα ανάλογο της νεομυκίνης) και εκείνο που ρυθμίζει της δραστηριότητα της ADA (adenosine

deaminase), που εμπλέκεται στην εμφάνιση του SCID. Και τα δύο γονίδια μεταφέρθηκαν με επιτυχία σε HPSCs, μεταξύ των οποίων σε BFU-E, CFU-GM και LTC-IC²¹². Στην παραπάνω έρευνα παρατηρήθηκε επίσης ότι το ποσοστό ανθεκτικότητας στο G418 των BFU-E, CFU-GM και LTC-IC από ΟΠ.Α (53%, 36% και 25%, αντίστοιχα) ήταν αρκετά υψηλότερο σε σχέση με εκείνο που αφορούσε αντίστοιχα HPSCs από μυελό των οστών (24%, 13% και 10%, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά ότι τα HSPCs του ΟΠ.Α είναι καλύτεροι στόχοι για γονιδιακή μεταφορά από ότι τα HSPCs του μυελού των οστών και ότι πιθανώς να έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα όσον αφορά ορισμένα πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας.

Η μεταγωγή (transduction) in vitro του TK-neo γονιδίου σε CD34⁺⁺⁺ από ΟΠ.Α, μελετήθηκε από διάφορους ερευνητές ^{213,214}. Διαπιστώθηκε ότι το TK-neo γονίδιο μεταφερόταν αποτελεσματικά σε CFCs (colony forming cells), μεταξύ των οποίων και CFU-GEMM, CFU-GM καθώς και BFU-E, ακόμη και όταν χρησιμοποιήθηκε για την μεταγωγή adeno-associated virus 2 (ένας ιϊκός φορέας ο οποίος σε αντίθεση με τους κοινά χρησιμοποιούμενους retroviral vectors, μπορεί να ενσωματωθεί επιτυχώς σε κύτταρα ευρισκόμενα σε ηρεμία και χωρίς την προσθήκη κυτταροκινών).

Γενετικά τροποποιημένα CD34⁺ από ΟΠ.Α έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ατόμων με SCID ²¹⁵. Στα CD34⁺ έγινε μεταγωγή (transduction) με τη βοήθεια του ιϊκού φορέα LASN ο οποίος μετέφερε το TK-neo γονίδιο και cDNA φυσιολογικής ADA. Η αποτελεσματικότητα της μεταγωγής των τροποποιημένων HSPCs εκτιμήθηκε με χρήση καλλιεργητικών μεθόδων. Μετά από 18 μήνες μετά την μεταμόσχευση, σε όλους τους ασθενείς βρέθηκαν κοκκιοκύτταρα μυελού των οστών και MNCs που περιείχαν το LANS φορέα σε αναλογία 1/10000 κύτταρα. Αν και σε αυτή τη μελέτη δεν επιτεύχθηκε πλήρη ίαση των SCID ασθενών, τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά ενθαρρυντικά και δείχνουν την δυνατότητα της χρησιμοποίησης γενετικά τροποποιημένων HSPCs κυττάρων προερχόμενα από ΟΠ.Α σε κλινικές δοκιμές.

3. Κρυοκατάψυξη στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων του ΟΠ.Α

3.1 Εισαγωγή

Η διαδικασία της κρυοκατάψυξης η οποία είναι πολύ σημαντική για όλα τα είδη των συλλογών στελεχειαίων κυττάρων, είναι κριτικής σημασίας για το ΟΠ.Α.

Το μόσχευμα συλλέγεται κατά την περίοδο του τοκετού ή αμέσως μετά από αυτόν και συνήθως χρησιμοποιείται μετέπειτα, συχνά σε μη προκαθορισμένο λήπτη. Οι μονάδες ΟΠ.Α είναι συνήθως αποθηκευμένες είτε σε ιδιωτικές είτε σε δημόσιες τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος με τις δημόσιες τράπεζες να είναι συνήθως μη κερδοσκοπικοί οργανισμοί οι οποίοι προσφέρουν τις μονάδες ΟΠ.Α σε συμβατούς δότες μέσω εθνικού ή διεθνούς καταλόγου (registry), σε πιθανούς λήπτες²¹⁶.

Οι τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος αποθηκεύουν τη μονάδα ΟΠ.Α για τις πιθανές ανάγκες του ίδιου του δότη ή αλλιώς, στην περίπτωση των δημόσιων τραπεζών, για κάποιον συμβατό λήπτη, για σχετικά μη προσδιορισμένη χρονική περίοδο.

Υπάρχουν περίπου 400000 κατεψυγμένες μονάδες ΟΠ.Α σε 37 εθνικούς καταλόγους σε 21 χώρες. Περίπου 3000 μονάδες ΟΠ.Α έχουν δοθεί για μεταμόσχευση ως σήμερα, με τους ενηλίκους να έχουν λάβει το ένα τρίτο των μονάδων περίπου²¹⁷. Η διαδικασία της κρυοκατάψυξης περιλαμβάνει σε γενικές γραμμές τα παρακάτω στάδια:

- 1. Συλλογή του δείγματος, που περιλαμβάνει και την μείωση του όγκου της μονάδας-καλλιέργεια, μετρήσεις.**
- 2. Προσθήκη των κρυοπροστατευτικών.**
- 3. Η διαδικασία της κατάψυξης.**
- 4. Η απόψυξη-καλλιέργεια, μετρήσεις.**
- 5. Η διαδικασία της προετοιμασίας του δείγματος για μεταμόσχευση.**

Καμιά μεμονωμένη μέθοδος κρυοκατάψυξης δεν χρησιμοποιείται από όλα τα ερευνητικά κέντρα που ασχολούνται με την κρυοσυντήρηση μονάδων ΟΠ.Α, αλλά εφαρμόζονται παραλλαγές ανάλογα με το κέντρο οι οποίες λίγο έχουν διαφοροποιηθεί την τελευταία 15ετία. Σε γενικές

γραμμές τα HPSCs (Hematopoietic Progenitor Stem Cells) συλλέγονται με τους ελάχιστους δυνατούς χειρισμούς όπως έχει καθοριστεί από το Foundation for the Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy (FAHCT), με μια ελάχιστη δόση κυττάρων $2.5 \times 10^6 - 5.0 \times 10^6$ CD34⁺ κύτταρα/kg βάρους σώματος²¹⁸.

Στη συνέχεια το δείγμα υποβάλλεται σε διαδοχικές φυγοκεντρήσεις αφού προηγηθεί μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με διάφορες μεθόδους καθώς και κυτταροκαλλιέργεια σε διάφορα υλικά. Το κρυοπροστατευτικό διάλυμα που χρησιμοποιείται περιέχει συνήθως και DMSO 10% (Dimethylsulfoxide) και η τελική συγκέντρωση των κυττάρων στη μονάδα του ΟΠ.Α πριν αποθηκευτούν είναι $\sim 500 \times 10^6$ κύτταρα.

Αρχικά η μονάδα τοποθετείται στους -4°C ²¹⁹ και στη συνέχεια καταψύχεται στους -156°C (όταν αποθηκεύεται σε ατμόσφαιρα ατμών αζώτου) ή στους -196°C όταν αποθηκεύεται στην υγρή φάση του αζώτου. Για να εξασφαλιστεί η καταλληλότητα της μονάδας ΟΠ.Α πριν την χορήγησή της για θεραπεία, χρησιμοποιείται κάποια μέθοδος για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων όπως η Trypan Blue ή Propidium Iodine Assay ή/και κυτταρομετρία ροής (με 7-AAD), ενώ πριν από την έγχυση των αιμοποιητικών κυττάρων η μονάδα ΟΠ.Α αποψύχεται ταχέως σε υδατόλουτρο 37°C .

Πολλά από τα στοιχεία της διαδικασίας κατάψυξης των μονάδων ΟΠ.Α είναι ακόμη αντικείμενα έρευνας και έχουν δημοσιευθεί αρκετές εργασίες που αφορούν τη θερμοκρασία κατάψυξης, το ρυθμό ψύξης, την αντοχή της καταψυγμένης μονάδας στο χρόνο, το ρυθμό απόψυξης καθώς και τη θερμοκρασία απόψυξης^{217,220,221}.

3.2. Συνθήκες-μέθοδοι κρυοκατάψυξης

3.2.1. Θερμοκρασία-Ρυθμός ψύξης (Freezing rate)

Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται για την κρυοσυντήρηση των στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων την τελευταία δεκαπενταετία κυμαίνονται από -80°C έως και -196°C αναλόγως του φορέα της κρυοκατάψυξης (μηχανικός καταψύκτης, ατμοί υγρού αζώτου καθώς και υγρή φάση του αζώτου).

Η εξέλιξη στη χρήση των θερμοκρασιών κρυοσυντήρησης ήταν από τις χαμηλές θερμοκρασίες (-196⁰C τη δεκαετία του 1980) μέχρι τους -80⁰C την δεκαετία του 1990 ^{216,222-229}. Σε συνέχεια των πρόσφατων αναφορών σχετικά με τη διασπορά λοιμωδών παραγόντων (π.χ. *aspergillus spp.* καθώς και διάφοροι ιοί) μέσω της υγρής φάσης των δοχείων αζώτου, οι συνιστώμενες βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης των μονάδων ΟΠ.Α είναι στις συνθήκες ατμών αζώτου, στους -156⁰C, με τους μηχανικούς κρυοκαταψύκτες να αποτελούν, πιθανώς, μια βιώσιμη εναλλακτική λύση.

Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει την πιθανότητα της αποθήκευσης των μονάδων ΟΠ.Α σε θερμοκρασίες άνω του μηδενός, στους 4⁰C, όπου όμως αναφέρεται μεγάλη μείωση των CFU-GM που αφορούν μονάδες ΟΠ.Α αποθηκευμένες για χρονικό διάστημα ≥ 9 ωρών σε θερμοκρασίες 4⁰C ή 25⁰C ^{230,231}.

Ο ρυθμός της κατάψυξης είναι ένα θέμα για το οποίο δεν υπάρχει ομοφωνία μεταξύ των διαφόρων ερευνητών. Η τεχνική της ελεγχόμενης κλασματικής κατάψυξης θεωρείται ακόμη ο κανόνας κυρίως διότι η απελευθέρωση της θερμότητας που παρατηρείται κατά την μετάβαση στους 4⁰C έχει αποδειχθεί καταστροφική για τα στελεχιαία κύτταρα. Σε αυτό το σημείο θερμοκρασίας τα μόρια του νερού μέσα στην ψυχόμενη μονάδα βρίσκονται σε ακριβή μοριακή διάταξη, κατάσταση που οδηγεί σε θερμοδυναμική απελευθέρωση θερμότητας τήξεως. Κατά τη διάρκεια της κλασματικής κατάψυξης τα συμπυκνωμένα στελεχιαία κύτταρα ψύχονται με ρυθμό 1-2⁰C/min μέχρι τη θερμοκρασία -40⁰C. Στη συνέχεια η διαδικασία κατάψυξης συνεχίζεται με γρηγορότερο ρυθμό, περίπου 3-5⁰C/min, μέχρι τη θερμοκρασία των -120⁰C. Για το ΟΠ.Α, το μυελό των οστών και το PBSC η διαδικασία της κλασματικής κατάψυξης ^{232,233} θεωρείται αποδοτικότερη διαδικασία σε σχέση με τις διαδικασίες κατάψυξης που δεν είναι κλασματικές. Παρ'όλα αυτά, η κλασματική διαδικασία κατάψυξης έχει και ορισμένα μειονεκτήματα όπως ότι είναι γενικά χρονοβόρος και απαιτεί την ύπαρξη εξειδικευμένου προσωπικού, μειονεκτήματα που είχαν ως αποτέλεσμα την πειραματική χρήση της μη κλασματικής κατάψυξης όπου το δείγμα πρώτα ψύχεται στους -4⁰C και στη συνέχεια τοποθετείται σε καταψύκτη στους -80⁰C ή σε υγρή φάση αζώτου.

Αρκετές αναφορές^{222,225,226} έδειξαν ότι η μη κλασματική μέθοδος κατάψυξης είναι ασφαλής και μπορεί, υπό ορισμένες συνθήκες, να παράγει συγκρίσιμα αποτελέσματα σε σχέση με την κλασματική μέθοδο τουλάχιστον όσον αφορά τον ΒΜ ή τα PBSCs.

Σε πρόσφατη μελέτη από τον Oteyza και συνεργάτες²²⁷ διαπιστώθηκε ότι οι δύο τύποι κατάψυξης είναι συγκρίσιμοι όσον αφορά την βιωσιμότητα (viability) και επίσης ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση των CFU-GM στις μονάδες που είχαν επεξεργαστεί με τη μη κλασματική μέθοδο αν και αυτή η μέθοδος παραμένει ως βιώσιμη λύση για τις μονάδες ΟΠ.Α²³⁴.

Δεν υπάρχει επίσης συμφωνία που να αφορά το ζήτημα της απόσβεσης της θερμότητας που παράγεται κατά της διάρκεια της πρώτης φάσης της κατάψυξης. Παρόλα αυτά μια πρόσφατη μελέτη υπογράμμισε την αξία της διαδικασίας αυτής συγκρίνοντας πέντε διαφορετικά πρωτόκολλα κλασματικής κατάψυξης²¹⁹.

Τα πρωτόκολλα που περιλάμβαναν κλασματική κατάψυξη πέντε βημάτων για την καλύτερη απόσβεση της θερμότητας που παράγεται, βρέθηκαν ότι οδηγούσαν σε κύτταρα με υψηλότερη βιωσιμότητα μετά την απόψυξη των μονάδων ΟΠ.Α.

3.2.2. Διάρκεια-χρόνος παραμονής του ΟΠ.Α. στην κρυοσυντήρηση

Η ακριβής χρονική διάρκεια παραμονής στην κατάψυξη, που καθορίζεται ως το χρονικό διάστημα για το οποίο τα στελεχιαία κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν, είναι ακόμη σχετικά ασαφής.

Η βιωσιμότητα των στελεχιαίων κυττάρων στην κρυοσυντήρηση έχει ελεγχθεί σε διαφορετικές μελέτες²²³ ενώ για τον έλεγχο της ικανότητας λειτουργικής αιματολογικής αποκατάστασης πριν και μετά την κατάψυξη, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι. Ενώ τα BFU-E και CFU-GM φαίνεται να μειώνονται νωρίτερα στη διάρκεια της κρυοκατάψυξης, η ανάκτηση των NCs (Nucleated Cells) και των CD34⁺ κυττάρων καθώς και αυτή καθαυτή η ικανότητα εμφύτευσης (engraftment) σε NOD/SCID ποντίκι, φαίνεται ότι διατηρείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα^{216,222,225,227,228,234,235}. Αυτές οι παρατηρήσεις έγιναν αρχικά σε

μυελό των οστών και PBSCs ενώ παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν σε στελεχειαία κύτταρα ΟΠ.Α
95,236,237-40 .

Η μέθοδος ελέγχου που περιλαμβάνει το NOD-SCID ποντίκι θεωρείται ότι είναι η περισσότερο ενδεικτική για την εκτίμηση της δυνατότητας ανασύστασης του αιμοποιητικού συστήματος του λήπτη προϊόντων HSCs, αλλά δεν έχει πρακτική σημασία στην καθημερινή εργαστηριακή και πράξη ²⁴¹⁻²⁴⁴. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, η αντοχή των μονάδων ΟΠ.Α στην μακρά κρυοσυντήρηση μπορεί να κυμαίνεται από από λίγους μήνες έως και αρκετά έτη ^{224,234,244-247}, χωρίς όμως να έχουν προκύψει οριστικά συμπεράσματα για την αντοχή των μονάδων ΟΠ.Α.

3.2.3 Κρυοσυντηρητικές (cryopreservatives) ουσίες σε χρήση

Οι κρυοπροστατευτικές ουσίες είναι απαραίτητα πρόσθετα στις μονάδες των ΟΠ.Α, μιας και εμποδίζουν τον σχηματισμό ενδο- και εξωκυττάρων κρυστάλλων και άρα τον κυτταρικό θάνατο.

Το κύριο κρυοπροστατευτικό που χρησιμοποιείται είναι το DMSO, το οποίο προστατεύει τα ζωντανά κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο ²⁴⁸.

Αρχικά είχε εισαχθεί στην ιατρική πρακτική ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας και είναι ακόμη, περιστασιακά, σε χρήση σε ορισμένα ρευματολογικά νοσήματα ^{249,250}. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις ~10% w/v συνδυαζόμενο συνήθως με φυσιολογικό ορό και αλβουμίνη ορού ^{217,222,225,251} και έχει βρεθεί ότι αυτοί οι συνδυασμοί είναι σχετικά ασφαλής και μη τοξικοί για τα στελεχειαία κύτταρα. Παρόλα αυτά το DMSO έχει συσχετιστεί με κλινικά σημαντικές παρενέργειες που αφορούν τη χρήση του, όπως ναυτία, εμετός και κοιλιακά άλγη σε περίπου μισά από τα περιστατικά που έχουν αναφερθεί ²⁵².

Άλλα σοβαρότερα συμπτώματα αφορούν διάφορα συστήματα όπως το καρδιαγγειακό ²²⁰, αναπνευστικό ^{218,225}, ΚΝΣ ^{221,253-255}, νεφρά, καθώς και συμβάματα όπως αιμόλυση ²⁵⁶ και ηπατοτοξικότητα.

Μια πρόσφατη έρευνα που περιλάμβανε στοιχεία από 97 EBMT κέντρα μεταμόσχευσης, αποκάλυψε ότι η συσχετιζόμενη με το DMSO αναφερόμενη τοξικότητα εκτός από τα περιστατικά

ναυτίας και εμετών, εμφανίζονται σε αναλογία περίπου 1 : 50 μεταμοσχεύσεις, δηλαδή 2,2% περίπου κατά μέσο όρο στο σύνολο των μεταμοσχεύσεων.

Με βάση την δεδομένη τοξικότητα του DMSO, νεώτερες προσεγγίσεις δοκιμάστηκαν με χαμηλότερες συγκεντρώσεις-από 2,2 έως και 6%^{222-225,257,258} που βρέθηκαν ότι είναι αποτελεσματικές όσον αφορά το μυελό των οστών, τα PBSCs και το ΟΠ.Α.

Άλλες μελέτες²¹⁹ έδειξαν ότι το DMSO σε συγκέντρωση 10% υπερέχει ως κρυοπροστατευτικό σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του. Με σκοπό την ενίσχυση του προστατευτικού αποτελέσματος, το DMSO έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία μαζί με το εξωκυτταρικό προστατευτικό hydroxyethyl starch (HAES) για την κατάψυξη των PBSCs, ΟΠ.Α και μυελού των οστών^{225,226}.

Εναλλακτικοί τρόποι συντήρησης για την κρυοκατάψυξη είναι με την χρήση άλλων κρυοσυντηρητικών όπως προπύλενογλυκόλη, συνδυασμοί α-τοκοφερόλης, καταλάσης και ασκορβικού οξέος καθώς και η τρεχαλόζη-διμερές της γλυκόζης-ως εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο κρυοπροστατευτικό^{235,239,259}.

3.2.4 Βέλτιστη συγκέντρωση κυττάρων (MNCs, HSPCs)

Η έγχυση των κρυοκατεψυγμένων στελεχειαίων κυττάρων στον λήπτη έχει συσχετιστεί με κυμαινόμενη τοξικότητα η οποία εν μέρει σχετίζεται με το συνολικό όγκο καθώς και με το είδος των κρυοπροστατευτικών στη μονάδα^{220,221,260}.

Ο Rowley και συν., διαπίστωσαν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων (έως 5.6×10^8 NC/ml) στην μονάδα κρυοκατάψυξης είναι καλά ανεκτές, δεν σχετίζονται με σημαντικές παρενέργειες και οδηγούν σε καλά κλινικά αποτελέσματα, παρόμοια δε συμπεράσματα έχουν εξαχθεί και από άλλες μελέτες^{217,261,262}.

Αν και δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τον ακριβή αριθμό των κυττάρων που απαιτούνται για μια επιτυχή μεταμόσχευση²⁶³, ο μεγαλύτερος αριθμός CD34⁺ κυττάρων στο ΟΠ.Α σχετίζεται με ταχύτερη εμφύτευση (engraftment) του μοσχεύματος²⁶⁴⁻⁶⁶. Σε γενικές γραμμές, για πρακτικούς λόγους, μια συγκέντρωση των TNC κυττάρων $\sim 20 \times 10^6$ NC/ml είναι αποδεκτή^{217,267,268}.

3.3. Απόψυξη-ανασύσταση της μονάδας ΟΠ.Α

Διάφορες τεχνικές έχουν προταθεί για την απόψυξη αλλά η μέθοδος αναφοράς είναι η ταχεία θέρμανση της μονάδας σε υδατόλουτρο 37°C έως ότου οι εμφανείς κρύσταλλοι να διαλυθούν²²⁷. Μία γερμανική έρευνα σύγκρινε δύο διαφορετικές μεθόδους απόψυξης; στη μια γινόταν χρήση του υδατόλουτρου και στην άλλη γινόταν χρήση ξηρής θερμοκρασίας 37°C με τη βοήθεια επιθεμάτων γέλης. Η βιωσιμότητα καθώς και το δυναμικό πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης ήταν παρόμοιο, με μια τάση μικρότερου αριθμού επιμολύνσεων στην μεθοδολογία της ξηρής θέρμανσης²⁶⁹.

Διάφορες μέθοδοι έχουν εξετάσει την διατήρηση της λειτουργικότητας όταν οι μονάδες αποψύχονται σε θερμοκρασίες από $0-37^{\circ}\text{C}$ ^{227,238}. Σε μελέτη από τον Yang και συν. όπου έγινε σύγκριση του αποτελέσματος στη λειτουργικότητα της μονάδας ΟΠ.Α εξαιτίας της διαφορετικής θερμοκρασίας επώασης της αποψυχόμενης μονάδας στους 0, 20 και 37°C για 20 min, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές²³⁸.

Η χρήση του κρυοπροστατευτικού αποδείχθηκε μη τοξική για τα στελεχιαία κύτταρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κρυοκατάψυξης, όπως άλλωστε είχε βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες^{217,251}. Η μείωση της συγκέντρωσης του DMSO στη θερμοκρασία της απόψυξης-λόγω της τοξικότητας του για τον λήπτη- έχει διερευνηθεί σε διάφορες μελέτες κυρίως διενεργώντας πλύσιμο της μονάδας ή αραίωση^{257,270}, χωρίς να έχει επηρεαστεί σημαντικά η βιωσιμότητα των στελεχιαίων κυττάρων.

Στα πλαίσια της μείωσης της τοξικότητας της μονάδας ΟΠ.Α εξαιτίας της χρήσης του DMSO, η διαδικασία της έκπλυσης της μονάδας είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη^{239,271}. Η διαδικασία της έκπλυσης του DMSO από τη μονάδα, έχει θετικές συνέπειες για τον λήπτη (π.χ. μείωση της τοξικότητας) αφού ο βαθμός της τοξικότητας του DMSO είναι ανάλογος με την ποσότητά του στη μονάδα ΟΠ.Α²³⁰. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η έκπλυση του DMSO μπορεί να ενισχύσει τη διαδικασία εμφύτευσης (engraftment) του μοσχεύματος στον λήπτη²⁷². Ένα τέτοιο πρωτόκολλο έκπλυσης, όπως εκείνο του New York Blood Center²⁷¹ περιλαμβάνει δύο βήματα

αραιώσης του διαλύματος των στελεχειαίων κυττάρων με 2,5% ανθρώπειο αλβουμίνη ορού και 5% dextran 40, ακολουθούμενο από φυγοκέντρηση στους 10⁰C για 10min. Το υπερκείμενο στη συνέχεια απομακρύνεται και στη συνέχεια η αλβουμίνη με το διάλυμα dextran προστίθεται εις διπλούν μέχρι μια τελική συγκέντρωση DMSO περίπου 1,7%. Αν και η διαδικασία αυτή είναι σχετικά ασφαλής και με αποδεκτή τιμή ανάκτησης (recovery) και απόδοση καλλιέργειας²⁷³, είναι εξαιρετικά εργώδης και συνοδεύεται από σχετική απώλεια κυττάρων^{274,275}.

3.4. Λοιμώδεις παράγοντες και κρουσυντήρηση μονάδων ΟΠ.Α

Η μικροβιακή επιμόλυνση των μοσχευμάτων αποτελεί ένα σημαντικό κίνδυνο για τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Το FDA εκτιμά ότι 7 θάνατοι κατ'έτος που σχετίζονται με τη μεταμόσχευση θα μπορούσαν να έχουν αποφευχθεί αν δεν εμφανίζονταν λοιμώξεις σχετιζόμενες με την έγχυση των κυττάρων του δότη²⁷⁶. Το συνολικά εμφανιζόμενο ποσοστό επιμολύνσεων είναι μεταξύ 0 και 4,5%²⁷⁷⁻⁸³. Το μεγαλύτερο μέρος των μικροβίων που απομονώνονται είναι δερματική χλωρίδα (skin flora) και επιμολύνονταν μικρόβια (commensals), ενώ τα υπόλοιπα είναι κυρίως εντεροβακτηριακά.

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει διαγραμματικά την συνολική συχνότητα εμφάνισης των κυριότερων ειδών μικροβίων που απομονώθηκαν από επιμολυνθείσες μονάδες στελεχειαίων κυττάρων^{277,281,282}:

TABLE I. Organisms Cultured/Overall Incidence of Positive Cultures

Organisms cultured	Overall incidence of positive cultures (%)
<i>Staph. epidermidis</i> and other coagulase negative Staphylococcus (CNS)	3–11.7
<i>Propionibacterium acni</i>	0.6–2.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0–1.6
<i>Bacillus cereus</i> and other Bacillus spec.	0.06–0.35
<i>Pseudomonas spec.</i> (aeruginosa, putida and fluoresces)	0.1–0.8
<i>Corynebacterium spec.</i>	0–0.3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0–0.3
Mixed cultures	0.1–1.6

Η διαδικασία της κρουκατάψυξης έχει συσχετιστεί με μείωση των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν. Σε μια γερμανική μελέτη η απομόνωση *Staphylococcus epidermidis* μειώθηκε κατά 9,3% κατά μέσο όρο και της *Escherichia coli* κατά 18,1%²⁸⁴. Επίσης, διάφορες μελέτες

ανέφεραν την επίπτωση των θετικών καλλιεργείων μετά την απόψυξη^{282,283,285}, γεγονός το οποίο είναι ενδεικτικό επιμόλυνσης μέσω των φιαλιδίων καλλιέργειας. Η επίπτωση της σηψαιμίας μετά την έγχυση μονάδας στελεχιαίων κυττάρων, η οποία είχε θετική καλλιέργεια για μικρόβια δερματικής χλωρίδας (skin flora) και επιμολύνοντα μικρόβια (commensals), είναι χαμηλή και τα περισσότερα από τα επεισόδια πυρετού που εμφανίζονται μετά την έγχυση είναι αντιμετωπίσιμα με τη χρήση αντιβιοτικών²⁸².

Η ανθεκτικότητα των ιών σε περιβάλλον υγρού αζώτου είναι γνωστή από παλαιότερα²⁸⁶. Σε μία μελέτη αναφέρεται η εμφάνιση επιδημικού κύματος ηπατίτιδας Β σε λήπτες αυτόλογου μοσχεύματος μυελού των οστών²⁸⁷, γεγονός που σχετίστηκε με τη βοήθεια νουκλεοτιδικής ανάλυσης με κάποια άλλη μονάδα που βρισκόταν κατεψυγμένη στο ίδιο δοχείο²⁸⁸. Η συνέχεια της ανάλυσης του συγκρίματος (debris) του δοχείου κατάψυξης απέδειξε την διασπορά του λοιμώδους παράγοντα μέσω της υγρής φάσης του αζώτου, ενώ και άλλα τέτοια επιδημικά κύματα έχουν αναφερθεί²⁸⁹.

Για να αποφευχθούν λοιμώξεις οφειλόμενες σε έγχυση επιμολυσμένης μονάδας στελεχιαίων κυττάρων γενικά προτείνονται τα ακόλουθα μέτρα:

1. Η επεξεργασία των μονάδων να γίνεται σε καθαρές επιφάνειες και να διενεργείται λεπτομερής μικροβιολογικός έλεγχος των μονάδων σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας, όπως προβλέπεται από τα καθιερωμένα standards^{290,291}.
2. Ανίχνευση της επιμόλυνσης πριν την έγχυση, γεγονός που μπορεί να γίνει αυτοματοποιημένα, όπως σε άλλα προϊόντα αιμοδοσίας.
3. Έλεγχος των δοτών, ακόμη και σε αυτόλογες περιπτώσεις, σύμφωνα με τις οδηγίες²⁹⁰ και στην περίπτωση ανευρέσεως επιμολυσμένου μοσχεύματος θα πρέπει αυτό να φυλάσσεται ξεχωριστά²⁹² ή να απορρίπτεται αν υπάρχει η δυνατότητα αντικατάστασής του.

3.5. Ποιοτικός έλεγχος(QC) των μονάδων ΟΠ.Α

Ποιοτικός έλεγχος είναι το σύνολο των ενεργειών που έχουν προγραμματιστεί και υλοποιούνται με σκοπό τη διασφάλιση ότι όλα τα συστήματα και οι διαδικασίες που επηρεάζουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος είναι αξιόπιστες και λειτουργούν όπως αναμένεται ²⁹³.

Ένα πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου περιλαμβάνει ένα σύστημα μεταβλητών με σκοπό την παραγωγή ενός τελικού προϊόντος που είναι ασφαλές, αποτελεσματικό και κατάλληλο για την ενδεδειγμένη χρήση. Από την λήψη και την επεξεργασία έως την μεταμόσχευση και την παρακολούθηση του ασθενή, το πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου καθορίζει μια σειρά από controls σημεία ελέγχου καθώς και μηχανισμούς ανάδρασης (feedback) που εξασφαλίζουν της ομοιομορφία του προϊόντος ενώ ταυτοχρόνως αποκαλύπτουν τάσεις (trends), αποτρέπει από λάθη και βοηθά στην συνεχή διαδικασία βελτίωσης. Αυτή η προσέγγιση, που έχει προωθηθεί από το FDA ²⁹⁴ AABB ²⁹⁵ και NETCORD/FAHCT ²⁹⁶, ως φορείς διαπίστευσης και έχει οδηγήσει την έννοια της τράπεζας καθώς και της μεταμόσχευσης ΟΠ.Α σε υψηλό επίπεδο, όσον αφορά τον έλεγχο ποιότητας.

Ένα πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να δίνει τη δυνατότητα στην τράπεζα ΟΠ.Α να διατηρεί ένα καλό επίπεδο cGMP (good manufacturing practice) καθώς και ένα καλό επίπεδο cGTP (good tissue practice) και έτσι να συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις του ελέγχου. Αν και οι απαιτήσεις GMP είναι συνήθως περισσότερο εκτεταμένες και αυστηρές από τις GTP, σε κάθε περίπτωση πρέπει να μοιράζονται κοινές παραμέτρους ποιοτικού ελέγχου όπως: σχέδιο ποιοτικού ελέγχου, έλεγχος (control) εγγράφων και διαδικασιών, αναφορά της απόκλισης και ανεπιθύμητων παρενεργειών, διαχείριση της τράπεζας, εκπαίδευση του προσωπικού, δειγματοληπτικός έλεγχος των δοτών, παρακολούθηση (monitoring) του περιβάλλοντος χώρου της τράπεζας, διαχείριση των προμηθειών, αξιολόγηση, έλεγχος της επεξεργασίας, κ.ά. ²⁹⁷.

Σε γενικές γραμμές ότι οι άξονες λειτουργίας του QC θα πρέπει να περιλαμβάνουν και τα ακόλουθα ²⁹⁸:

- Αναθεώρηση και αποδοχή όλων των standard operation procedures (SOPs) πριν την χρήση τους καθώς και την επιβεβαίωση ότι συμφωνούν με τις νομικές και

ρυθμιστικές απαιτήσεις.

- Εξασφάλιση ότι τα πρωτόκολλα αξιολόγησης, τα προγράμματα εκπαίδευσης και οι διάφορες δοκιμασίες (tests) είναι γραπτά και τοποθετημένα στη θέση τους.
- Αναθεώρηση και αποδοχή συστήματος ελέγχου εντύπων και αρχείου.
- Αναθεώρηση και αποδοχή σχεδίων διόρθωσης, καταγραφής ανεπιθυμητών ενεργειών, καταγραφής μη-συμμόρφωσης, καταγραφής αποκλίσεων (deviations) και παραπόνων πελατών.
- Επιβεβαίωση ότι οι αλλαγές που τυχόν γίνονται στα SOPs, καταγράφονται και αξιολογούνται.
- Επιβεβαίωση ότι τα SOPs ισχύουν για όλες τις διαδικασίες του QC και ο καθορισμός των καθηκόντων του τμήματος QC.

Γενικά είναι πολύ σημαντικό να γίνει κατανοητή η ανάγκη της ύπαρξης κάποιου προγράμματος ποιοτικού ελέγχου (QC) στην τράπεζα ΟΠ.Α. Μεταξύ άλλων, μερικά από τα προβλήματα που αναφέρονται σχετικά είναι όχι σωστά σεσημασμένα αντιδραστήρια²⁹⁹, αποτυχία στη χρήση των σωστών αντιδραστηρίων, αποδοχή μονάδας ΟΠ.Α με λανθασμένα στοιχεία³⁰⁰, κ.α.

4. Μεταμόσχευση στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων

4.1. Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα όλων των αιματολογικών σειρών³⁰¹ και είναι από τα περισσότερο μελετηθέντα.

Η εξέλιξη της αιμοποίησης στον οργανισμό ακολουθεί τρία στάδια: μεσοδερμικό (λεκιθικός ασκός), ηπατοσπληνικό και μυελικό στάδιο. Μετά τη γέννηση η αιμοποίηση συμβαίνει μόνο στο μυελό των οστών ενώ εξωμυελική ερυθροποιΐα συμβαίνει μόνο σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. χρόνια μυελογενής λευχαιμία και μυελοϊνωση), εκτός εάν ένας αιμοποιητικός αυξητικός

παράγοντας χορηγηθεί (π.χ. G-CSF).

Οι πηγές αιμοποιητικών κυττάρων στους ενήλικες περιορίζονται στον μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα όπου μικρός μόνο αριθμός τους κυκλοφορεί, με πρόσθετες πηγές το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και το εμβρυϊκό ήπαρ³⁰².

Στην περίοδο μεταξύ του πρώτου και δεύτερου τριμήνου της εμβρυϊκής ερυθροποίησης, το ήπαρ σχετίζεται με την αιμοποίηση. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου είναι θεωρητικά δυνατόν το εμβρυϊκό ήπαρ να χρησιμοποιηθεί ως πηγή αιμοποιητικών κυττάρων, όμως για προφανείς ηθικούς αλλά και τεχνικούς λόγους αυτό δεν είναι εφικτό αφού μπορούν να χρησιμοποιηθεί εμβρυϊκό ήπαρ που προέρχεται μόνο από αποβληθέντα κνήματα και συνεπώς δεν έχει κλινική χρήση³⁰².

Οι πρώτες επιτυχείς αλλογενείς μεταμοσχεύσεις αιμοποιητικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1960 για τη θεραπεία συγγενών ανοσοανεπαρκειών σε παιδιά, χρησιμοποιώντας τον μυελό συγγενών δοτών που ήταν ορολογικά συμβατοί με τους λήπτες³⁰³.

Σήμερα, ο μυελός για την αλλογενή μεταμόσχευση λαμβάνεται από δότες που είναι HLA συμβατοί με τους λήπτες, η δε λήψη συμβαίνει κάτω από γενική αναισθησία με το μυελό να λαμβάνεται με μικρές αναρροφήσεις από τις λαγόνιες ακρολοφίες και στη συνέχεια ο μυελός μεταγγίζεται στον λήπτη με τη βοήθεια ενδοφλέβιου καθετήρα.

Σε αρκετές περιπτώσεις, η μετάγγιση PBSCs (Peripheral Blood Stem Cells) είναι η προτιμώμενη εναλλακτική λύση σε σχέση με τη χρήση του μυελού των οστών, παρ'όλα αυτά όμως η εξωμυελική παρουσία των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων είναι περιορισμένη³⁰².

Με σκοπό να παράγουμε τον επιθυμητό αριθμό στελεχιαίων κυττάρων στο περιφερικό αίμα για τη μεταμόσχευση, οι πιθανοί δότες θα πρέπει να λάβουν κάποιο παράγοντα κινητοποίησης των στελεχιαίων κυττάρων στο μυελό, όπως ο G-CSF, με σκοπό την μετακίνηση των στελεχιαίων κυττάρων από το μυελό στο περιφερικό αίμα.

Η συλλογή των στελεχιαίων κυττάρων από το αίμα του δότη γίνεται 5 ημέρες περίπου από την έγχυση του παράγοντα³⁰⁴.

Το ΟΠ.Α αποτελεί επίσης μια πηγή πλούσια σε HSPCs καθώς και εύκολα προσπελάσιμη . Επιπρόσθετα, η συγκέντρωση των HSPCs στο ΟΠ.Α., είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από εκείνη στο περιφερικό αίμα ενώ αντίθετα η ανοσολογική αντίδραση από τη μεταμόσχευση είναι κατά πολύ μικρότερη πράγμα που επιτρέπει την μικρότερη επίπτωση του GVHD στην μεταμόσχευση ΟΠ.Α ^{302,305} .

Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ταχεία εμφύτευση (engraftment) του μοσχεύματος που αποδεικνύεται από την άνοδο των πολυμορφοπύρηνων και των αιμοπεταλίων στο αίμα του λήπτη καθώς και μειωμένη τοξικότητα χωρίς αύξηση της συχνότητας του GVHD σε σχέση με τους λήπτες του μυελού ³⁰⁶ .

Παρόλα αυτά, ο μικρός τελικός όγκος της επεξεργασμένης μονάδας ΟΠ.Α και συνεπώς ο σχετικά μικρός αριθμός των εμυρήνων κυττάρων που περιέχονται δυσχεραίνει τη χρήση της στους ενήλικες.

Αρκετές νόσοι, αιματολογικής φύσεως και μη, θεραπεύονται με τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων προερχόμενα από ΟΠ.Α, με τις περισσότερο συνηθισμένες από αυτές να είναι οι οξείες λευχαιμίες καθώς και άλλες νεοπλασματικές παθήσεις.

Ένα μεγάλο φάσμα άλλων κληρονομικών και μη παθήσεων μπορεί επίσης να αντιμετωπισθεί με την μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων όπως πολλές νόσοι αποθησαυρισμού (storage diseases), σοβαρή απλαστική αναιμία καθώς και διάφορες ανοσοανεπάρκειες.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται ενδεικτικά διάφορες παθήσεις στις οποίες η προσπάθεια για θεραπεία με τη χρήση της μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων έχει θέση στην πράξη ή έχει απλώς δοκιμαστεί σε πειραματική βάση είτε τέλος υπάρχουν βάσιμες ελπίδες ότι στο μέλλον θα έχει θέση.

Νοσήματα που αντιμετωπίζονται με τη μεταμόσχευση ΟΠ.Α

Κακοήθη	<ul style="list-style-type: none"> • Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία • Οξεία μυελογενής λευχαιμία • Λέμφωμα Burkitt • Χρόνια μυελογενής λευχαιμία • Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα • Νευροβλάστωμα • Μη Hodgkin λέμφωμα • Νόσος Hodgkin • Ρετινοβλάστωμα
Αναιμίες-Θρομβοκυττοπενίες	<ul style="list-style-type: none"> • Απλαστική αναιμία • Αναιμία Blackfan-Diamond • Συγγενής δυσκεράτωση • Αναιμία Fanconi • Αμεγακαρυωτική θρομβοκυττοπενία • Σύνδρομο Kostmann • Δρεπανοκυτταρική αναιμία • β-θαλασσαιμία
Ανοσοανεπάρκειες	<ul style="list-style-type: none"> • Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος • Βαρεία συνδιασμένη ανοσοανεπάρκεια • Δυσπλασία του θύμου • Σύνδρομο Wiskott-Aldrich
Άλλες παθήσεις	<ul style="list-style-type: none"> • Σύνδρομο Evans • Οστεοπέτρωση

4.2. Είδη μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων

Υπάρχουν 3 κύριες κατηγορίες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων βασισμένη στην προέλευση των αιμοποιητικών κυττάρων του δότη: αυτόλογη, συγγενής (syngeneic) και

αλλογενής.

4.2.1. Αυτόλογη μεταμόσχευση

Η δυσκολία ανεύρεσης HLA-συμβατών δοτών οδήγησε στην εξέλιξη των τεχνικών με τέτοιο τρόπο ώστε ο μυελός του ίδιου του ασθενή να συλλέγεται ενώ αυτός βρίσκεται σε ύφεση κλινικά, διατηρήεται στη κρυοσυντήρηση και τελικά να επανεγχύεται στον ασθενή μετά από χορήγηση υψηλής δόσης χημειοθεραπείας ή/και ακτινοβολίας .

Τα αυτόλογα αιμοποιητικά κύτταρα γενικά παρέχουν την μεγαλύτερη δυνατή πιθανότητα για επιτυχημένη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων εξαιτίας της απόλυτης γενετικής ταυτότητας και της απουσίας ανοσολογικής αντίδρασης. Παρόλα αυτά ο κίνδυνος της ύπαρξης νεοπλασματικών κυττάρων στο μόσχευμα δεν είναι εντελώς ανύπαρκτος³⁰⁷.

Αυτή η μορφή μεταμόσχευσης είναι κατάλληλη για συνθήκες όπου η πηγή αυτολόγων αιμοποιητικών κυττάρων είναι ελεύθερη νόσου ως αποτέλεσμα κάθαρσης (purging) του μοσχεύματος, παρόλα αυτά όμως η αυτόλογη μεταμόσχευση δεν είναι ανάμεσα στις επιλογές μας σε γενετικά καθοριζόμενες νόσους όπως και σε μερικές μη κληρονομικές παθήσεις, γιατί οι γενετικές ανωμαλίες μπορεί να διατηρηθούν στα μεταμοσχευθέντα κύτταρα^{301,306}.

Αν και τα κύτταρα για αυτόλογη μετάγγιση συλλέγονται κατά τη διάρκεια της ύφεσης της νόσου, η δυνατότητα του εντοπισμού νεοπλασματικών κυττάρων περιορίζεται στο 1% περίπου. Ακόμη και με τις καλύτερες τεχνικές ένα «ελεύθερο» νεοπλάσματος τμήμα ιστών μπορεί να περιέχει έως και 10^5 νεοπλασματικά κύτταρα. Επειδή ο αριθμός των νεοπλασματικών κυττάρων που απαιτούνται για να προκαλέσουν υποτροπή είναι άγνωστος, η εκρίζωση των κυττάρων αυτών αποτελεί κρίσιμο σημείο στην όλη διαδικασία τόσο από την πλευρά του μοσχεύματος (purging) όσο και από την πλευρά του ξενιστή (χημειοθεραπεία και/ή ακτινοβολία)³⁰⁷.

4.2.2. Συγγενής (syngeneic) μεταμόσχευση

Όσον αφορά την συγγενή (syngeneic) μεταμόσχευση, αυτή αφορά την δωρεά στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων από έναν μονοωογενή δίδυμο.

Το όφελος από μια τέτοια μεταμόσχευση εντοπίζεται στο ότι δεν υπάρχει ανοσολογική αντίδραση δεδομένου ότι δεν υπάρχει γενετική διαφορά μεταξύ του δότη και του λήπτη. Ως γενικός κανόνας, η συγγενής μεταμόσχευση προτιμάται από την αυτόλογη γιατί αποφεύγεται ο πιθανός κίνδυνος της μεταφοράς νεοπλασματικών κυττάρων από τον δότη³⁰¹. Όπως και στην αυτόλογη μεταμόσχευση, η συγγενής δεν συνίσταται για τις περιπτώσεις γενετικών ασθενειών δεδομένου ότι ο δότης και ο λήπτης μπορεί να μοιράζονται την ίδια γενετική ασθένεια^{301,308}.

4.2.3. Αλλογενής μεταμόσχευση

Η αλλογενής μεταμόσχευση αναφέρεται στη χρήση μοσχεύματος προερχόμενο από δότη διαφορετικής γενετικής ταυτότητας από τον λήπτη.

Η πιο σημαντική αδυναμία της μεθόδου είναι η ύπαρξη διαφορών όσον αφορά την ιστοσυμβατότητα μεταξύ του δότη και του λήπτη. Τα κύτταρα του λήπτη μπορεί να αντιμετωπίσουν τα κύτταρα του μοσχεύματος ως «ξένα» με αποτέλεσμα την καταστροφή του μοσχεύματος εξαιτίας της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος του λήπτη, διαδικασία που ονομάζεται «απόρριψη» του μοσχεύματος. Εναλλακτικά, τα μεταμοσχευθέντα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να αντιμετωπίσουν τα κύτταρα του λήπτη ως «ξένα» με αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων του λήπτη από την ανοσολογική αντίδραση των κυττάρων του δότη³⁰¹. Η αντίδραση αυτή καθορίζεται ως GVHD (Graft versus host disease) και μπορεί να είναι, όπως και η απόρριψη του μοσχεύματος, αίτιο σημαντικής νοσηρότητας ή/και θνητότητας καθώς και η κυριώτερη αιτία αποτυχίας της αλλογενούς μεταμόσχευσης.

Η πιθανότητα της απόρριψης του μοσχεύματος μειώνεται σημαντικά μετά από τον έλεγχο για συμβατότητα ως προς το σύστημα MHC (Major histocompatibility complex). Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες MHC μορίων: Η Class I MHC, η οποία αποτελείται από τα μόρια HLA-A, HLA-B και HLA-C; και η Class II MHC που αποτελείται από τα HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ³⁰⁹.

Τα μόρια της Class I MHC αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα συνδυασμένη με β₂- μικρογλοβουλίνη που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, ενώ τα μόρια της Class II MHC αποτελούνται από ζεύγη πολυπεπτιδικών αλύσεων και κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά

γονίδια. Η ανοσολογική λειτουργία των μορίων αυτών εντοπίζεται στο ότι παρέχουν τα μέσα για την αναγνώριση ξένων προς τον οργανισμό αντιγόνων, πράγμα που αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της ανοσιακής αντίδρασης³⁰¹.

Με το δεδομένο ότι μόνο το 25-30% όλων των ασθενών που έχουν ανάγκη μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων είναι πιθανόν να έχουν έναν πλήρως συμβατό συγγενή δότη³⁰⁷, ο ρόλος των συλλογών μονάδων αιμοποιητικών κυττάρων από μη σχετιζόμενους δέκτες αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της αλλογενούς μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων.

4.3. Μεταμόσχευση ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Το 1989 η Gluckman και συν.⁴⁶ ανέφεραν την πρώτη επιτυχή ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος σε ασθενή με αναιμία Fanconi με τη αλλογενή μεταμόσχευση ομφαλοπλακουντιακού αίματος από συγγενή δότη ταυτόσημο κατά HLA. Ο ασθενής αυτός επέδειξε πλήρη και διατηρήσιμο χιμαιρισμό (chimerism)³¹⁰ και παραμένει εν ζωή έως σήμερα. Αυτή η επιτυχία λειτούργησε ως ο ακρογωνιαίος λίθος για την πρόοδο της μεταμόσχευσης του ΟΠ.Α. διότι παρείχε την απόδειξη ότι μια και μοναδική μονάδα ΟΠ.Α. περιέχει αρκετά HSCs αρκετά για την ασφαλή εμφύτευση (engraftment) του μοσχεύματος³¹¹.

4.3.1. Κλινική σημασία της μεταμόσχευσης ΟΠ.Α

Όπως αδρά περιγράφηκε προηγουμένως, το ΟΠ.Α.(Ομφαλοπλακουντιακό αίμα) παρέχει πλεονεκτήματα σε σχέση με το μυελό των οστών και το κινητοποιημένο περιφερικό αίμα, όσον αφορά τη μεταμόσχευση.

Επιπρόσθετα, η άωρη φύση των HSCs που προέρχονται από το ΟΠ.Α. πιθανώς να επιτρέπει την συλλογή μεγαλύτερου αριθμού προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων μετά από in vivo επεξεργασία με αναπτυξιακούς παράγοντες⁷¹.

Αυτή η δυνατότητα του ΟΠ.Α. μπορεί να ξεπερνά το ζήτημα του σχετικά χαμηλού αριθμού στελεχιαίων κυττάρων που βρίσκονται σε μία μονάδα ΟΠ.Α. Αυτή η ανωριμότητα των T κυττάρων στο ΟΠ.Α. πιθανώς να επεξηγεί το γεγονός της προσβολής των ληπτών-όταν αυτό

συμβαίνει- λιγότερο συχνά και με χαμηλότερη ένταση GVHD, συγκριτικά με εκείνους που έχουν υποστεί μεταμόσχευση μυελού των οστών³¹¹⁻³¹⁴.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται περιληπτικά οι κυριότερες διαφορές μεταξύ ΟΠ.Α. και μυελού των οστών:

Χαρακτηριστικό	Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα	Μυελός των οστών
Πόνος/Δυσφορία του δότη κατά την λήψη	Ανώδυνη διαδικασία	Επώδυνη διαδικασία, απαιτούνται πολλαπλές αναρροφήσεις μυελού με βελόνη και γενική αναισθησία
Κίνδυνος για τον Δότη	Ελάχιστος	Κίνδυνοι που σχετίζονται με το χειρουργείο και τη γενική αναισθησία
Ανοχή του λήπτη σε μερική ασυμβατότητα (HLA mismatching)	Μεγαλύτερη ανοχή	Μικρότερη ανοχή
Χρόνος που απαιτείται για την ανεύρεση συμβατού δότη	Μικρότερος (~1 μήνας)	Μεγαλύτερος (2-6 μήνες)
Κίνδυνος για GVHD (Νόσος μοσχεύματος κατά ξενιστή)	Χαμηλότερος	Υψηλότερος
Κίνδυνος λοίμωξης από το μόσχευμα	Χαμηλότερος*	Υψηλότερος
Κόστος μεταμόσχευσης	Χαμηλότερο	Υψηλότερο
Χρήση σε μεγαλύτερους (Ενήλικες) Ασθενείς	Δυσκολία στην ανεύρεση αρκετά μεγάλων CB μονάδων	Χωρίς σημαντική δυσκολία
Απαιτούμενος χρόνος για engraftment	Μεγαλύτερος (3-4 εβδομάδες)	Μικρότερος (2-3 εβδομάδες)
<i>* Αφορά τον κίνδυνο λοίμωξης και όχι μικροβιακής επιμόλυνσης του μοσχεύματος</i>		

4.3.2. Κλινικά αποτελέσματα της μεταμόσχευσης με ΟΠ.Α.

Σε μελέτη που αφορά την τελική έκβαση (outcome) της μη-συγγενούς (unrelated) μεταμόσχευσης ΟΠ.Α³¹⁴, το ~80% των ασθενών ξεπέρασαν το όριο των 500 ANC/μl (absolute neutrophil count) την 42 ημέρα και το 85% αυτών το όριο των 50000/μl αιμοπεταλίων την 180 ημέρα. Ο μέσος χρόνος που απαιτήθηκε για εμφύτευση (engraftment) του μοσχεύματος ήταν 28 ημέρες για τα ουδετερόφιλα και 90 ημέρες για τα αιμοπετάλια.

Ο Laughlin και συν.³¹⁵ αξιολόγησαν 68 ενήλικες με απειλητική για τη ζωή αιματολογική κακοήθεια που είχαν υποστεί μεταμόσχευση ΟΠ.Α. Η έκβαση των μεταμοσχεύσεων αξιολογήθηκε με βάση την αιματολογική ανασύσταση, την επίπτωση του οξέος και του χρόνιου GVHD, την υποτροπή καθώς και την ελεύθερη υποτροπής επιβίωση, με την εκτιμώμενη πιθανότητα της αναγέννησης των ANC (>500/μl για 3 συνεχόμενες ημέρες) ήταν 90% στον συνολικό πληθυσμό.

Ο απόλυτος αριθμός των TNCs (Total nucleated cells) στη μονάδα του ΟΠ.Α. πριν την κατάψυξη και ο αριθμός των CD34⁺ κυττάρων μετά την απόψυξη, συσχετίστηκαν με μικρότερο απαιτούμενο χρόνο αναγέννησης για τα ANCs καθώς και βελτιωμένο ποιοτικά διάστημα επιβίωσης ελεύθερο επεισοδίων^{264,305,315,316}. Παρ'όλα αυτά σοβαρό οξύ GVHD (κατηγ. 3 ή 4) αναφέρθηκε σε 11 από τους 55 ασθενείς που αξιολογήθηκαν εντός των 100 πρώτων ημερών που ακολούθησαν την μεταμόσχευση ενώ χρόνιο GVHD εμφανίστηκε σε 11 από τους 55 ασθενείς που επιβίωσαν για παραπάνω από 100 ημέρες μετά την μεταμόσχευση, με τον μέσο χρόνο παρακολούθησης των ασθενών (follow-up) μετά τη μεταμόσχευση να φθάνει έως 22 μήνες. Η παρουσία υψηλού αριθμού CD34⁺ κυττάρων στο μόσχευμα συσχετίστηκε με βελτιωμένη επιβίωση έως και 40 μήνες μετά την μεταμόσχευση³¹⁵.

Η θετική συσχέτιση μεταξύ του απόλυτου αριθμού των CD34⁺ του δότη και της ταχύτητας εμφύτευσης του μοσχεύματος καθώς και της επιβίωσης παραμένει και στα ευρήματα της μελέτης του Wagner και συν.³¹⁴. Μετά την ανάλυση στοιχείων από 102 ασθενείς (μέσης ηλικίας 7.4 ετών) που έλαβαν ΟΠ.Α. τόσο για νεοπλασματικής φύσεως (n=65) όσο και για μη νεοπλασματικής φύσεως (n=37) νοσήματα, διαπιστώθηκε επίπτωση κοκκιοκυτταρικής και

αιμοπεταλιακής ανασύστασης σε ποσοστά 0.88 και 0.65, αντίστοιχα.

Σοβαρό οξύ GHVD εμφανίστηκε σε 11% των ασθενών και χρόνιο GHVD σε 10% αυτών. Η πιθανότητα επιβίωσης βελτιώθηκε όταν υπήρχε διαφοροποίηση HLA σε όχι περισσότερες από 2 θέσεις και όταν το μόσχευμα περιείχε τουλάχιστον 1.7×10^5 CD34⁺/κύττ./kg του βάρους του λήπτη³¹³. Τα αποτελέσματα της μεταμόσχευσης βελτιώνονται δραματικά όταν η μονάδα ΟΠ.Α που δίνεται για μεταμόσχευση είναι συγγενούς δότη και οι ερευνητές αναφέρουν εντυπωσιακά στοιχεία επιβίωσης (72% σε 1.6 έτη από τη μεταμόσχευση και χαμηλή επίπτωση GVHD (3-6%)³¹⁶.

Σε μια αναδρομική μελέτη στοιχείων από το EBMT (European Blood and Marrow Transplantation Group) και το EUROCORD³⁰⁵, αναφέρθηκε ότι σε 78 ασθενείς που έλαβαν ΟΠ.Α από συγγενείς δότες είχαν επιβίωση 63% τον πρώτο χρόνο μετά τη μεταμόσχευση, σε αντίθεση με τους ασθενείς που υπέστησαν αλλογενή μεταμόσχευση όπου η επιβίωση μετά ένα έτος ήταν 29% (p<0.001).

Αν και η παρουσία γενετικών ασθενειών και ορισμένων παιδικών λευχαιμιών είναι αντενδείξεις για την χρήση αυτόλογης μεταμόσχευσης ΟΠ.Α, οι εργασίες αυτές μας δείχνουν την σπουδαιότητα της χρήσης της αυτόλογης μεταμόσχευσης καθώς και της χρήσης μοσχευμάτων από συγγενείς δότες για τη θεραπεία ευρέος φάσματος νοσημάτων και καταστάσεων.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα αναμενόμενα αποτελέσματα από την μεταμόσχευση HSCs κάθε προέλευσης άρα και ΟΠ.Α, επιβαρύνονται από την πιθανότητα των θανατηφόρων επίπλοκών όπως λοιμώξεις και το GVHD. Τέτοιες επιπλοκές εμφανίζονται σχετικά συχνά και σχετίζονται με τη διάγνωση, την θεραπεία πριν τη μεταμόσχευση, το είδος του μοσχεύματος, την ηλικία του λήπτη, κ.ά. Η σχετικά αυστηρή HLA συμβατότητα που απαιτείται, ιδιαίτερα στην περίπτωση του μυελού των οστών, για τη επιτυχή μεταμόσχευση, είναι ο κυριότερος ανασταλτικός παράγοντας για μια επιτυχή μεταμόσχευση^{301,302}.

Το GVHD προκαλείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του δότη και του λήπτη όπου συμβαίνει η ενεργοποίηση και η κλωνική έκπτυξη των T λεμφοκυττάρων του δότη, γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί σε απελευθέρωση κυτταροκινών, δευτερογενή ενεργοποίηση άλλων

κυττάρων και τελικά στην προσβολή και καταστροφή κυττάρων και ιστών του λήπτη ³⁰². Το GVHD μπορεί να προκύψει ακόμη και όταν γίνεται μεταμόσχευση από συγγενή δότη απόλυτα συμβατό, εξαιτίας μικροδιαφορών σε μη-HLA μόρια μεταξύ του δότη και του λήπτη καθώς και μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση πιθανώς εξαιτίας μη αναμενόμενων αντιδράσεων έναντι «ίδιων» αντιγόνων ^{45,302,317}.

Το GVHD μπορεί να έχει δύο μορφές: την οξεία και τη χρόνια μορφή, με διαφορές που αφορούν την παθολογία τους καθώς και την κλινική τους εικόνα ³⁰³.

Το οξύ GVHD συνήθως εμφανίζεται εντός των πρώτων 30 ημερών από τη μεταμόσχευση, αλλά είναι αναμενόμενο έως και 3 μήνες μετά ³⁰² και χαρακτηρίζεται από ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση και την απόρριψη ιστών του λήπτη από τα κύτταρα του δότη. Τα κύρια όργανα-στόχοι είναι το ανοσοποιητικό σύστημα, το δέρμα, το ήπαρ και το πεπτικό σύστημα, αν και επιπλέον όργανα μπορούν να προσβληθούν ^{302,303}.

Το χρόνια GVHD ομοιάζει με αυτοάνοσο νόσημα και γενικά χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή και ινοβλαστική αντίδραση. Στοιχεία αυτοανοσοποίησης καθώς και παθολογικό προφίλ κυτταροκινών μπορεί να είναι επίσης παρόντα ^{318,319}. Το χρόνια GVHD εμφανίζεται συνήθως μετά την παρέλευση 3 μηνών από τη μεταμόσχευση και επηρεάζει τα ίδια όργανα με το οξύ GVHD αλλά και το μυοσκελετικό σύστημα, τους οφθαλμούς, το βλεννογόνο του στόματος και το αιμοποιητικό σύστημα ³⁰³.

Η κατηγοριοποίηση του οξέος GVHD γίνεται με βάση την αυξανόμενη βαρύτητα από I έως IV, βασισμένη στον αριθμό και την βαρύτητα των οργάνων και των συστημάτων που προσβάλλονται ³²⁰. Το χρόνια GVHD γενικά χαρακτηρίζεται ως περιορισμένο ή εκτεταμένο. Γενικά, το GVHD θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την επιβίωση στην μεταμόσχευση HSCs και συνήθως αντιμετωπίζεται επιθετικά ³⁰².

Επιπλέον επιπλοκές της μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων μπορούν να προκύψουν ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας του μοσχεύματος πριν τη μεταμόσχευση, που μπορεί να οδηγήσει σε οξεία ή χρόνια τοξικότητα καθώς και από δυσλειτουργία του αιμοποιητικού συστήματος, όπως απόρριψη του μοσχεύματος και λοιμώξεις ³⁰¹. Τέλος, οι λήπτες μοσχευμάτων HSCs πτωχών σε T-

λεμφοκύτταρα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα η νεοπλασματική νόσος τους να επανακάμψει κυρίως λόγω της απώλειας των αντινεοπλασματικών T λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας με την οποία γίνεται αφαίρεση των T λεμφοκυττάρων από το μόσχευμα^{321,322}.

Ελπίζεται ότι με τη χρήση ανασυνδυασμένων παραγόντων ανάπτυξης που θα χορηγούνται προφυλακτικά ή θεραπευτικά είναι πιθανόν να μειώνεται η συχνότητα της απόρριψης του μοσχεύματος και τελικά αποτυχίας της μεταμόσχευσης³⁰².

5. Τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος

5.1. Εισαγωγή

Όταν απαιτείται η χρήση HSC αλλογενούς μοσχεύματος, αρχικά εκτιμάται η οικογένεια του ασθενούς διότι παρέχουν την καλύτερη δυνατότητα για HLA συμβατότητα.

Όταν δεν μπορεί να βρεθεί συγγενικός συμβατός δότης τότε η έρευνα για συμβατό δότη επεκτείνεται για να περιλάβει συγγενικούς μερικώς συμβατούς δότες, μη συγγενικούς συμβατούς δότες ακόμη και μη συγγενικούς μερικώς συμβατούς δότες³²³. Περισσότεροι από το 70% των ασθενών που αναζητούν αλλογενές HSC συμβατό μόσχευμα δεν διαθέτουν αποδεκτό HLA-συμβατό συγγενικό δότη και θα πρέπει να αναζητήσουν συμβατό μη-συγγενικό δότη. Από αυτούς τους ασθενείς μόνο το 30% τελικά βρίσκουν ένα αποδεκτό μερικά συμβατό δότη για τη μεταμόσχευση³²⁴.

Με την διαπίστωση ότι το ΟΠ.Α. μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική πηγή HSCs^{45,46,325}, οι τράπεζες ΟΠ.Α. δημιουργήθηκαν για να καλύψουν την ζήτηση σε συμβατούς δότες. Σε αυτές μονάδες ΟΠ.Α. παραμένουν σε συνθήκες κρυοσυντήρησης με σκοπό τη μεταμόσχευσή τους σε μη συγγενικούς συμβατούς λήπτες³²³.

Η πρώτη προσπάθεια προς την δημιουργία της τράπεζας ΟΠ.Α. έγινε από τον Dr H.Broxmeyer στο Indiana University School of Medicine, όπου 10 συλλογές ΟΠ.Α. αποθηκεύθηκαν για μεταγενέστερη χρήση³²⁶. Η αρχική επιτυχία της διαδικασίας, οδήγησε στη

δημιουργία των πρώτων τραπεζών ΟΠ.Α. Η πρώτη από αυτές ιδρύθηκε στη Ν.Υόρκη (New York Blood Center), Μιλάνο και στο Ντύσσελτορφ (Bone Marrow Donor Center) ²¹⁸. Η τράπεζα της Ν.Υόρκης εξακολουθεί να είναι η μεγαλύτερη, παρέχοντας τουλάχιστον τις μισές από τις μονάδες ΟΠ.Α. που απαιτούνται ετησίως για τις μεταμοσχεύσεις. Το NETCORD είναι ένα οργανισμός που περιλαμβάνει μια ομάδα δημοσίων τραπεζών ΟΠ.Α. στις Η.Π.Α. και δημιουργήθηκε το 1998 με σκοπό να προωθήσει την έρευνα για την ανεύρεση καταλλήλων μονάδων ΟΠ.Α. καθώς και να εξασφαλίσει υψηλά ποιοτικά κριτήρια σχετικά με την συντήρηση των μονάδων ΟΠ.Α.

Το μοντέλο αυτό των δημοσίων τραπεζών ΟΠ.Α. έδειξε το δρόμο για τη δημιουργία ιδιωτικών τραπεζών ΟΠ.Α., όπου το ομφαλοπλακουντιακό αίμα διατηρείται με σκοπό την χρήση του από τον δότη. Όπως περιγράφηκε πιο πάνω, υπάρχουν δύο μοντέλα τραπεζών ΟΠ.Α: Το «οικογενειακό» ή «ιδιωτικό» και το «δημόσιο». Στις ιδιωτικές τράπεζες ο δότης διατηρεί το δικαίωμά του να χρησιμοποιήσει τη μονάδα ΟΠ.Α για τις δικές του πιθανές μελλοντικές ανάγκες, ενώ στις δημόσιες τράπεζες η μονάδα ΟΠ.Α. μπορεί να δοθεί για χρήση σε οποιονδήποτε μη συγγενή λήπτη που είναι όμως συμβατός κατά HLA.

5.2. Διαφορές μεταξύ ιδιωτικών και δημοσίων τραπεζών ΟΠ.Α.

Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ δημοσίων και ιδιωτικών τραπεζών ΟΠ.Α. Μία από τις σημαντικότερες διαφορές είναι το ότι η ιδιοκτησία της μονάδας ΟΠ.Α. που αποθηκεύεται παραμένει στο δότη-νεογνό, κάτω από την επίβλεψη των γονέων του έως την ενηλικίωσή του. Μόνο ο κηδεμόνας του ή το ίδιο το άτομο μπορεί να τη χρησιμοποιήσει και επίσης η μονάδα δεν μπορεί να απορριφθεί παρά με την σύμφωνη γνώμη του δότη.

Αντίθετα, η μονάδα ΟΠ.Α. στις δημόσιες τράπεζες συχνά μπορεί να απορριφθεί με βάση αυστηρά κριτήρια που αφορούν τον ποιοτικό έλεγχο των μονάδων (π.χ. την ανάπτυξη μικροβίων ή όχι, τον μικρό όγκο, τον μικρό αριθμό κυττάρων). Μερικές από αυτές τις μονάδες ΟΠ.Α. που απορρίπτονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ερευνητικούς σκοπούς.

Αν και αυστηρά κριτήρια θα πρέπει κανονικά να εφαρμόζονται και στις ιδιωτικές

τράπεζες, στην πράξη αυτό δεν ισχύει ως γενικός κανόνας. Συνήθως η τράπεζα επικοινωνεί με την οικογένεια του δότη και τον ενημερώνει για πιθανά προβλήματα που αφορούν την ποιότητα της μονάδας και στη συνέχεια να δρομολογήσει την απόρριψη της μονάδας αν αυτό είναι σύμφωνο με την πολιτική και τις διαδικασίες της τράπεζας.

Τέλος, υπάρχουν αρκετές τράπεζες (π.χ. Cryobanks Intl., Florida, San Diego Blood Bank Cord Blood Program, κ.ά.) που προσφέρουν μια διαφορετική προσέγγιση: συνθήκες ιδιωτικής φύλαξης για όποιον δότη το επιθυμεί και έχει αυτήν την ανάγκη, μαζί με εγκαταστάσεις για φύλαξη μονάδων με το καθεστώς της δημόσιας τράπεζας. Αυτό το μοντέλο συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της ιδιωτικής τράπεζας γι' αυτούς που επιλέγουν να χρησιμοποιήσουν αυτή την υπηρεσία ενώ ταυτόχρονα προσφέρεται και η δυνατότητα της προσφοράς μονάδων ΟΠ.Α. για διάθεση στο ευρύ κοινό.

6. Γενικές επισημάνσεις σχετικά με τη χρήση του ΟΠ.Α

Η μεταμόσχευση του ΟΠ.Α. είναι ένα σχετικά νέο πεδίο έρευνας και παρ'όλες τις προόδους της τελευταίας 10ετίας παρουσιάζει πολλές ευκαιρίες για ερευνητική εργασία και βελτίωση σε τομείς όπως η λήψη, η επεξεργασία, η συντήρηση και η κλινική χρήση των στελεχιαίων κυττάρων του ΟΠ.Α.

6.1. Συστήματα λήψης του ΟΠ.Α

Ένας από τους παράγοντες για τον οποίο η χρήση του ΟΠ.Α. είναι περιορισμένη σε ενηλίκους είναι και ο σχετικά μικρός αριθμός των στελεχιαίων και προγονικών κυττάρων που μπορούν να συλλεχθούν σε μια μονάδα ΟΠ.Α.

Αυτό έχει σαν συνέπεια η προσπάθεια για βελτίωση της συλλογής του ΟΠ.Α., με στόχο την αύξηση του αριθμού των στελεχιαίων κυττάρων που συλλέγονται, να αποτελεί αντικείμενο έρευνας πολλών ερευνητικών κέντρων με αρκετές μελέτες στις οποίες γίνεται σύγκριση της *in utero* με την *ex utero* διαδικασία αιμοληψίας, όπως και αξιολογήσεις διαφόρων εναλλακτικών

μεθόδων λήψης^{327,328}, χωρίς να υπάρχει consensus σχετικά με την περισσότερο αποδοτική μέθοδο.

Η επιμόλυνση (μικροβιακή ή από μύκητες) είναι μια σαφώς αναγνωριζόμενη επιπλοκή της λήψης ΟΠ.Α. και παρόλη την προφυλακτική αντιβιοτική αγωγή που λαμβάνουν συνήθως οι λήπτες, οι λοιμογόνιοι παράγοντες που επιμολύνουν μια μονάδα ΟΠ.Α. αποτελούν έναν πιθανό κίνδυνο για την ήδη επιβαρυσμένη κατάσταση της υγείας ενός ασθενούς που είναι συνήθως ανοσοανεπαρκής. Η επιμόλυνση μπορεί να γίνει τόσο κατά τη διάρκεια της λήψης ή κατά την πορεία της επεξεργασίας αλλά σε κάθε περίπτωση για να αποφευχθεί θα πρέπει να ακολουθούνται αυστηρές διαδικασίες συλλογής, προτυπωμένες αν είναι δυνατόν, το δε προσωπικό της τράπεζας θα πρέπει να εκπαιδεύεται ειδικά για το σκοπό αυτό.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στις ιδιωτικές τράπεζες θα πρέπει επίσης η συλλογή να ακολουθεί τους ίδιους κανόνες όπως και στις δημόσιες τράπεζες ακολουθώντας πάντα διαδικασίες που μεγιστοποιούν τον αριθμό των στελεχειαίων κυττάρων που λαμβάνονται, χωρίς ταυτόχρονα να τίθεται σε κίνδυνο η υγεία του νεογνού.

6.2. Συστήματα μεταφοράς

Η μεταφορά των μονάδων ΟΠ.Α. που έχουν συλλεχθεί είναι κρίσιμης σημασίας βήμα για την αποτελεσματική αποθήκευση της μονάδας. Η συλλογή μπορεί να γίνει σε διαφορετικές τοποθεσίες, σχεδόν κάθε ώρα της ημέρας και συχνά μακριά από την τράπεζα ΟΠ.Α. και άρα είναι σημαντικό τα συλλεγέντα κύτταρα να φθάσουν στο εργαστήριο στην καλύτερη δυνατή κατάσταση και χωρίς σημαντικές απώλειες.

Οι βελτιώσεις στον τομέα των μεταφορικών συστημάτων μπορεί να πάρει διάφορες κατευθύνσεις. Οι τράπεζες ΟΠ.Α. πιθανώς θα μπορούσαν να αποκεντρωθούν και να καθιερώσουν πολλαπλά κέντρα επεξεργασίας με σκοπό να είναι κοντύτερα στο χώρο λήψης. Τα δοχεία μεταφοράς των μονάδων ΟΠ.Α. θα πρέπει πιθανά να σχεδιαστούν με τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιούν την διατήρηση των στελεχειαίων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Αυτό μπορεί, μεταξύ άλλων, να γίνει με την εμφύτευση συσκευών

ελέγχου και διατήρησης της επιθυμητής θερμοκρασίας που να ανταποκρίνονται ακόμη και σε ακραίες μεταβολές της θερμοκρασίας καθώς και με την κατασκευή τους με βάσει ειδικών προδιαγραφών. Επίσης μεγάλη βοήθεια θα προσέφερε και η χρήση εκτός του αντιπηκτικού και ειδικών συντηρητικών ουσιών για την επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης των στελεχιαίων κυττάρων.

Τέλος, σκόπιμη θα ήταν η πρόσληψη και χρησιμοποίηση εκπαιδευμένων μεταφορέων (couriers) των μονάδων ΟΠ.Α.

6.3. Επεξεργασία και κατάψυξη

Τα διάφορα στάδια επεξεργασίας της μονάδας ΟΠ.Α. αναπόφευκτα οδηγούν σε μείωση του αριθμού των στελεχιαίων κυττάρων. Η μεταφορά του ΟΠ.Α, για παράδειγμα, από το ασκό συλλογής σε κάποιο άλλο ασκό επεξεργασίας αναγκαστικά οδηγεί σε απώλειες κυττάρων. Αν και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε κλειστό σύστημα ασκών και γίνεται σε άσηπτες συνθήκες εντούτοις δεν εξασφαλίζει ότι δεν θα υπάρχουν απώλειες στα στελεχιαία κύτταρα.

Οποιοσδήποτε βελτιώσεις που θα οδηγούσαν στην μείωση των βημάτων της φυγοκέντρωσης και μεταφοράς από ασκό σε ασκό, πιθανότατα θα οδηγούσαν και σε αντίστοιχες αυξήσεις στον αριθμό των στελεχιαίων κυττάρων που συλλέγονται. Για παράδειγμα, ένα σύστημα στο οποίο τα αρχικά στάδια της επεξεργασίας πραγματοποιούνται στον ίδιο ασκό συλλογής του ΟΠ.Α., αυτό θα οδηγούσε προφανώς σε αύξηση του αριθμού των στελεχιαίων κυττάρων που συλλέγονται.

Η κρυσυντήρηση είναι ένα επίσης κρίσιμο σημείο στην διαδικασία της επεξεργασίας των μονάδων ΟΠ.Α. Αν και τα στελεχιαία κύτταρα από μια μονάδα ΟΠ.Α μπορεί να είναι λειτουργικά για μικρές σχετικά χρονικές περιόδους, οι ιδιωτικές τράπεζες είναι πολύ πιθανό να διατηρούν μονάδες ΟΠ.Α. στην κρυσυντήρηση για μεγάλα χρονικά διαστήματα (μεγαλύτερα της 20ετίας) και συνεπώς κάθε προσπάθεια πρέπει να καταβληθεί ώστε τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του ΟΠ.Α. να παραμείνουν σταθερά.

Η διαδικασία της διαίρεσης της μονάδας σε περισσότερα του ενός μέρη έχει δοκιμαστεί και χρησιμοποιείται από ορισμένες τράπεζες με το σκεπτικό ότι με αυτόν τον τρόπο η μονάδα

μπορεί να χρησιμοποιηθεί περισσότερες φορές. Αν και ο αριθμός των στελεχειαίων και προγονικών κυττάρων που βρίσκονται σε μια μονάδα είναι σχετικά περιορισμένος δεν αποκλείεται στο εγγύς μέλλον η πρόοδος στις τεχνικές της έκπτυξης (expansion) να επιτρέψει την παραγωγή μεγάλου αριθμού κυττάρων με ένα μόνο μικρό κλάσμα στελεχειαίων κυττάρων της μονάδας.

Σημαντική επίσης απώλεια κυττάρων μπορεί να προκύψει όταν η διαδικασία της κατάψυξης δεν γίνεται κανονικά ³²⁹. Αν και υπάρχουν εργασίες που διατυπώνουν την άποψη ότι η κλασματική κατάψυξη ελεγχόμενη από ειδική συσκευή δεν είναι απολύτως απαραίτητη για την κατάψυξη των μονάδων ΟΠ.Α. ³³⁰, παρόλα αυτά είναι σκόπιμο κάθε τράπεζα ΟΠ.Α. να διαθέσει πόρους για την προμήθεια και λειτουργία συσκευών κλασματικής κατάψυξης (control rate freezers) με σκοπό την ελαχιστοποίηση της καταστροφής των κυττάρων εξαιτίας του ψύχους.

6.4. Εξελίξεις στην μεταμόσχευση ΟΠ.Α.

6.4.1. Μεταμόσχευση πολλαπλών μονάδων ΟΠ.Α.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μια βασική ιδιότητα των μεταμοσχεύσεων ΟΠ.Α. είναι η σχετικά καθυστερημένη εμφύτευση (engraftment) του μοσχεύματος καθώς και η δυσκολία στη χρήση του σε ενήλικες ασθενείς.

Η δυσκολία αυτή οφείλεται μεταξύ άλλων και στο σχετικά χαμηλό αριθμό στελεχειαίων και προγονικών κυττάρων που περιέχονται στη μονάδα ΟΠ.Α. δεδομένου ότι τόσο ο απόλυτος αριθμός TNCs (total nucleated cells) όσο και ο αριθμός των CD34⁺ του μοσχεύματος σχετίζονται με την κινητική εμφύτευσης (engraftment kinetics) ^{264,312,315}.

Αρκετοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με το θέμα έχοντας τη λογική ότι τα πρόσθετα στελεχειαία κύτταρα που προέρχονται από τις πολλαπλές μονάδες ΟΠ.Α., θα οδηγήσουν σε ταχύτερη εμφύτευση και τελικά μικρότερη βραχύχρονη νοσηρότητα και θνητότητα ^{331,332}.

Σε αυτές τις περιπτώσεις η μοριακή ανάλυση αποκαλύπτει ότι αρχικά ο μυελός του λήπτη φιλοξενεί στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα και από τους δύο λήπτες. Παρόλα αυτά, στις

περισσότερες περιπτώσεις, γονοτυπική ανάλυση έδειξε ότι τελικά παραμένει και υπερισχύει ένας μόνο γονότυπος δότη στον λήπτη, υποδεικνύοντας ότι ο μικτός μερικός χμαιορισμός (mixed partial chimerism) του αρχικού σταδίου δεν είναι σταθερός³³² και ότι απαιτούνται και άλλες μελέτες για να θεωρηθεί η προσέγγιση αυτή επιτυχής.

6.4.2. Μη μυελοκατασταλτική (non-myeloablative) προετοιμασία

Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην υπόθεση ότι η θεραπευτική δράση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων βασίζεται στην ανοσορυθμιστική δράση των μεταμοσχευθέντων ανοσοκυττάρων και δεν εξαρτάται από την προηγούμενη μυελοκατασταλτική προετοιμασία.

Με αυτό τον τρόπο οι ασθενείς λαμβάνουν λιγότερο έντονη χημειοθεραπεία ή/και ακτινοβολία ως προετοιμασία ώστε ο μυελός τους να μπορεί να δεχθεί το μόσχευμα χωρίς να γίνεται προσπάθεια ώστε να εκριζωθούν τα νεοπλασματικά κύτταρα.

Στη συνέχεια τα ενσωματωμένα (engrafted) ανοσοκύτταρα αναπτύσσουν μία graft vs host αντίδραση και επιτίθενται στα νεοπλασματικά κύτταρα του λήπτη. Η πιο πάνω προσέγγιση αν και αρχικά ήταν περιορισμένη στις νεοπλασματικές παθήσεις³³³⁻³⁸ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με μη νεοπλασματικές παθήσεις για παράδειγμα με θαλασσαιμία^{339,340}. Άλλοι ερευνητές ανέφεραν αρχική επιτυχία στη χρήση της μεθόδου στη θεραπεία της χρόνιας κοκκιοματώδους νόσου³⁰⁴.

Όσον αφορά τη χρήση του ΟΠ.Α. υπάρχουν σχετικά λίγες αναφορές, σε αντίθεση με το μυελό των οστών ή το κινητοποιημένο περιφερικό αίμα^{332,341}.

Ο προβληματισμός βρίσκεται στο αν ο αριθμός των ανοσοτροποποιητικών κυττάρων που βρίσκεται στο ΟΠ.Α. είναι επαρκής έστω για τη δημιουργία μερικού χμαιορισμού, ερώτημα του οποίου η τελική απάντηση θα απαιτήσει περισσότερη έρευνα.

6.4.3. Έκπτυξη των στελεχειαίων κυττάρων και μηχανική του μοσχεύματος

Αρκετές ομάδες εργασίας διαχειρίζονται προγράμματα έρευνας έκπτυξης (expansion) των στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων από ΟΠ.Α με στόχο τη βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων των μεταμοσχεύσεων.

Σε μελέτη από τον Kogler και συν. αναφέρθηκε επιτυχής μεταμόσχευση σε ασθενή που μεταμοσχεύθηκε με στελεχειαία κύτταρα από ΟΠ.Α. τα οποία προήρχοντο από έκπτυξη CD34⁺ κυττάρων, ύστερα από επιλογή τους και στη συνέχεια καλλιέργειά τους παρουσία Flt3 ligand, θρομβοποιητίνης και G-CSF³⁴².

Ο Pecoira και συν. ανέφεραν ότι 2 ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία που έλαβαν μεταξύ άλλων και στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα προερχόμενα από έκπτυξη, είχαν επιτυχή ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος, παρέμειναν σε ύφεση και δεν εκδήλωσαν GVHD³⁴³. Επίσης, άλλοι ερευνητές περιέγραψαν δύο ασθενείς που έλαβαν στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα από έκπτυξη (expansion) μαζί με ανεπεξέργαστα στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα. Αν και στους δύο ασθενείς έγινε τελικά ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος, το DNA των κυττάρων του εκπυγμένου αίματος δεν εμφανίστηκε παρά μόνο παροδικά 11 ημέρες μετά την μεταμόσχευση³⁴⁴.

Ο Mackin και συν., τέλος, περιέγραψαν ένα σύστημα έκπτυξης για το ΟΠ.Α. που ονομάστηκε “ Selective Amplification” (Via Cell Inc., Boston, MA). Το σύστημα βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αρνητικής επιλογής για να απομακρυνθούν τα ώριμα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και τελικά οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων- αναφέρθηκε έκπτυξη από 43 έως και 160 φορές παραπάνω των CD34⁺CD38⁻ πληθυσμών κυττάρων³⁴⁵.

Επιπρόσθετα με την έκπτυξη (expansion), στο μέλλον, οι μονάδες του ΟΠ.Α. μπορούν να επεξεργαστούν με σκοπό τη βελτίωση του μοσχεύματος για τη θεραπεία συγκεκριμένων ασθενειών. Για παράδειγμα, ο πληθυσμός των στελεχειαίων κυττάρων μπορεί να τροποποιηθεί με επεξεργασία ex vivo ώστε να έχει ανοσολογική δράση με την απομάκρυνση ή τον εμπλουτισμό όσον αφορά διάφορους υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων, την απομάκρυνση καρκινικών

κυττάρων, ρύθμιση της δράσης των NK, κ.ά.

6.4.4. Πλαστικότητα (plasticity) των στελεχιαίων κυττάρων

Τα εμβρυονικά κύτταρα είναι πολυδύναμα, με ικανότητα να διαφοροποιούνται σε κάθε κύτταρο και ιστό του οργανισμού. Τα στελεχιαία κύτταρα των ενηλίκων (στα οποία περιλαμβάνονται και τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα του ΟΠ.Α.) γενικά θεωρείται ότι είναι περισσότερο δεσμευμένα όσον αφορά το δυναμικό διαφοροποίησης, υπάρχουν όμως νεότερα δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η κατάσταση αυτή είναι αναστρέψιμη και επίσης ότι κάτω από ειδικές συνθήκες, τα κύτταρα αυτά, είναι ικανά να αλλάξουν τον γονιδιακό προγραμματισμό τους και να διαχωριστούν σε κύτταρα άλλων σειρών. Αυτό το χαρακτηριστικό των στελεχιαίων κυττάρων ονομάζεται πλαστικότητα (plasticity).

Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την ικανότητα των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά ³⁴⁶, καρδιακά ^{347,348}, ηπατικά ^{24,25}, μυϊκά ^{349,350}, νευρικά ^{31,351,352}, μεσεγχυματικά ^{353,354} και άλλων ιστών.

Αν τελικά η πλαστικότητα (plasticity) αποδειχθεί μια γενική συνθήκη, τότε τα στελεχιαία κύτταρα του ΟΠ.Α. έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε μια μεγάλη κατηγορία γενετικών και εκφυλιστικών παθήσεων που δεν σχετίζονται απαραίτητα με το αιμοποιητικό σύστημα, μεταξύ άλλων νευρολογικών, καρδιολογικών, ηπατικών, νόσων του συνδετικού ιστού. Πράγματι, τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των εμβρυονικών στελεχιαίων κυττάρων όπως η μακρόχρονη εμπειρία που υπάρχει όσον αφορά στην κλινική χρήση, η μικρή πιθανότητα ανάπτυξης όγκων, η πιθανή χρήση σε αυτόλογες θεραπείες καθώς και οι μικρότεροι ηθικοί ενδοιασμοί. Αρκετή πρόοδος πρέπει να γίνει όσον αφορά την έρευνα σε αυτόν τον τομέα που αν αποδειχθεί ελπιδοφόρα να οδηγήσει σε καλύτερες μεθόδους παρασκευής και κλινικής χρήσης ενώ θα αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό τόσο η σπουδαιότητα των ιδιωτικών-οικογενειακών τραπεζών όσο και η συχνότητα της χρήσης των μονάδων που συντηρούνται σε αυτές.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Το ΟΠ.Α έχει γίνει αποδεκτό ως βιώσιμη εναλλακτική λύση, σε σχέση με το μυελό των οστών για τη θεραπεία διαφόρων αιματολογικών νόσων που απαιτούν τη μεταμόσχευση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων^{45,46,236,272,305,314,325,355-57}. Στα έτη μετά την πρώτη μεταμόσχευση ΟΠ.Α., οι τράπεζες ΟΠ.Α. εξελίχθηκαν και τελικά κατέληξαν να αποτελούν έναν σημαντικό κρίκο στην αλυσίδα της μεταμόσχευσης ΟΠ.Α.³⁵⁸. Με περισσότερες από 400.000 μονάδες ΟΠ.Α. να βρίσκονται σε κρυσυντήρηση για αρκετά μεγάλες χρονικές περιόδους σε περισσότερες από 100 τράπεζες και με τουλάχιστον 21 χώρες να συμμετέχουν^{358,359} η ποιότητα της μονάδας ΟΠ.Α αποκτά κρίσιμη σημασία υπό την έννοια κυρίως της διαθέσης βιώσιμων στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων. Αν και, σύμφωνα με κάποιες μελέτες, HSPCs έχουν ανακτηθεί επιτυχώς μετά και από 2 δεκαετίες κρυσυντήρησης^{360,361} αρκετές άλλες έρευνες έχουν δείξει μια σταδιακή πτώση της ποιότητας των HSPCs καθώς και των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους με την αύξηση του χρόνου κρυσυντήρησης^{245,246,362}.

Η μέθοδος κρυσυντήρησης που είναι σε ευρύτερη εφαρμογή για την συντήρηση των HSPCs-αυτή με υγρό άζωτο-φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική αλλά έχει και σημαντικά μειονεκτήματα: απαιτεί εξαιρετικά εκπαιδευμένο προσωπικό καθώς και μηχανήματα υψηλού κόστους απόκτησης και συντήρησης. Τα παραπάνω προβλήματα, καθώς και η δυσκολία εύρεσης και εναποθήκευσης υγρού αζώτου που απαιτείται για τα συμβατικά πρωτόκολλα κατάψυξης, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες, έχουν δημιουργήσει ενδιαφέρον για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων κατάψυξης που να χρησιμοποιούν ηλεκτρομηχανικούς κρυσυντηρητές^{225,363-67}.

Τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα του ΟΠ.Α. χαρακτηρίζονται, μεταξύ άλλων, από υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα^{43,45,93,268}. Η ιδιότητα αυτή του ΟΠ.Α. είναι κυρίως εκείνη που οδηγεί τις μεταμοσχεύσεις όπου χρησιμοποιείται ΟΠ.Α. σε επιτυχία με την έννοια της γρήγορης αναγέννησης του αιμοποιητικού συστήματος σε μεταμοσχευμένους ασθενείς. Αυτή η

ικανότητα μπορεί να ελεγχθεί εργαστηριακά με τη βοήθεια διαφόρων μετρήσιμων παραμέτρων, προσδιορίζει, κατ'ουσίαν, την ποιότητα της μονάδας ΟΠ.Α. πριν την κατάψυξη αλλά κυρίως μετά την απόψυξη της και εν ολίγοις καθορίζει σε σημαντικό βαθμό και την επιτυχία της μεταμόσχευσης στην περίπτωση της χρήσης της δεδομένης μονάδας ΟΠ.Α.

2. Σκοπός

Ο σκοπός της διατριβής ήταν να εξεταστεί και να αξιολογηθεί η πολλαπλασιαστική ικανότητα και συνεπώς, ευρύτερα, η ποιότητα των συντηρουμένων σε κρυοκατάψυξη μονάδων ΟΠ.Α. , μετά την απόψυξή τους, με την διερεύνηση των αποτελεσμάτων και των επιδράσεων της κρυοκατάψυξης, διάρκειας έως 32 μηνών, σε ηλεκτρομηχανικό κρυογονικό καταψύκτη (-150⁰C), πάνω σε διάφορες σημαντικές παραμέτρους, στενά συσχετιζόμενες με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των HSPCs, που προσδιορίζουν την ποιότητα των μονάδων ΟΠ.Α. και συνεπώς την καταλληλότητά τους για χρήση σε πιθανή μεταμόσχευση. Τέτοιες παράμετροι ήταν μεταξύ άλλων οι κάτωθι: TNC-total nucleated cells, MNC-mononuclear cells, CD34⁺, CD133⁺, καθώς και συσχετιζόμενες βιωσιμότητες (viabilities) και ανακτήσεις κυττάρων (recoveries). Επίσης, διενεργήθηκαν in vitro καλλιέργειες κυττάρων, τόσο από δείγματα πριν την κατάψυξη όσο και μετά την απόψυξη, για κάθε μονάδα ΟΠ.Α. που χρησιμοποιήθηκε γι'αυτήν την μελέτη καθώς και έλεγχος της δυνατότητας ανακαλλιέργειας των colony forming units- granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte (CFU-GEMM) έτσι ώστε να εκτιμηθεί και η ικανότητα αυτοανανέωσης (self-renewal) των HSPCs.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Οι δότες που στρατολογήθηκαν για την λήψη του ΟΠΑ προήλθαν από δύο νοσοκομεία τα οποία επιλέχθηκαν με βάση τον αριθμό των τοκετών και του ενδιαφέροντος του προσωπικού για την διαδικασία της λήψης.

Από τις υποψήφιες μητέρες ελήφθει γραπτή συναίνεση για τη λήψη του ΟΠ.Α πριν τον τοκετό και το ΟΠ.Α συλλέχθηκε in utero (πριν την αποβολή του πλακούντα) από εκπαιδευμένο προσωπικό της τράπεζας ΟΠ.Α (**Εικ.1**)

Εν συντομία, μετά από φυσιολογικό τοκετό τελειόμηνων νεογνών, το προσωπικό της τράπεζας ΟΠΑ συνέλεξε το ομφαλοπλακουντιακό αίμα διακόπτοντας τη ροή του αίματος στην ομφαλική φλέβα, μετά από αντισηψία με 70% οινόπνευμα και ιωδιούχο διάλυμμα.



Εικόνα 1

Στη συνέχεια, το ΟΠ.Α, με τη βοήθεια της βαρύτητας, συλλέχθηκε σε κλειστό διπλό σύστημα ασκών (MacoPharma Cord Blood Collection Bag, MSC 1201 DU, Tourcoing, France) που περιείχε 21 ml CPD (citrate-phosphate-dextrose) αντιπηκτικό στον ασκό συλλογής και ακόμη 8 ml CPD σε δορυφόρο ασκό για την έκπλυση των ασκών συλλογής μετά την λήψη. Μετά την συλλογή του ΟΠΑ και την αριθμητική σήμανση των ασκών καθώς και την αναγραφή της ημέρας και της ώρας της λήψης οι μονάδες του ΟΠΑ διατηρούνται στους 4⁰C και μεταφέρονται στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (Ελ.Τρ.ΟΠ.Α). Η επεξεργασία όλων των μονάδων ΟΠ.Α. γίνεται εντός 24 ωρών από την συλλογή. Κριτήρια απόρριψης ήταν η ηλικία της μητέρας (<18 ετών), όχι καλή γλωσσική επικοινωνία, προηγούμενες κυήσεις υψηλού κινδύνου,

προηγούμενοι επείγοντες τοκετοί, συγγενείς ανωμαλίες και γνωστές κληρονομούμενες ή μεταδιδόμενες αιματολογικά παθήσεις που επηρεάζουν το κύημα ή την μητέρα.

3.2. Ημιαυτόματη διαδικασία διαχωρισμού

Για την ημιαυτόματη διαδικασία διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Sepax Cell Processing System (Biosafe, Eysins, Switzerland) – UCB/HES protocol, με το CS-490 cell separation kit το οποίο απαρτίζεται από ένα κλειστό σύστημα 3 ασκών (ένας ασκός συλλογής buffy coat, ασκοί συλλογής πλάσματος και ερυθρών αιμοσφαιρίων) και είναι ενωμένο με ένα αποστειρωμένο σύστημα πρόσδεσης (sterile docking system-Haemonetics TDC).

Το Sepax (**Εικ.2**) είναι μια συσκευή φυγοκέντρωσης για την επεξεργασία όγκων αίματος από 20 έως 200ml. Αποτελείται από μια φυγόκεντρο και ένα υδροπνευματικό σύστημα με δυνατότητα δημιουργίας κενού ή πίεσης με σκοπό την πλήρωση ή το άδειασμα του διαμερίσματος διαχωρισμού. Επιπρόσθετα, ένας οπτικός αισθητήρας και ένα σύστημα από 3 περιστρεφόμενες βαλβίδες ελέγχουν τη ροή του αίματος στο σύστημα διαχωρισμού.



Εικόνα 2

Μετά την δειγματοληψία για τον έλεγχο ρουτίνας και ποιοτικό έλεγχο (QC) ένας όγκος 20% σε HES (Υδροξυαιθυλοαμυλο- hydroxyethylstarch σε 0,9 NaCl-Fresenius Kabi, Bad Homburg,

Germany German), εν σχέσει με τον συνολικό όγκο της μονάδας ΟΠΑ, προστείνεται στον ασκό συλλογής περίπου 20 λεπτά πριν τη διαδικασία της επεξεργασίας. Το HES επιτρέπει ταχύτερη καθίζηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και συμμετέχει στην διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης. Οι μονάδες του ΟΠΑ απομειώνονται σε σταθερό όγκο 25 ml πριν την κατάψυξη, αφαιρώντας το επιπλέον πλάσμα και τα ερυθρά αιμοσφαίρια και αφήνοντας τα απαιτούμενα κύτταρα στη στοιβάδα του buffy coat. Το πρωτόκολλο UCB-HES επιτρέπει την μείωση αυτή του όγκου της μονάδας ΟΠΑ σε 25 έως 30 min.

3.3. Κρυοκατάψυξη

Ένα διάλυμα κρυοπροστατευτικής ουσίας 50% DMSO διαλυμένο σε Dextran 40 (Dimethyl Sulfoxide/Dextran 40 solution, Pall 791-04U,Pall, East Hills, NY) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 10% v/v. Ο αναγκαίος όγκος αποστειρωμένου, ψυχρού διαλύματος DMSO προστέθηκε στον ασκό κατάψυξης εντός 15 min (ρυθμός έγχυσης 20 ml ανα ώρα) χρησιμοποιώντας μια αντλία σύριγγας και ένα περιστροφικό αναδευτήρα για να εξασφαλιστεί ομαλή αλλά σημαντική ανάδευση. Οι ασκοί κατάψυξης στη συνέχεια συσκευάζονται εντός άλλου ασκού και μετά τοποθετούνται εντός του καταψύκτη ελεγχόμενης κατάψυξης.

Για την κρυοκατάψυξη, χρησιμοποιήθηκε ο ελεγχόμενος από υπολογιστή καταψύκτης SY-LAB (SY-LAB Rate Freezer Instruments SY-LAB Rate Freezer Instruments, Neupurkersdorf, Austria) υποστηριζόμενος από το λογισμικό IceCube 15M (Geräte GmbH, Austria) (**Εικ.3**). Με στόχο να εξασφαλιστεί ελεγχόμενη κατάψυξη με μείωση της θερμοκρασίας 1⁰C ανά min (μεταξύ 8⁰C και -50⁰C), σχεδιάστηκε ένα ειδικό πρόγραμμα κλασματικήςκατάψυξης.



Εικόνα 3

Το πρόγραμμα καθορίζει μία αρχική θερμοκρασία 8°C για 5 λεπτά, με έναν ρυθμό ψύξης 1°C ανά λεπτό έως ότου η θερμοκρασία φτάσει τους -50°C σε 58 λεπτά. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όριο γιατί στην περιοχή θερμοκρασίας γύρω από το σημείο κατάψυξης (freezing point) του εναιωρήματος των κυττάρων έχουμε τη δημιουργία κρυστάλλων στο εναιώρημα, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτή η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να μειώσει σημαντικά την βιωσιμότητα των κυττάρων, και αντισταθμίζεται επαρκώς από μια απότομη πτώση της θερμοκρασίας. Μετά το σημείο των -50°C , η θερμοκρασία μειώνεται με ρυθμό $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ μέχρι η θερμοκρασία στόχος των -100°C να επιτευχθεί σε 14 λεπτά. Με το τέλος του προγράμματος, όταν η μονάδα ΟΠΑ έχει ψυχθεί στην θερμοκρασία των -100°C , μεταφέρεται στον ηλεκτρικό κρυοκαταψύκτη (HERAEUS® HERAFREEZE® CRYOGENIC FREEZER, Hanau, Germany) (**Εικ.4**) στους -150°C .



Εικόνα 4

Κρυοπροστατευτικές ουσίες: απαραίτητες στις συλλογές στελεχειαίων κυττάρων γιατί αναστέλλουν τον σχηματισμό ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων κρυστάλλων και συνεπώς προλαμβάνουν τον κυτταρικό θάνατο. Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο είναι το DMSO, το οποίο αποτρέπει την κυτταρική βλάβη εξαιτίας του ψύχους. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικ.5**) παρουσιάζεται μια μονάδα ΟΠ.Α. μετά την επεξεργασία και την προσθήκη κρυοσυντηρητικού.



Εικόνα 5

3.4. Απόψυξη και πλούσιμο

Οι μονάδες ΟΠΑ τοποθετήθηκαν στον κρυογονικό καταψύκτη στους -150°C για τουλάχιστον 6 μήνες και στη συνέχεια αποψύχθηκαν και εκπλύθηκαν με μέθοδο που βασίζεται στο πρωτόκολλο της τράπεζας ΟΠΑ της Ν. Υόρκης²⁷¹. Κατά την αφαίρεση από τον κρυογονικό καταψύκτη από τους -150°C , ο ασκός της μονάδας ΟΠΑ εκτείνεται στο περιβάλλον για 5 min με σκοπό την επανάκτηση της ελαστικότητας του πλαστικού περιβλήματος του.

Στη συνέχεια, ο ασκός βυθίζεται σε υδατόλουτρο 37°C για να αποψυχθεί το ταχύτερο δυνατόν, συνήθως σε χρόνο μικρότερο των 2 min. Ένα σύστημα ασκών απόψυξης προσαρμόζεται στον ασκό κρυοκατάψυξης (Stem cell transplant System; Pall Medsep) και αμέσως το περιεχόμενο του ασκού αραιώνεται με έναν ίσο όγκο ισοτονικού διαλύματος που περιέχει 2,5% ανθρώπινο αλβουμίνη (Human-Albumin 20%, Aventis Behring, Behring, Marburg, Germany) και 6% HES με συνεχή ανάμιξη. Μετά από 5 min ανάδευσης έως ότου επιτευχθεί ισορροπία, το περιεχόμενο της μονάδας ΟΠΑ αραιώνεται εκ νέου προσθέτοντας 60 ml HES 6% εις διπλούν. Στη συνέχεια, ο αρχικός ασκός κρυοκατάψυξης αποχωρίζεται και το σύστημα των δύο ασκών που περιέχει το αποψυγμένο ΟΠΑ υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Sanyo cell sep/6-720R, Rosbach, Germany) (**Εικ.6**) για 20 min στις 1700 στρ. σε 10°C .



Εικόνα 6

Το υπερκείμενο αφαιρείται και τα συλλεγμένα κύτταρα επαναδιαλύονται αργά σε ανθρώπειο αλβουμίνη έως τον αρχικό όγκο της μονάδας ΟΠΑ πριν την κατάψυξη και μετά την μείωση του όγκου της.

3.5. Μετρήσεις με τη χρήση αιματολογικού αναλυτή

Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου πριν και μετά την μείωση του όγκου. Για τοςκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αυτόματος αιματολογικός αναλυτής (Abbot Cell-DYN 4000) (**Εικ.7**). Οι περιεκτικότητες των TNCs (Total Nucleated Cells), MNCs (Mononuclear cells), ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) και αιμοπεταλίων (PLTs) μετετρέπουν σε απόλυτους κυτταρικούς αριθμούς χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους όγκους και την εκατοστιαία ανάκτηση (recovery) κάθε κυτταρικού πληθυσμού μετά τη μείωση του όγκου.



Εικόνα 7

3.6. Κυτταρομετρία ροής

3.6.1. Εισαγωγή

Με σκοπό να καθορίσουμε τον αριθμό των CD34⁺ και CD133⁺ κυττάρων σε σχέση με τον αριθμό των TNCs (Total Nucleated Cells) καθώς και απόλυτους αριθμούς όπως και για να μετρήσουμε την ζωτικότητα τους (Viability), χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής.

Το αντιγόνο CD34, ως γνωστόν, αποτελεί μια οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας τύπου I και εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων^{51,52,368}.

Οι επίτοποι CD34 διαιρούνται σε τρεις τάξεις, με γνώμονα την ευαισθησία τους στην νευραμινιδάση και στη γλυκοπρωτεάση της *Pasteurella haemolytica*³⁶⁹. Το μονοκλωνικό αντίσωμα που κατευθύνεται προς το αντιγόνο CD34 και χρησιμοποιείται στα αντιδραστήρια Stem kit αναγνωρίζει ειδικά έναν επίτοπο τάξης III του μορίου CD34³⁷⁰, όπως καθορίστηκε από το προφίλ ενζυματικής σχάσης^{369,371}.

Το αντίσωμα CD45 αναγνωρίζει τα μέλη της οικογένειας των παν-λευκοκυτταρικών αντιγόνων CD45 με μοριακά βάρη 180, 190, 210 και 220kDa³⁷²⁻⁴ και είναι επίσης γνωστό με τον όρο κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (LCA).

Το αντιγόνο CD45 εκφράζεται σε κάθε τύπο αιμοποιητικού κυττάρου, με την εξαίρεση των ωρίμων ερυθροκυττάρων και των αμέσων προγονικών τους κυττάρων^{374,375} και δεν ανιχνεύεται στους διαφοροποιημένους μη αιμοποιητικούς ιστούς³⁷⁵⁻⁷⁸.

Ο δείκτης βιωσιμότητας 7-αμινο-ακτινομυκίνη D είναι ένα ανάλογο της ακτινομυκίνης D. Οι ακτινομυκίνες είναι βιολογικά ενεργές ουσίες που περιέχουν τη χρωμοφόρο ομάδα 2-αμινο-4,6 διμεθυλφenoξαζόνη-3 και δύο κυκλικά πενταπεπτίδια³⁷⁸.

Οι ακτινομυκίνες σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με το δίκλωνο δεσόξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ (DNA), αλλά δεν σχηματίζουν αυτόν τον τύπο συμπλόκου ούτε με το δίκλωνο ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), ούτε με τα υβρίδια RNA-DNA, ούτε με τα μονόκλιωνα DNA ή RNA^{378,379}.

Η 7-AAD, οποία περιέχει μια αμινομάδα που έχει υποκατασταθεί στη θέση 7 της χρωμοφόρου και παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις κυτοσίνη και γουανίνη του DNA³⁷⁸. Οι φασματικές ιδιότητες της 7-AAD την καθιστούν μόριο εξαιρετικά προσαρμοσμένο για ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής³⁸⁰.

Η μέγιστη απορρόφηση του συμπλόκου 7-AAD/DNA τοποθετείται στην πράσινη περιοχή του ορατού φάσματος και είναι επομένως κατάλληλη για έναν κυτταρομετρική εξοπλισμένο με λέιζερ αργού μήκους κύματος διέγερσης 488nm³⁷⁸.

Η βαθιά ερυθρή εκπομπή φθορισμού της 7-AAD (635 έως 675nm) καθιστά ευκολότερη τη χρήση της ουσίας αυτής σε συνδυασμό με τα συζευγμένα αντισώματα ισοθειοκυανικού οξέος φλουορεσκεΐνης (FITC) και φυκοερυθρίνης (PE) καθώς, σε αντίθεση με το ιωδιούχο προπίδιο (propidium), το σύμπλοκο 7-AAD/DNA παρουσιάζει ελάχιστη φασματική επικάλυψη με τα FITC ή PE³⁸⁰.

Τα νεκρωτικά, αποπτωτικά ή/και τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες αποτελούν πηγή παρεμβολής κατά την ανάλυση των βιώσιμων κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Τα μη βιώσιμα κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν και να εξαλειφθούν μέσω της θετικής σήμανσης τους από την 7-AAD, καθώς τα βιώσιμα κύτταρα δεν υφίστανται χρώση (αρνητικά)³⁸¹.

3.6.2. Αρχή της δοκιμασίας

Για την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε ένας Beckman Coulter Epics XL κυτταρομετρητής χρησιμοποιώντας λογισμικό ανάκτησης δεδομένων EXPO32 ADC μαζί με το Stem-KitTM Reagents της

ιδίας εταιρείας (Ref. IM3660). Τα αντιδραστήρια του Stem-Kit™ Reagents είναι σχεδιασμένα να εντοπίζουν τα ανθρώπινα HSPCs χρησιμοποιώντας τα παρακάτω κριτήρια: Τα CD34⁺ κύτταρα εμφανίζουν χαμηλό πλάγιο σκεδασμό και χαμηλό με ενδιάμεσο πρόσθιο σκεδασμό.

Επίσης εκφράζουν τα CD34 και CD45 αντιγόνα επιφανείας με ένταση παρόμοια των βλάστων, δηλαδή αντιχνεύσιμη αλλά σε κάθε περίπτωση χαμηλότερη των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων.

Επειδή η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην ικανότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων να προσκολλώνται στην επιφάνεια των κυττάρων που εκφράζουν δεδομένους αντιγονικούς καθοριστές, τα δείγματα λαμβάνονται αμέσως πριν και μετά την μείωση του όγκου και σημαίνονται με anti-CD45FITC (fluorescein isothiocyanate) και anti-CD34 ή CD133 PE (phycoerythrin) συνδετικά αντισώματα.

Η βιωσιμότητα (viability) των CD34⁺ και CD133⁺ κυττάρων ελέγχθηκε με τη βοήθεια της έμβιας χρωστικής 7-amino-actinomycin D (7-ADD) με την οποία προσδιορίζεται η ακεραιότητα της μεμβράνης του κυττάρου.

Το αντιδραστήριο CD45-FITC/CD34PE των Stem-kit™ Reagents (Stem-Kit, Ref. IM3660) αποτελεί συνδυασμό δύο εξειδικευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού, καθένα από τα οποία είναι συζευγμένο με ένα διαφορετικό φθοριόχρωμα.

Η εξειδικευμένη σήμανση της κυτταρικής επιφάνειας πραγματοποιείται μέσω της επώασης ενός βιολογικού δείγματος με το δίχρωμο αντιδραστήριο CD45-FITC/CD34PE.

Ακόμη μια δοκιμασία πραγματοποιείται στο ίδιο δείγμα μέσω της επώασής του με το αντιδραστήριο CD45-FITC/IsoClonic™ Control-PE, προκειμένου να ελεγχθεί η μη ειδική σύνδεση του μονοκλωνικού αντισώματος CD34PE.

Ο δείκτης βιωσιμότητας 7-AAD, μια χρωστική νουκλεϊνικών οξέων που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη των προσεγγισιμων βάσεων του κυτταρικού DNA, χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βιώσιμων από τα μη βιώσιμα κύτταρα.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κάθε δείγματος λύνονται μέσω του διαλύματος λύσης NH₄CL στη συγκέντρωση 1X.

Τα φθορίζοντα σφαιρίδια Stem-Count™ Fluorospheres (αντιδραστήριο απόλυτης μέτρησης) που περιέχονται στο kit προστίθενται και τα δείγματα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Ο διαδικαστικός και ποιοτικός έλεγχος της δοκιμασίας εξασφαλίζονται από το όργανο και τα αντιδραστήρια ποιοτικού ελέγχου του δείγματος.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των χρησιμοποιηθέντων μονοκλωνικών αντισωμάτων:

Εξειδίκευση	CD45	CD34
Κλώνος	J33	581
Υβρίδωμα	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Ανοσογόνο	Ανθρώπινη κυτταρική γραμμή LAZ 221 ALL	Ανθρώπινη κυτταρική γραμμή KG-1a
Αλυσίδα Ig	IgG1, ελαφρές αλυσίδες k	IgG1, ελαφρές αλυσίδες k
Είδος	Ποντικός	Ποντικός
Σύζευξη	Ισοθειοκυανικό οξύ φλουορεσκεΐνης (FITC)	R Φυκοερυθρίνη (PE)
Μοριακή αναλογία	5-8 moles FITC/ mole Ig	0,5-1,5 moles PE/mole Ig
Μήκος κύματος διέγερσης	488 nm (μπλε-πράσινο)	488 nm (μπλε-πράσινο)
Εκπομπή φθορισμού	504 μέχρι 541 nm (κυρίως πράσινο)	568 μέχρι 590 nm (κυρίως πορτοκαλί)

3.6.3. Διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων

Για κάθε δείγμα προετοιμάζουμε 3 σωληνάρια δειγματοληψίας ως ακολούθως:

- 45/34/7-AAD N° 1
- 45/34/7-AAD N° 2

- 45/34/7-AAD

A. Τοποθετούμε με την πιπέττα 20μL του αντιδραστηρίου CD45-FITC/CD34-PE στους σωλήνες 45/34/7-ADD N^ο 1 και 45/34/7-AAD N^ο 2.

B. Τοποθετούμε με την πιπέττα 20μL του αντιδραστηρίου CD45-FITC/CD34-PE στους σωλήνες 45/34/7-AAD N^ο 2.

Γ. Τοποθετούμε με την πιπέττα 20μL του αντιδραστηρίου CD45-FITC/IsoClonic Control-PE στο σωλήνα 45/CTRL/7-AAD.

Δ. Τοποθετούμε με την πιπέττα 20μL χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD σε κάθε σωλήνα.

E. Μέσω της πιπέττας θετικού εκτοπίσματος ή της επαναληπτικής, τοποθετούμε 100μL από το δείγμα του ΟΠ.Α στο σωλήνα.

ΣΤ. Ανακινούμε αμέσως με Vortex για 5 δευτερόλεπτα.

Z. Επωάζουμε όλους τους σωλήνες σε θερμοκρασία δωματίου (18 με 25^οC) για 20λεπτά, μακριά από εστίες φωτός.

H. Μετά την επώαση, προσθέτουμε σε κάθε σωλήνα 2 mL λυτικού διαλύματος NH₄Cl 1X, που έχει προετοιμαστεί εκείνη τη στιγμή, και ανακινούμε αμέσως με Vortex για 5 δευτερόλεπτα.

Θ. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από εστίες φωτός.

I. Αναμειγνύουμε ελαφρά τα φθοροσφαιρίδια Stem-Count αναποδογυρίζοντας 3 με 5 φορές το φιαλίδιο πριν τη χρήση.

K. Πριν την έναρξη της ανάλυσης και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, τοποθετούμε 100μL των φθοροσφαιριδίων Stem-Count σε κάθε έναν από τους τρεις σωλήνες χρησιμοποιώντας μια επαναληπτική πιπέττα ή θετικού εκτοπίσματος.

Λ. Ανακινούμε αμέσως με Vortex κάθε σωλήνα για 5 δευτερόλεπτα.

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα στάδια χρήσης των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων:

Σύνοψη των σταδίων χρήσης των δειγμάτων			
Αντιδραστήρια/Δείγματα	45/34/7-AAD	45/34/7-AAD	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC/CD34-PE	20 μl	20 μl	
CD45-FITC/IsoClonic Control-PE			20 μl
Χρωστική Βιωσιμότητας 7-AAD	20 μl	20 μl	20 μl
Δείγμα	100 μl	100 μl	100 μl
Ανακινούμε με Vortex και μετά επωάζουμε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 λεπτά. Προστατεύουμε από το φως.			
Διάλυμα Λύσης NH ₄ Cl 1X	2 ml	2 ml	2 ml
Ανακινούμε με Vortex και μετά επωάζουμε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 λεπτά. Προστατεύουμε από το φως.			
Φλουοροσφαιρίδια Stem-Count	100 μl	100 μl	100μl
Ανακινούμε με Vortex και συντηρούμε σε λουτρό παγωμένου νερού το αργότερο για μια ώρα πριν από την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Αναλύουμε αμέσως τα αποψυγμένα δείγματα. Προστατεύουμε από το φως.			

Η ανάλυση γινόταν, όπως αναφέρθηκε, σε κυτταρόμετρο ροής Beckman Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland) χρησιμοποιώντας λογισμικό EXPO32 ADC (**Εικ.8**). Ο κυτταρομετρικής ροής ήταν εξοπλισμένος με ανιχνευτές πρόσθιας σκέδασης (Forward Scatter-FS) και ορθογώνια σκέδαση (Side Scatter-SS), καθώς και με τέσσερις ανιχνευτές φθορισμού. Για το κανάλι FL3 (ανίχνευση των φθορισμοσφαιριδίων Stem-Count) χρησιμοποιούμε φίλτρο στα 620 nm ενώ για το κανάλι FL4 (ανίχνευση σήμανσης της χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD) χρησιμοποιούμε φίλτρο στα 625 nm.



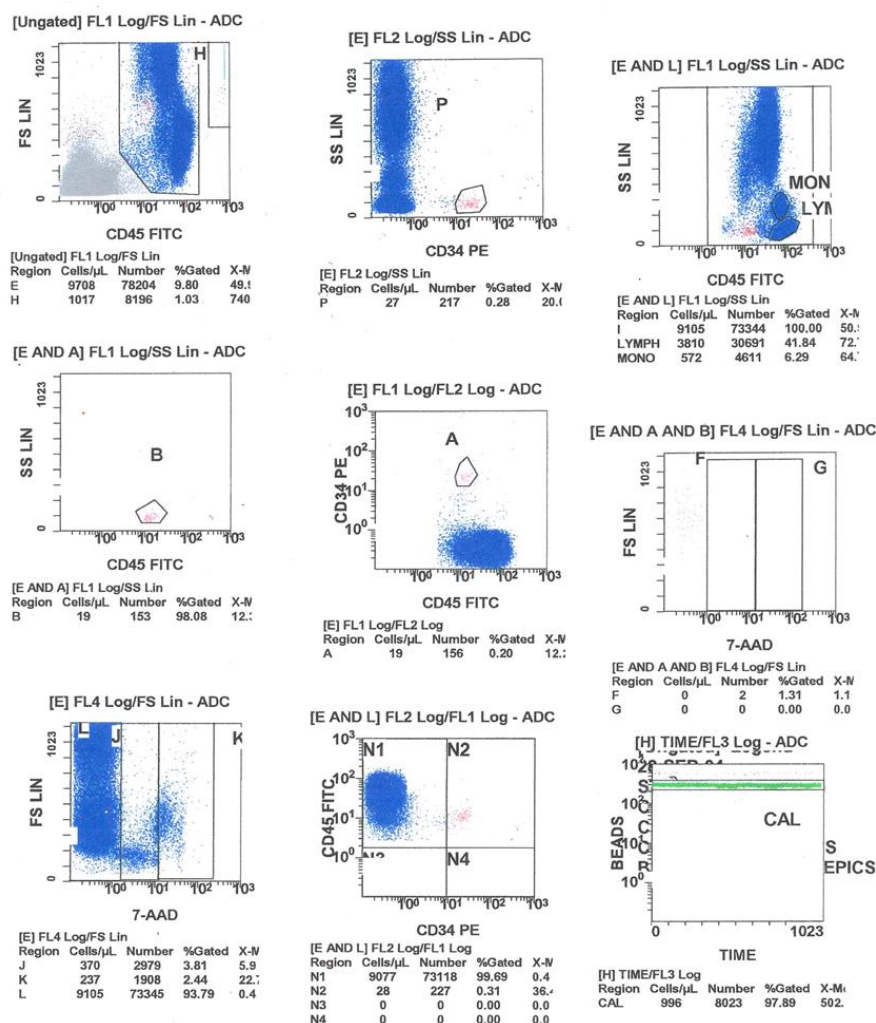
Εικόνα 8

Στο σύνολο, 75.000 CD45⁺ γεγονότα (events) μετρήθηκαν για κάθε μονάδα ΟΠΑ και για την περαιτέρω ανάλυσή τους εφαρμόστηκε η τεχνική των διαδοχικών πυλών κατά σειρά (sequential gating) του πληθυσμού των CD45⁺ με σκοπό να ταυτοποιηθούν οι υποπληθυσμοί των

CD34⁺ και CD133⁺ κυττάρων σύμφωνα με την μεθοδολογία της διπλής πλατφόρμας (dual platform) της ISHAGE.

Με βάση αυτή τη μεθοδολογία αυτή, ο απόλυτος αριθμός των CD34⁺ και CD133⁺ κυττάρων θα μπορούσε να προσδιοριστεί με την προσθήκη στο δείγμα ανάλυσης ενός γνωστού όγκου Flow-Count fluorospheres (Stem-Kit™ Reagents, Beckman Coulter).

Στήν παρακάτω εικόνα (**Εικ.9**) εμφανίζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης δείγματος ομφαλοπλακουντιακού αίματος μετά από κυτταρομετρία.



Στο πρώτο ιστόγραμμα, ξεκινώντας από επάνω αριστερά, (ungated) εμφανίζονται όλα τα events χωρίς τη χρήση πύλης διαχωρισμού.

Στο δεύτερο ιστόγραμμα εμφανίζονται events τα οποία είναι ισχυρά θετικά (bright) στο CD34⁺-PE και ταυτοχρόνως χαρακτηρίζονται από μέτριο με χαμηλό πλάγιο σκεδασμό (low

side scatter). Παρόλα αυτά ρυθμίζουμε το παράθυρο της πύλης (gate) της περιοχής P να συμπεριλάβει και τα CD34^{+dim} events.

Στο τρίτο ιστόγραμμα εμφανίζονται viable events από τις περιοχές E του δεύτερου ιστογράμματος και L του εβδόμου και εξαιτίας της χρήσης 7-AAD απεικονίζονται και τα stem-count flouorospheres. Τοποθετούμε την περιοχή I με τρόπο ώστε να συμπεριλάβει όλα τα CD45⁺ events, δηλαδή τα λευκοκύτταρα, ενώ ταυτοχρόνως αποκλείονται τα CD45⁻ events. Επίσης, δημιουργούμε 2 παράθυρα ανάλυσης που να περιλαμβάνουν καθ'υπεροχή μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα (ισχυρά θετικά CD45⁺ και χαμηλού πλάγιου σκεδασμού). Το ιστόγραμμα αυτό βοηθάει επίσης στην καταμέτρηση των έμβιων WBC στον υπολογισμό του απολύτου αριθμού των CD34⁺.

Στο τέταρτο ιστόγραμμα απεικονίζονται events από τις περιοχές E του δεύτερου ιστογράμματος και A του πέμπτου. Η περιοχή B περιλαμβάνει γεγονότα (events) και συνεπώς κύτταρα που είναι θετικά CD34⁺ και ταυτοχρόνως χαρακτηρίζονται από χαμηλό πλάγιο σκεδασμό (low side scatter) και χαμηλή με ενδιάμεση CD45 χρώση.

Στο πέμπτο ιστόγραμμα απεικονίζονται events θετικά CD34 και CD45 και τα δεδομένα διαβιβάζονται στο τέταρτο ιστόγραμμα.

Στο έβδομο ιστόγραμμα απεικονίζονται τα viable events (περιοχή J) από την E περιοχή του πρώτου ιστογράμματος. Τα events αυτά είναι 7-AAD αρνητικά δηλαδή τα αντίστοιχα κύτταρα δεν παρακρατούν χρωστική ενώ στις περιοχές J και K εμφανίζονται events που αντιστοιχούν σε κύτταρα που βρίσκονται σε απόπτωση (J) ή νεκρά (K).

Το όγδοο ιστόγραμμα απεικονίζει τα ίδια events με το πέμπτο με τη διαφορά ότι το συγκεκριμένο ιστόγραμμα είναι επιβοηθητικό στην οπτικοποίηση του κατώτατου ορίου της έκφρασης των CD45⁺ events στα πλαίσια των CD34⁺ events. Η περιοχή N2 του ιστογράμματος περιλαμβάνει όλα τα φλουοροσφαιρίδια (Stem-Count Stem-Cell Flouorospheres).

Το ένατο ιστόγραμμα εμφανίζει events από την περιοχή N2 του όγδοου ιστογράμματος, δηλαδή τα stem-cell flouorospheres. Με πράσινο χρώμα φαίνεται η κατανομή

των φλουροσφαιριδίων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του δείγματος. Για την εγκυρότητα της ανάλυσης θα πρέπει η κατανομή τους να είναι ομοιογενής και συνεχής.

3.7. In vitro κυτταροκαλλιέργειες για τον καθορισμό CFUs (colony-forming units)

3.7.1. Εισαγωγή

Στον ενήλικα ένας μικρός αριθμός στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) που βρίσκεται κυρίως στο μυελό των οστών, παράγει ετερογενείς ενεργούς πληθυσμούς προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Αυτά τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου αριθμού ωρίμων αιματοκυττάρων ημερησίως. Τα HSCs επίσης βρίσκονται στο Ο.Π.Α και κατά τη διάρκεια της οντογένεσης σε ιστούς όπως το εμβρυϊκό ήπαρ.

Διάφορα συστήματα καλλιεργείων έχουν αναπτυχθεί για την ποσοτική εκτίμηση του αριθμού των αποικιών των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (ερυθροκυτταρικών, κοκκιοκυτταρικών, μονοκυτταρο-μακροφαγικών και μεγακαρυοκυτταρικών). Όταν αυτά καλλιεργηθούν σε κατάλληλο ημιστερεό θρεπτικό υλικό, μεμονωμένα προγονικά κύτταρα που αποκαλούνται CFCs (Colony forming cells) πολλαπλασιάζονται για να σχηματίσουν διακριτά σμήνη αποικιών ή μεμονωμένες αποικίες. Οι μέθοδοι CFC πραγματοποιούνται καλλιεργώντας ένα διάλυμα καθορισμένης συγκέντρωσης κυττάρων σε ένα ημιστερεό θρεπτικό υλικό όπως η μεθυλλοκυτταρίνη ή το κολλαγόνο που εμπλουτίζεται με κυτοκίνες και θρεπτικά στοιχεία και στη συνέχεια επωάζεται στους 37⁰C για 14 έως 16 ημέρες.

Τα CFCs που αναπτύχθηκαν στη συνέχεια ταξινομήθηκαν και μετρήθηκαν με βάση την αναγνώριση της μορφολογίας ενός ή περισσότερων ειδών σειρών αιμοποιητικών κυττάρων εντός της αποικίας. Η εκτίμηση της αποικίας μπορεί να γίνει in situ με οπτικό μικροσκόπιο ή αποσπώντας μεμονωμένες αποικίες και στη συνέχεια βάφοντάς τις χρησιμοποιώντας κυτταροχημικές και ανοσοχημικές μεθόδους.

Διάφοροι παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί γι' αυτό το σκοπό όπως μεθυλλοκυτταρίνη, κολλαγόνο και θρόμβοι ινικής. Η μεθυλλοκυτταρίνη είναι ένα σχετικά αδρανές πολυμερές που σχηματίζει ένα σταθερό gel με επαρκή οπτική διαύγεια.

Συνήθως η μεθυλλοκυτταρίνη χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0,9-1,2% σε υλικό καλλιέργειας υποβοηθούμενο από παράγοντες που περιλαμβάνουν Fetal bovine serum (FBS), Bovine serum albumin (BSA), 2-mercaptoethanol, ινσουλίνη, τρανσφερρίνη καθώς και ανασυνδυασμένες κυτταροκίνες ή διαμορφοποιημένο υλικό που παρέχει παράγοντες ενισχυτικούς της καλλιέργειας. Το υλικό καλλιέργειας που βασίζεται στη μεθυλλοκυτταρίνη, βοηθά την καλύτερη ανάπτυξη της ερυθροκυτταρικής σειράς σε σχέση με άλλα είδη υποστρώματος, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη ταυτόχρονα στην ίδια καλλιέργεια CFCs προέλευσης ερυθροκυτταρικής, κοκκιοκυτταρικής, μονοκυτταρικής και πολλαπλού δυναμικού (multipotential). Τα προγονικά κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς καλλιεργούνται σε υπόστρωμα κολλαγόνου και αναγνωρίζονται χρησιμοποιώντας ανοσοχημική χρώση.

3.7.2. Ανασύσταση του υποστρώματος καλλιέργειας

- Αποψύχουμε το καλλιεργητικό υλικό μεθυλλοκυτταρίνης υπό ψύξη (2-8°C) ή σε θερμοκρασία δωματίου και όχι στους 37°C και στη συνέχεια ανακινούμε ζωνερά για 30-60 sec.
- Αφού αφήσουμε το υλικό να ηρεμήσει για τουλάχιστον 5 min έτσι ώστε να διαλυθούν οι φυσαλίδες, διαμοιράζουμε το υλικό σε σωληνάρια χρησιμοποιώντας 6 έως 12 ml αποστειρωμένες σύριγγες 16-gauge διαμετρήματος και όχι με πιπέττα διότι το υλικό έχει μεγάλο ιξώδες και προσκολλάται στο τοίχωμα του tip.
- Βάζουμε 4 ml ανά σωληνάριο για να έχουμε καλλιέργειες εις τριπλούν (1,1 ml η κάθε μια) , σε αναλογία 1:10 (v/v) με τα κύτταρα.

- Για να αφαιρέσουμε τον αέρα από τη σύριγγα, τοποθετούμε τη βελόνη κάτω από την επιφάνεια του υλικού και αναρροφούμε 1 ml και στη συνέχεια πιέζουμε το έμβολο και αφαιρούμε εντελώς το υλικό.
- Τα σωληνάκια μπορούν να παραμείνουν έως 2 έτη στους -20°C ή για ένα μήνα στους $2-8^{\circ}\text{C}$ έως τη χρησιμοποίησή τους.

3.7.3. Προετοιμασία των δειγμάτων

Τα αντιπηκτικά χρησιμοποιούνται για να αποφευχθεί η θρόμβωση των κυτταρικών δειγμάτων. Η ηπαρίνη καθώς και η κιτρική δεξτρόζη (ACD) χρησιμοποιείται συνήθως για τη συλλογή δειγμάτων BM, CB και PB, τόσο για ερευνητικούς σκοπούς όσο και για κλινική χρήση. Ο μυελός των οστών και το ΟΠ.Α είναι απαραίτητο να μεταφέρονται ταχέως σε στείρο δοχείο που περιέχει 1 ml διαλύματος νατριούχου ηπαρίνης (800 IU/ml), διαλυμένης σε Iscove's MDM.

Η επεξεργασία των κυτταρικών δειγμάτων για τις CFC μεθόδους συνήθως απαιτείται για τους πιο κάτω λόγους:

- i. Η μείωση των ωρίμων ερυθρών αιμοσφαιρίων και των εμπυρήνων ερυθρών αιμοσφαιρίων τα οποία μπορούν να διαταράξουν την καταμέτρηση των αποικιών και να κάνουν την αρίθμησή τους ανακριβή.
- ii. Ο εμπλουτισμός των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στα κυτταρικά δείγματα όπου η συγκέντρωση των CFC αναμένεται χαμηλή και κατά συνέπεια η αύξηση της απόδοσης σε αριθμό αποικιών με σκοπό την ακριβέστερη καταμέτρηση των CFC.
- iii. Η μείωση του αριθμού των βοηθητικών (accessory) κυττάρων που επηρεάζουν αρνητικά ή θετικά την ανάπτυξη των CFC. Για παράδειγμα τα μονοκύτταρα/μακροφάγα μπορούν να παράγουν παράγοντες όπως IL-6 και TNF-alpha.

3.7.4. Επεξεργασία των κυττάρων

Διάφορες μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί για την επεξεργασία των δειγμάτων με σκοπό την χρήση τους για τις CFC καλλιέργειες.

Είναι σημαντικό να έχουμε κατά νουν ότι παρόλο που η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος οδηγεί σε σχετικό εμπλουτισμό των CFCs στο διάλυμα των κυττάρων, είναι αναπόφευκτη κάποιου βαθμού απώλεια CFCs κατά τη διάρκεια της κρυσυντήρησης, του κυτταρικού διαχωρισμού και του πλυσίματος των κυττάρων.

Για την αυτόματη διαδικασία διαχωρισμού, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Sepax Cell Processing System (Biosafe) – UCB/HES protocol, με το CS-490 cell separation kit το οποίο απαρτίζεται από ένα κλειστό σύστημα 3 ασκών (ένας ασκός συλλογής buffy coat, ασκοί συλλογής πλάσματος και ερυθρών αιμοσφαιρίων) και είναι ενωμένο με ένα αποστειρωμένο σύστημα πρόσδεσης (sterile docking system-Haemonetics TDC).

3.7.5. Έμβια χρώση κυανού του τρυπανίου για την εκτίμηση της βιωσιμότητας

- Αναμιγνύουμε το εναιώρημα των κυττάρων και μεταφέρουμε 100μl σε ξεχωριστό σωληνάριο.
- Προετοιμάζουμε ένα διάλυμα 1/40 αναμιγνύοντας 50μl κυτταρικού εναιωρήματος με 950μl IMDM + 2% FBS (1/20 αραιώση) και στη συνέχεια σε 100 μl του παρασκευασμένου διαλύματος προσθέτουμε 100μl κυανού του τρυπανίου (τελική συγκέντρωση 1/40).
- Χρησιμοποιώντας τριχοειδές γυάλινο σωληνάριο ή μικροπιπέτα γεμίζουμε και τα δύο διαμερίσματα της πλάκας του αιμοκυτταρόμετρου.
- Μετράμε κύτταρα που περιέχονται σε 4 μεγάλα τετράγωνα (1x1x0,1 mm) ή τουλάχιστον 100 κύτταρα. Τα κύτταρα που διατηρούν την κυανή χρωστική έχουν διαταραγμένη την ακεραιότητα της μεμβράνης, ενώ τα έμβια κύτταρα είναι διαυγή χωρίς να είναι χρωματισμένα κυανά.

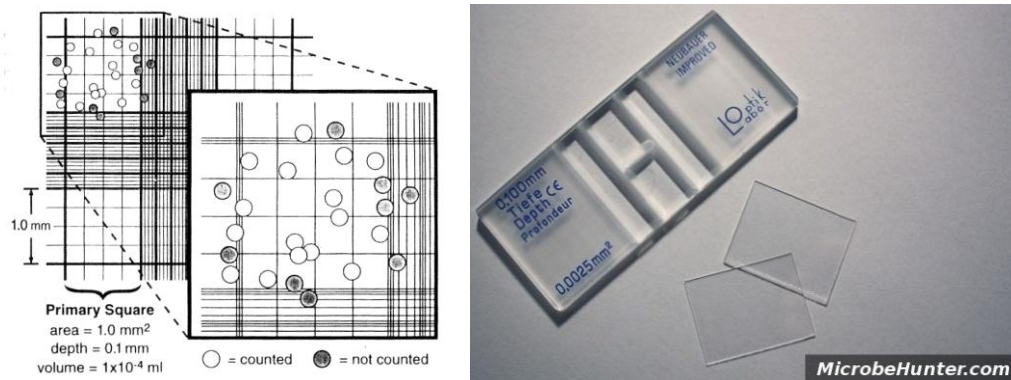
- Τα έμβια κύτταρα υπολογίζονται ως εξής:

ΜΕΣΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΜΒΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ x ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ x 10^4 = ΕΜΒΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ /ml.

- Η εκατοστιαία βιωσιμότητα υπολογίζεται ως εξής:

ΑΡ. ΕΜΒΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ / (ΑΡ. ΕΜΒΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ + ΑΡ. ΝΕΚΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ) X 100 = % ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ.

Στην πιο κάτω εικόνα (**Εικ.10**) απεικονίζεται σχηματικά ο τρόπος μέτρησης των εμβίων κυττάρων και ο διαχωρισμός τους από τα αποπτωτικά.



Εικόνα 10

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν για την διαδικασία της καλλιέργειας των HPCs. Για την καλύτερη ποσοτικοποίηση της μέτρησής τους θα πρέπει να υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ της ποσότητας των κυττάρων που καλλιεργούνται και του τελικού αριθμού των αποικιών που λαμβάνουμε. Επαρκής αριθμός κυττάρων θα πρέπει να καλλιεργηθεί ώστε να λάβουμε περίπου 25 με 150 αποικίες ανά 1,1 ml καλλιεργητικού υλικού σε τρυβλία 35 mm. Η παρουσία πάρα πολλών αποικιών έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων εξαιτίας της έλλειψης βασικών θρεπτικών συστατικών, μεταβολής του pH εξαιτίας της συγκέντρωσης διαφόρων προϊόντων του μεταβολισμού καθώς και λάθη στη μέτρηση των αποικιών λόγω της δυσκολίας της ανεύρεσης διακριτών αποικιών. Αντίθετα, πολύ λίγες αποικίες μπορεί να οδηγήσουν σε μη αξιόπιστα αποτελέσματα οπότε μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικές αραιώσεις.

3.7.6. Καλλιέργεια των δειγμάτων

.Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι κυτταροκαλλιέργειών για την ανάπτυξη CFU (colony forming units) για να καθοριστεί η ικανότητα των κυττάρων για πολλαπλασιασμό και αυτοανανέωση.

Κύτταρα πριν από την κατάψυξη καθώς και κύτταρα μετά την απόψυξη ενοφθαλμίστηκαν σε υλικό καλλιέργειας κυττάρων σε δύο ή και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε μια από τις οποίες παρήγαγε αρκετό αριθμό αποικιών ώστε να έχουμε ακριβείς μετρήσεις του αριθμού τους με ελάχιστη επικάλυψη μεταξύ των αποικιών.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα ημιστερεό υλικό με βάση τη μεθυλοκυτταρίνη (Methocult GF H4434, StemCell Technologies) όπου εμβολιάστηκαν MNCs (mononuclear cells) είς διπλούν ή είς τριπλούν σε συγκεντρώσεις από 1 έως 4×10^4 κύτταρα/ml. Μετά από επώαση 14 ημερών στους 37°C , και σε ατμόσφαιρα υδρατμών και με συγκέντρωση 5% CO_2 , αναπτύχθηκαν αποικίες προγονικών κυττάρων των κοκκιοκυττάρων (CFU-GM), αποικίες προγονικών κυττάρων των ερυθροκυττάρων (BFU-E και CFU-E) και πολυδύναμες αποικίες προγονικών κυττάρων (CFU-GEMM), οι οποίες ελέγχθηκαν για μικροσκοπική ανάπτυξη και μετρήθηκαν με βάση σταθερά κριτήρια³⁸². Η διαδικασία της καλλιέργειας έχει ως εξής:

- Αποψύχουμε τον αναγκαίο αριθμό προκατεψυγμένων σωληναρίων υλικού MethoCult® medium αφήνοντάς τα όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου ή σε ψύξη ($2-8^{\circ}\text{C}$).
- Προετοιμάζουμε τα τρυβλία της καλλιέργειας τοποθετώντας 2 τρυβλία 35mm εντός ενός τρυβλίου 10 nm με καπάκι. Προσθέτουμε ένα τρίτο τρυβλίο των 35 mm χωρίς καπάκι όπου έχουμε προσθέσει νερό.

Τα τρυβλία θα πρέπει να έχουν ελεγχθεί έτσι ώστε να έχουν την ελάχιστη δυνατή προσκολλητικότητα προς τα κύτταρα διότι αυτή διαταράσσει την εμφάνιση των αποικιών κατά την παρατήρησή τους.

- Διαλύουμε τα κύτταρα σε IMDM + 2% FBS σε υποδεκαπλάσια αραιώση ως τελική αραιώση για καλλιέργεια.
- Προσθέτουμε 0,3 ml από το εναιώρημα των κυττάρων σε 3 ml Methocult[®] για δύο τρυβλία και αφού ανακινήσουμε σε vortex, αφήνουμε το υλικό να ηρεμήσει για 5 min και τις φυσαλίδες να διαλυθούν.
- Μεταφέρουμε το υλικό στα τρυβλία της καλλιέργειας με τη βοήθεια σύριγγας 3cc και βελόνης 16-gauge διαμετρήματος. Για κάθε τρυβλίο χρησιμοποιούμε μια καινούργια βελόνη πεπλατυσμένου στομίου. Οι βελόνες με πεπλατυσμένο στόμιο χρησιμοποιούνται για λόγους ασφαλείας και για την ακριβή έγχυση των κυττάρων του υλικού μεθυλοκυτταρίνης δεδομένου ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιπέτες εξαιτίας του υψηλού ιξώδους του υλικού.
- Για να αφαιρέσουμε τον αέρα από την σύριγγα, τοποθετούμε την άκρη της βελόνης κάτω από την επιφάνεια του υλικού και αφαιρούμε περίπου 1 ml και στη συνέχεια το εκβάλλουμε από την σύριγγα.
- Αναρροφούμε 1,1 ml μίγματος μεθυλοκυτταρίνης με την σύριγγα για κάθε ένα από τα τρυβλία καλλιέργειας των 35 mm.

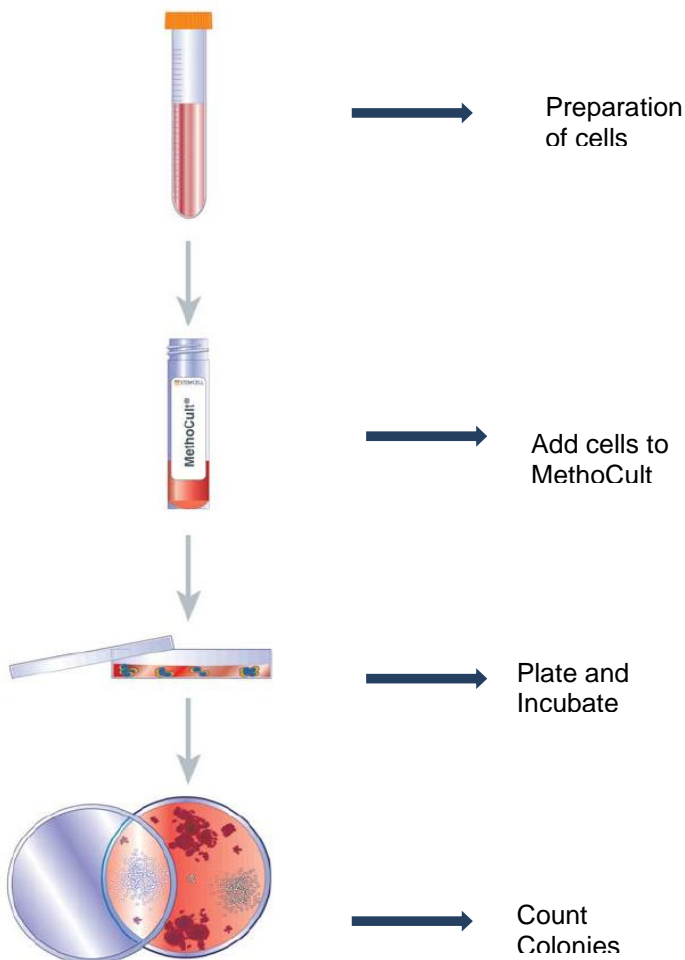
- Αφαιρούμε το κάλυμμα του τρυβλίου των 35 mm και προσθέτουμε 1,1 ml μίγματος μεθυλοκυτταρίνης. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για όλα τα επόμενα τρυβλία.
- Ανακινούμε το τρυβλίο με τρόπο ώστε το υλικό της καλλιέργειας να κατανεμηθεί ομοιόμορφα έως τα πλάγια του τρυβλίου.
- Τοποθετούμε τα τρυβλία των 35mm σε ένα μεγαλύτερο 100mm και προσθέτουμε και ένα τρυβλίο με 3 ml νερού χωρίς κάλυμμα. Το τρυβλίο με το νερό βοηθά στην διατήρηση της υγρασίας κατά τη διάρκεια της επώασης ενώ η χρήση του μεγάλου τρυβλίου βοηθά στην αποφυγή επιμολύνσεων κατά την επώαση και τον χειρισμό των καλλιιεργειών.
- Τοποθετούμε τις καλλιέργειες σε κλίβανο επώασης θερμοκρασίας 37°C, 5% CO₂ και >95% υγρασίας για 14-16 ημέρες. Οι συνθήκες της καλλιέργειας είναι πολύ σημαντικές για την ανάπτυξη των αποικιών και γι'αυτό το λόγο συνιστάται η χρήση επωαστικού κλιβάνου μέσα στο οποίο έχει τοποθετηθεί δοχείο νερού στο οποίο έχει προστεθεί κάποιο ανασταλτικό της ανάπτυξης των μικροβίων. Το μεγαλύτερο μέρος των αποικιών θα έχει αποκτήσει το μέγιστο μέγεθος (αριθμός κυττάρων/αποικία) στις 14-16 ημέρες απο την αρχή της επώασης.

3.7.7 Ανακαλλιέργεια των CFU-GEMM

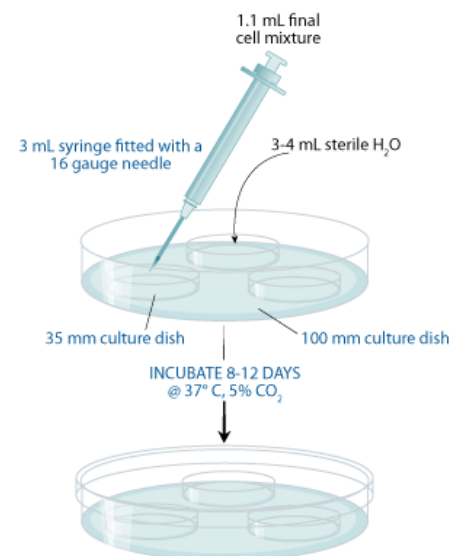
Η ανακαλλιέργεια των CFU-GEMM από το αρχικό τρυβλίο σε ένα δεύτερο θεωρείται ένα μέσο για την εκτίμηση της ικανότητας αυτοανανέωσης (self-renewal) των CFU-GEMM και έγινε όπως περιγράφεται κάτωθι χωρίς όμως τη χρήση πλάσματος από τη μονάδα ΟΠΑ το οποίο θεωρείται ότι βοηθά στην ανάπτυξη των CFU-GEMM που ανακαλλιεργούνται. Διαχωρισμένες

αποικίες CFU-GEMM που αναπτύχθηκαν σε ημιστερέο υλικό με βάση τη μεθυλοκυτταρίνη (Methocult GF H4434, StemCell Technologies), μεταφέρθηκαν-κάθε μια αποικία σε ξεχωριστό διάλυμα- και ανακαλλιεργήθηκαν σε ξεχωριστό τρυβλίο στο ίδιο υλικό. Στη συνέχεια επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες όπως και οι αρχικές (επώαση 14 ημερών στους 37⁰C, και σε ατμόσφαιρα υδρατμών και με συγκέντρωση 5% CO₂) οπότε και μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο για ανάπτυξη.

Στις παρακάτω εικόνες (**Εικ.11,12**) παρουσιάζεται συνοπτικά η ως άνω περιγραφόμενη διαδικασία ενοφθαλμισμού και καλλιέργειας των κυττάρων σε υλικό μεθυλοκυτταρίνης (Methocult[®] Media, Stem cell technologies, Vancouver, Canada).



Εικόνα 11.: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας της δοκιμασίας CFU (Ανατύπωση από www.stemcell.com)



Εικόνα 12.: Σχηματική αναπαράσταση τοποθέτησης τρυβλίων για τη δοκιμασία CFU (Ανατύπωση από www.stemcell.com)

Εικόνες διαφόρων ειδών αποικιών όπως αυτές αναπτύχθηκαν σε ημιστερέο θρεπτικό υλικό μεθυλλοκυτταρίνης (Methocult GF H4434, StemCell Technologies, Vancouver), μετά από κυτταροκαλλιέργεια κυττάρων από δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος και 14-16 ημερών επώαση στους 37⁰C, και σε ατμόσφαιρα υδρατμών και με συγκέντρωση 5% CO₂, παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

3.8. Στατιστική επεξεργασία

Περιγραφική σταστική χρησιμοποιήθηκε για τις μεταβλητές του Ο.Π.Α (μέτρηση TNC, MNC, CD34⁺ και CD133⁺), με τη βοήθεια λογισμικού υπολογιστή (Minitab Statistical Software, release 13.1, Minitab INC, PA) για να πραγματοποιηθεί η στατιστική ανάλυση. Η συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων των μεταβλητών πριν και μετά την μείωση του όγκου έγινε με το Student's 2-sample T-test. Μια τιμή p μικρότερη του 0,05 ($p \leq 0,05$) θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

4. Αποτελέσματα

4.1. Εισαγωγή

Για την κρυοκατάψυξη χρησιμοποιήθηκε ένας θάλαμος κατάψυξης ελεγχόμενος από υπολογιστή έτσι ώστε να υπάρχουν αναπαραγόμενες συνθήκες κατάψυξης με συνεχώς μεταβαλλόμενη θερμοκρασία.

Όπως αναφέρθηκε και προγενέστερα, αναπτύχθηκε ένα πρόγραμμα κατάψυξης που καθορίζει μια αρχική θερμοκρασία 8°C για 5 λεπτά, με ένα ρυθμό ψύξεως 1°C/min μέχρι η θερμοκρασία να πέσει στους -50°C εντός 58 min. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περιοχή θερμοκρασιών γύρω από το σημείο πήξεως του εναιωρήματος των κυττάρων όπου ο σχηματισμός κρυστάλλων οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας.

Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να μειώσει σημαντικά την βιωσιμότητα (viability) των κυττάρων και αυτό αντιμετωπίζεται επιτυχώς με μια απότομη κάθοδο της θερμοκρασίας. Μετά τους -50°C, η θερμοκρασία συνεχίζει να πέφτει με έναν ρυθμό 5°C/min μέχρι να επιτευχθεί η θερμοκρασία στόχος των -100°C εντός 14 min. Με την ολοκλήρωση του προγράμματος όπου οι μονάδες ΟΠΑ επιτυγχάνουν τη θερμοκρασία των -100°C, μεταφέρονται σε κρυογονικό ηλεκτρικό καταψύκτη στους -150°C (HERAfreeze® Cryogenic Freezers, Heraeus, Kendro, Germany).

Όλες οι μονάδες ΟΠΑ που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα είχαν κριθεί ακατάλληλες για μεταμόσχευση, απόφαση που βασίστηκε στον απόλυτο αριθμό των TNC και CD34⁺ ανά μονάδα και δεν χρησιμοποιήθηκαν.

Αντίθετα, δόθηκαν στην έρευνα, με σκοπό να εκτιμηθεί η ποιότητα των μονάδων ΟΠΑ πριν και μετά την κρυοσυντήρηση. Ο απόλυτος αριθμός των TNC και CD34⁺ ανά μονάδα ΟΠ.Α. ήταν καθοριστική παράμετρος για την αποδοχή ή την απόρριψη μιας μονάδας ΟΠΑ με όριο (cutoff) $511,35 \times 10^6$ κύτταρα για τα TNCs and $1,37 \times 10^6$ κύτταρα για τα CD34⁺, μετά την μείωση του όγκου και πριν την κατάψυξη.

Οι μονάδες ΟΠΑ που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη ταξινομήθηκαν ανάλογα με την διάρκεια της κρυοσυντήρησης, από την μικρότερη (6 μήνες) μέχρι την μεγαλύτερη χρονική περίοδο (3 έτη).

Ο μέσος όγκος των μονάδων ΟΠΑ που χρησιμοποιήθηκαν πριν την επεξεργασία ήταν 56,5 ml (εύρος κατανομής:47-103 ml). Το μεγάλο εύρος του όγκου των συλλεγθέντων μονάδων ΟΠΑ αντικατοπτρίζει την αναμενόμενη βιολογική μεταβλητότητα και την μεταβλητότητα της διαδικασίας συλογής του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Ο μέσος όγκος της επεξεργασμένης πλεον μονάδας ΟΠΑ, έτοιμης για κρυοσυντήρηση ήταν 25 ml (εύρος κατανομής: 21-26 ml), με έναν μέσο όγκο 6,25 ml προστιθέμενου κρυοπροστατευτικού.

4.2.Επίδραση της κρυοκατάψυξης στον αριθμό των κυττάρων

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική απώλεια στον αριθμό των TNCs πριν την κατάψυξη ($411,05 \pm 209,01 \times 10^6$, εύρος τιμών:247-1227) και μετά την απόψυξη ($320,43 \pm 186,99 \times 10^6$, εύρος τιμών:156-10580), ($p=NS$) ή στον αριθμό των MNC πριν τη κατάψυξη ($191,10 \pm 102,69$, εύρος τιμών:73-524) και μετά την απόψυξη ($160,48 \pm 98,95$, εύρος τιμών: 73-524) , ($p=NS$), μετά από έξι μηνών κρυοσυντήρηση.

Αντίθετα, μετά από ένα έτος κρυοσυντήρηση, ο μέσος απόλυτος αριθμός των TNCs μειώθηκε σημαντικά από $473,84 \pm 191,70 \times 10^6$, (εύρος τιμών :240-99) πριν την κατάψυξη σε $377,53 \pm 145,58 \times 10^6$, (εύρος τιμών:192-725), μετά την απόψυξη, ($p<0.05$) και το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε μετά από 2 έτη ($424,55 \pm 174,58 \times 10^6$, εύρος τιμών :223-1244 πριν την κατάψυξη και $344,49 \pm 146,77 \times 10^6$, εύρος τιμών:187-1113, μετά την απόψυξη με $p<0.01$ για τα TNCs και $191,06 \pm 68.94$, εύρος τιμών: 89-458 πριν την κατάψυξη με $158.49 \pm 57.81 \times 10^6$, εύρος τιμών:75-397 μετά την απόψυξη, με $p<0.01$, για τα MNCs).

Το ίδιο παρατηρήθηκε και μετά από 3 έτη κρυοσυντήρησης ($437,22 \pm 150,30 \times 10^6$, εύρος τιμών:292-801 πριν την κατάψυξη και $315,44 \pm 131,23 \times 10^6$, εύρος τιμών:194-801, μετά την απόψυξη, $p<0.01$ για τα TNCs και $199 \pm 76,97 \times 10^6$, εύρος τιμών :101-380 πριν την κατάψυξη με

142,11±56,35x10⁶, εύρος τιμών :75-285 μετά την κατάψυξη με $p<0,01$ για τα MNCs) (Πίναξ 1).

Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές των CD34⁺ και CD133⁺ παρατηρήθηκαν μετά από 6 μήνες, 1, 2 και 3 έτη από την κρυοκατάψυξη (Πίνακας 1).

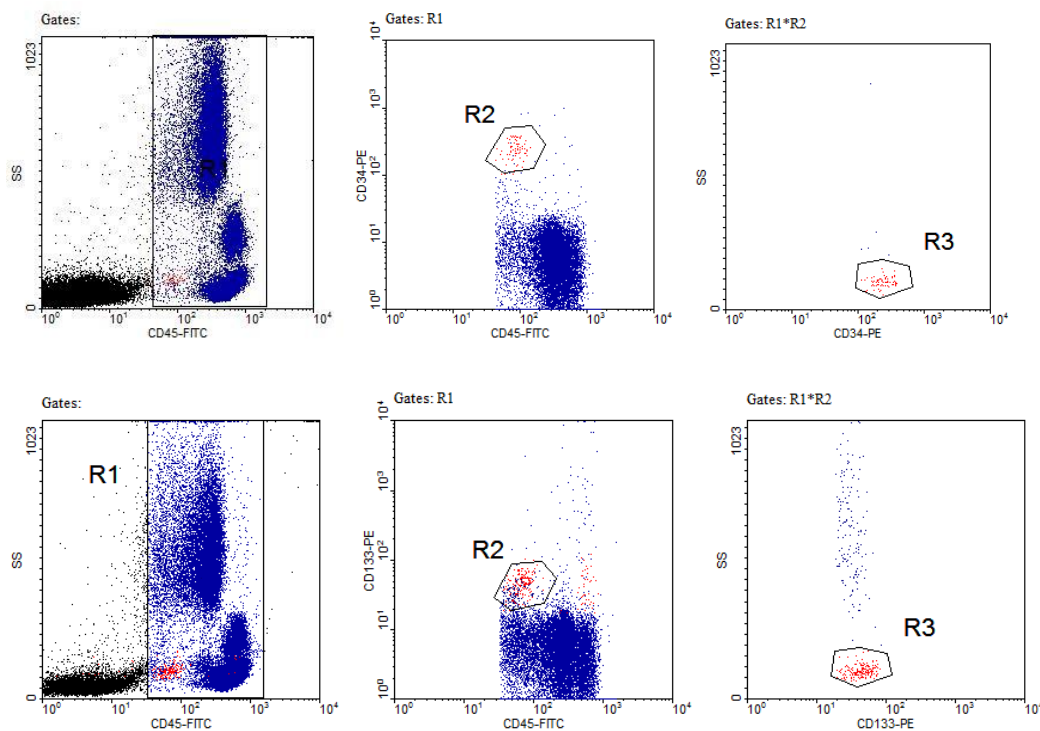
Πίνακας 1. Μετρήσεις των TNC, MNC και CD34⁺ πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη μετά 6 μήνες, 1,2 και 3 έτη αντίστοιχα.

	Πριν την κατάψυξη		Μετά την απόψυξη		n	p
	Mean(±SD)	Range	Mean(±SD)	Range		
TNC/UCB						
[x 10 ⁶]						
6 Μήνες	411,05±209,01	247-1227	320,43 ±186,99	156-1058	21	NS
1 Έτος	473,84±191,70	240-995	377,53±145,58	192-725	19	<0,05
2 Έτη	424,55±174,58	223-1244	344,49±146,77	187-1113	47	<0,01
3 Έτη	437,22±150,30	292-801	315,44±131,23	194-801	18	<0,01
Total	432,94±182,58	223-1244	350,49±159,78	156-1113	105	<0,01
MNC/UCB						
[x 10 ⁶]						
6 Μήνες	191,10 ±102,69	73-524	160,48±98,95	73-524	21	NS
1 Έτος	234,84±85,80	139-481	186±60,20	109-364	19	<0,03
2 Έτη	191,06±68,94	89-458	158,49±57,81	75-397	47	<0,01
3 Έτη	199±76,97	101-380	142,11±56,35	75-286	18	<0,01
Total	200,35±82,80	73-524	161,06±69,51	73-524	105	<0,01
CD34⁺/UCB						
[x 10 ⁶]						
6 Μήνες	0,96±0,95	0,2-4,40	0,94±1,02	0,21-4,30	21	NS
1 Έτος	1,64±1,24	0,3-4,9	1,48±1,10	0,3-4,10	19	NS
2 Έτη	0,95±0,70	0,19-3,44	0,88±0,62	0,18-3,13	47	NS
3 Έτη	1,17±0,76	0,20-3,30	1,04±0,69	0,19-2,90	18	NS
Total	1,12±0,92	0,19-4,90	1,02±0,85	0,18-4,30	105	NS
CD133⁺/UCB						
[x 10 ⁶]						
6 Μήνες	0,70±0,78	0,20-2,50	0,65±0,72	0,20-2,40	21	NS
1 Έτος	0,98±0,71	0,20-2,6	0,87±0,59	0,16-2,20	19	NS
2 Έτη	0,84±0,60	0,17-2,3	0,75±0,54	0,17-2,1	47	NS
3 Έτη	0,73±0,54	0,10-2,10	0,65±0,45	0,11-1,8	18	NS
Total	0,81±0,66	0,17-2,6	0,73±0,57	0,10-2,40	105	NS

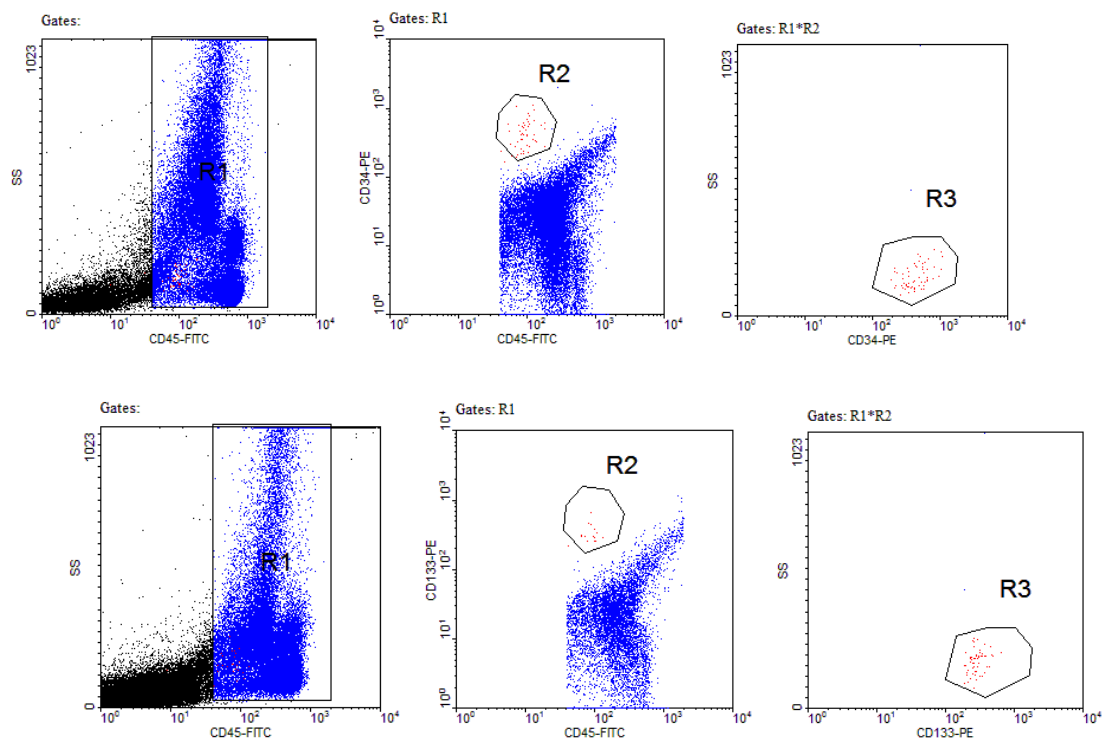
Έτσι, για τους πρώτους 6 μήνες κρυοσυντήρησης, οι μέσες απόλυτες τιμές των CD34⁺ και CD133⁺ πριν την κατάψυξη ήταν 0,96±0,95 x10⁶, (εύρος τιμών:0.2-4.40) για τα CD34⁺ και 0,70±0,78 x10⁶,(εύρος τιμών: 0.20-2.50) για τα CD133⁺ ενώ μετά την απόψυξη ήταν 0,94±1.02 x10⁶, (εύρος τιμών:0.21-4.30, $p=NS$) για τα CD34⁺ και 0,65±0,72 x10⁶, (εύρος τιμών:0.20-2.40,

$p=NS$) για τα CD133⁺, αντίστοιχα. Παράδειγμα κυτταρομετρικής ανάλυσης δείγματος ΟΠ.Α. πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη παρατείνεται στα ιστογράματα της επόμενης εικόνας (**Εικ.8**).

A. Πριν την κρυοκατάψυξη



B. Μετά την απόψυξη



Εικόνα 20

Επίσης, για το πρώτο έτος οι μέσες απόλυτες τιμές των CD34⁺ και CD133⁺ πριν την κατάψυξη ήταν $1.64 \pm 1.24 \times 10^6$, (εύρος τιμών :0.3-4.9) για τα CD34⁺ και $0.98 \pm 0.71 \times 10^6$, (εύρος τιμών : 0.20-2.6) για τα CD133⁺, ενώ μετά την απόψυξη βρέθηκαν να είναι $1.48 \pm 1.10 \times 10^6$, (εύρος τιμών: 0.3-4.10, $p=NS$) για τα CD34⁺ και $0.87 \pm 0.59 \times 10^6$, (εύρος τιμών :0.16-2.20, $p=NS$) για τα CD133⁺, αντίστοιχα.

Όσον αφορά το δεύτερο έτος της κρυοσυντήρησης, οι μέσες απόλυτες τιμές των CD34⁺ και CD133⁺ πριν την κατάψυξη ήταν για τα CD34⁺ $0.95 \pm 0.70 \times 10^6$, (εύρος τιμών :0.19-3.44) και για τα CD34⁺ $0.84 \pm 0.60 \times 10^6$, (εύρος τιμών : 0.17-2.3), όταν μετά την κατάψυξη ήταν $0.88 \pm 0.62 \times 10^6$, (εύρος τιμών : 0.18-3.13, $p=NS$) για τα CD34⁺ και $0.75 \pm 0.54 \times 10^6$, (εύρος τιμών :0.17-2.10, $p=NS$) για τα CD133⁺, αντίστοιχα.

Τέλος, για το τρίτο έτος της κρυοσυντήρησης, οι μέσες απόλυτες τιμές των CD34⁺ και CD133⁺ πριν την κατάψυξη ήταν για τα CD34⁺ $1.17 \pm 0.76 \times 10^6$ (εύρος τιμών : 0.20-3.30) και $0.73 \pm 0.54 \times 10^6$, (εύρος τιμών :0.10-2.10, $p=NS$) για τα CD133⁺, με τις αντίστοιχες τιμές μετά την απόψυξη να είναι) για τα CD34⁺ $1.04 \pm 0.69 \times 10^6$ (εύρος τιμών : 0.19-2.90,) και 0.65 ± 0.45 (εύρος τιμών : 0.11-1.8, $p=NS$), για τα CD133⁺, αντίστοιχα.

4.3. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στην ανάκτηση (recovery) των κυττάρων (TNC, MNC, CD34⁺ and CD133⁺)

Τα αποτελέσματα της εκατοστιαίας (%) ανάκτησης και κυτταρικών απωλειών των TNC, MNC, CD34⁺ και CD133⁺ του συνολικού αριθμού (n=105) των μονάδων που υπέστησαν επεξεργασία, συνοψίζονται στους **Πίνακες 2 και 3.**

Η εκατοστιαία ανάκτηση (recovery) των TNCs μετά την απόψυξη έφτασε και το 100%. Η μέση TNC εκατοστιαία ανάκτηση μετά κρυοσυντήρηση 6 μηνών ήταν $76,75 \pm 15,80$, (εύρος τιμών:51,15-100), μετά από 1 έτος $82,00 \pm 16,04$, (εύρος τιμών:40,30-100,) μετά από 2 έτη $82,36 \pm 13,76$, (εύρος τιμών:50,99-100) και μετά από 3 έτη $72,50 \pm 14,87$, (εύρος τιμών :34,46-100)

με συνολική μέση TNC εκατοστιαία ανάκτηση – για τις τρεις περιόδους κρυοσυντήρησης- $79,48 \pm 15,29$, (εύρος τιμών: 34,46-100).

Πίνακας 2. Εκατοστιαία(%) ανάκτηση (recovery) των καταψυγμένων κυττάρων (TNC, MNC και CD34⁺) μετά την απόψυξη.

	<u>Mean±SD</u>	<u>Range</u>	<u>n</u>
TNC% ανάκτηση			
6 Μήνες	76,75± 15,80	51,15-100	21
1 Έτος	82,00±16,04	40,30-100	19
2 Έτη	82,36±13,76	50,99-100	47
3 Έτη	72,50±14,87	34,46-100	18
Total	79,48±15,29	34,46-100	105
MNC%recovery			
6 Μήνες	84,17±16,61	51,57-100	21
1 Έτος	82,02±17,48	50,94-100	19
2 Έτη	83,83±12,19	51,26-100	47
3 Έτη	72,26±11,81	53,23-100	18
Total	81,59±14,81	50,94-100	105
CD34⁺%recovery			
6 Μήνες	94,38±19,08	51,14-137,50	21
1 Έτος	90±7,09	80,10-100	19
2 Έτη	92,76±6,13	69,88-100	47
3 Έτη	92,28±7,02	77,78-100	18
Total	91,98±10,76	51,14-137,50	105
CD133⁺%recovery			
6 Μήνες	95,77±4,22	85-100	21
1 Έτος	91,06±8,15	80-100	19
2 Έτη	96,64±4,56	84,17-100	47
3 Έτη	92,68±7,02	77,78-100	18
Total	93,68±6,78	77,78-100	105

Οι αντίστοιχες τιμές εκατοστιαίας ανάκτησης για τα MNCs μετά κρυοσυντήρηση 6 μηνών ήταν $84,17 \pm 16,61$, (εύρος τιμών : $51,57-100$) , μετά από 1 έτος $82,02 \pm 17,48$, (εύρος τιμών : $50,94-100$) μετά από 2 έτη $83,83 \pm 12,19$, (εύρος τιμών : $51,26-100$) και μετά από 3 έτη $72,26 \pm 11,81$, (εύρος τιμών : $53,23-100$) με συνολική μέση τιμή TNC εκατοστιαίας ανάκτησης – και για τις τρεις περιόδους κρυοσυντήρησης- $81,59 \pm 14,81$, (εύρος τιμών : $50,94-100$).

Η εκατοστιαία ανάκτηση των CD34⁺ και των CD133⁺ υπολογίστηκε επίσης. Μετά από 6 μήνες κρυοσυντήρηση η μέση εκατοστιαία ανάκτηση ήταν 93,38±19,08, (εύρος τιμών :51,14-137,50) και 95,77±4,22, (εύρος τιμών : 85-100) για τα CD34⁺ και τα CD133⁺ αντίστοιχα. Μετά από 1 έτος κρυοσυντήρηση η μέση εκατοστιαία ανάκτηση ήταν 90±7,09, (εύρος τιμών :80,10-100) για τα CD34⁺ και 91,06±8,15, (εύρος τιμών : 80-100) για τα CD133⁺, ενώ μετά 2 έτη η μέση εκατοστιαία ανάκτηση ήταν 92,76±6,13, (εύρος τιμών :69,88-100) για τα CD34⁺ και 96,64±4,56, (εύρος τιμών : 84,17-100) για τα CD133⁺ αντίστοιχα . Τέλος, μετά από 3 έτη κρυοσυντήρησης η μέση εκατοστιαία ανάκτηση ήταν 92,28±7,02, (εύρος τιμών : 77,78-100) για τα CD34⁺ και 92,68±7,02, (εύρος τιμών : 77,78-100) για τα CD133⁺ αντίστοιχα με μέση ολική εκατοστιαία ανάκτηση 91,98±10,76, (εύρος τιμών :51,14-137,5) και 93,68±6,78, (εύρος τιμών :77,78-100) για τα CD34⁺ και τα CD133⁺ αντίστοιχα, μετά την απόψυξη.

Όσον αφορά το εκτιμώμενο εκατοστιαίο ποσοστό απωλειών κυττάρων, στους αριθμούς των TNC και CD34⁺, αυτές δεν ξεπέρασαν το 28% για όλες τις χρονικές περιόδους κρυοσυντήρησης (**Πίνακας 3**)

Πίνακας 3. Συγκριτικές % απώλειες κρυοσυντηρημένων κυττάρων (TNC και CD34⁺) πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη .

	Mean±SD(%)	n
TNC		
6 μήνες	22.05±7.51	21
1έτος	21.33±7.9	19
2έτη	22.10±7.2	47
3έτη	27.85±7.5	18
Total	21.31±3.18	105
CD34⁺		
6 μήνες	2.08±1.55	21
1έτος	8.76±1.29	19
2έτη	8.34±3.22	47
3έτη	11.11±1.39	18
Total	8.93±1.19	105

4.4. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στην βιωσιμότητα (viability) των κυττάρων

Η σχετική εκατοστιαία βιωσιμότητα των TNC και CD34⁺ πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη φαίνεται στον **Πίνακα 4**. Οι διαφορές στην βιωσιμότητα των TNC πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη ήταν στατιστικά σημαντικές, για κάθε χρονική διάρκεια συντήρησης.

Πίνακας 4. Σχετική %βιωσιμότητα των TNC και CD34+ πριν την κρυοκατάψυξη και μετά την απόψυξη. Η βιωσιμότητα των TNC και CD34+ που εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας 7-amino-actinomycin (7-AAD).

	<u>Πριν την κατάψυξη</u>		<u>Μετά την απόψυξη</u>		n	p
	<u>Mean±SD</u>	<u>Range</u>	<u>Mean±SD</u>	<u>Range</u>		
TNC% viability						
6 Μήνες	88,72± 7,07	69,93-95,81	83±8,68	14,71-79,74	21	<0,015
1 Έτος	89,61±8,11	69,21-98,49	83,08±9,65	57,37-97,56	19	<0,017
2 Έτη	89,33±6,94	70,96-97,55	81,72±11,05	57,18-99,90	47	<0,001
3 Έτη	93,43±4,49	85,19-99,81	83,26±13,37	41,76-97,67	18	<0,001
Total	89,96±7,03	69,21-99,90	83,53±10,13	41,76-99,90	105	<0,001
CD34+%viability						
6 Μήνες	95,11 ±6,63	75,22-99,61	96,20± 3,80	85,95-100	21	NS
1 Έτος	98,38±2,77	87,48-100	96,73±3,46	85,08-100	19	NS
2 Έτη	98,31±2,44	84,85-100	95,10±4,63	84,12-100	47	NS
3 Έτη	98,42±1,81	94,48-100	96,93±3,68	87,90-100	18	NS
Total	97,44±3,84	75,22-100	96,90±3,10	85,07--100	105	NS

Πιο συγκεκριμένα, μετά από 6 μήνες κρυοσυντήρησης η εκατοστιαία βιωσιμότητα των TNCs μειώθηκε από $88,72 \pm 7,07$, (εύρος τιμών: $69,93-95,81$) πριν την κατάψυξη σε $83 \pm 8,68$, (εύρος τιμών: $63,53-98,30$) μετά την απόψυξη, ($p < 0,015$). Παρόμοιες διαφορές παρατηρήθηκαν μετά από 1 και 2 έτη διάρκειας της κατάψυξης με την εκατοστιαία βιωσιμότητα των TNCs να μειώνεται αφενός μεν για το πρώτο έτος σε $83,08 \pm 9,65$, (εύρος τιμών: $57,37-97,56$) μετά την απόψυξη από $89,61 \pm 8,11$, (εύρος τιμών: $69,21-98,49$), πριν την κατάψυξη, ($p < 0,017$), αφετέρου δε για το δεύτερο έτος σε $81,72 \pm 11,05$, (εύρος τιμών: $57,18-99,90$) από $89,33 \pm 6,94,9$ (εύρος τιμών: $70,96-97,55$) πριν την κρυοκατάψυξη, ($p < 0,001$).

Επίσης, μετά από 3 έτη κρυοσυντήρησης, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των TNCs μειώθηκε από $93,43 \pm 4,49$ (εύρος τιμών: $85,19-99,81$) πριν την κατάψυξη σε $83,26 \pm 13,37$, (εύρος τιμών: $41,76-97,67$) μετά την απόψυξη ($p < 0,001$).

Όσον αφορά την μέση ολική εκατοστιαία βιωσιμότητα των TNCs για όλες τις χρονικές περιόδους της κρυοσυντήρησης, αυτή μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά από $89,96 \pm 7,03$, (εύρος τιμών: $69,21-99,90$) πριν την κατάψυξη σε $83,53 \pm 10,13$, (εύρος τιμών: $41,76-99,90$) μετά την απόψυξη, ($p < 0,001$).

Μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην εκατοστιαία βιωσιμότητα (viability) των CD34⁺ πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη.

Μετά από 6 μήνες κρυοσυντήρησης η εκατοστιαία μέση βιωσιμότητα για τα CD34⁺ μετά την απόψυξη ήταν $96,20 \pm 3,80$, (εύρος τιμών: 85,95-100) με την αντίστοιχη τιμή της εκατοστιαία μέσης βιωσιμότητας πριν την κατάψυξη $95,11 \pm 6,63$, (εύρος τιμών: 75,22-99,61, $p=NS$). Στον ένα χρόνο κρυοσυντήρησης, η εκατοστιαία μέση βιωσιμότητα για τα CD34⁺ μετά την απόψυξη ήταν $97,09 \pm 3,33$, (εύρος τιμών: 85,08-100) όταν πριν την κρυοσυντήρηση ήταν $98,38 \pm 2,77$, (εύρος τιμών: 87,48-100, $p=NS$), στα δύο χρόνια κρυοσυντήρησης ήταν $95,10 \pm 4,63$ (εύρος τιμών: 84,12-100) όταν πριν την κατάψυξη ήταν $98,31 \pm 2,44$ (εύρος τιμών: 84,85-100, $p=NS$) και στα 3 χρόνια ήταν $98,42 \pm 1,81$ (εύρος τιμών: 94,48-100) πριν την κατάψυξη και $96,93 \pm 3,68$ (εύρος τιμών: 87,90-100) μετά την απόψυξη, με την ολική μέση τιμή εκατοστιαίας βιωσιμότητας, ανεξάρτητα από την διάρκεια της κρυοσυντήρησης, να μειώνεται για τα CD34⁺ από $97,44 \pm 3,84$, (εύρος τιμών: 75,22-100) πριν την κρυοσυντήρηση σε $96,90 \pm 3,10$, (εύρος τιμών: 85,07-100, $p=NS$) μετά την απόψυξη. Η σχετική εκατοστιαία βιωσιμότητα, η οποία προκύπτει αν συγκριθούν άμεσα οι εκατοστιαίες ζωτικότητες των TNC και των CD34⁺ πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη, εμφανίζονται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5. Σχετική % βιωσιμότητα κρυοσυντηρημένων κυττάρων (TNC και CD34⁺) πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη .

	<u>Mean±SD(%)</u>	n
TNC% βιωσιμότητα		
6 μήνες	93.55± 2.49	21
1 έτος	92.71±2.56	19
2 έτη	93.06±3.48	47
3 έτη	89.11±10.25	18
Total	92.85±4.31	105
CD34⁺%βιωσιμότητα		
6 μήνες	93.34±3.02	21
1 έτος	94.01±0.76	19
2 έτη	93.82±0.11	47
3 έτη	93.48±1.96	18
Total	93.52±1.34	105

4.5. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στα είδη αποικιών των HSPCs(BFU-E, CFU-GM,

CFU-GEMM)

Η εκατοστιαία ανάκτηση (recovery) όλων των ειδών αποικιών που μετρήθηκαν συνοψίζεται στον **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6. Εκατοστιαία ανάκτηση των ειδών αποικιών (BFU-E,CFU-GM,CFU-GEMM) πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη. Οι αποικίες αριθμήθηκαν μετά από 14 ημέρες επώαση σε κλίβανο με υδρατμούς σε 5% CO₂.

	<u>Mean±SD</u>	<u>Range</u>	<u>n</u>
BFU-E%rec			
6 Μήνες	80,51±12,06	54,65-100	21
1 Έτος	80,1±14	40-100	19
2 Έτη	82,85±7,70	66,67-100	47
3 Έτη	86,06±9,78	61,11-100	18
total	82,43±10,57	40-100	105
CFU-GM% rec			
6 Μήνες	81,41±16,80	52,50-100	21
1 Έτος	83,27±10,86	68-100	19
2 Έτη	83,19±13,30	55,88-100	47
3 Έτη	86,05±12,68	52,38-100	18
Total	83,34±13,66	52,38-100	105
CFU-GEMM% rec			
6 Μήνες	76,47±23,79	25-100	21
1 Έτος	81,24±18,57	33,33-100	19
2 Έτη	81,11±20,18	42,86-100	47
3 Έτη	85,41±14,11	60-100	18
Total	81,13±20,07	25-100	105
CFU-total% rec			
6 Μήνες	79,39±11,74	56,12-100	21
1 Έτη	80,48±7,67	61,54-100	19
2 Έτη	80,66±8,42	63,49-100	47
3 Έτη	84,41±7,99	69,14-100	18
total	81,01±9,14	56,12-100	105

Μετά από 6 μήνες κρυοσυντήρησης η μέση εκατοστιαία ανάκτηση για τα BFU-E (Burst forming units-erythroid) ήταν $80,51 \pm 12,06$,(εύρος τιμών: 54,65-100) για τα CFU-GM $81,41 \pm 16,80$,(εύρος τιμών: 52,50-100) και τα CFU-GEMM $76,47 \pm 23,79$,(εύρος τιμών: 25-100).

Μετα από ένα έτος κρυοσυντήρησης, η μέση εκατοστιαία ανάκτηση των BFU-E ήταν $80,1 \pm 14$, (εύρος τιμών: 40-100), ενώ για τα CFU-GM ήταν $83,27 \pm 10,86$, (εύρος τιμών: 68-100) και για τα CFU-GEMM ήταν $81,24 \pm 18,57$, (εύρος τιμών: 33,33-100), μετά την απόψυξη.

Μετά από 2 έτη κρυοσυντήρησης, η μέση εκατοστιαία ανάκτηση των BFU-E μετά την απόψυξη ήταν $82,85 \pm 7,70$, (εύρος τιμών: 66,67-100) με την μέση εκατοστιαία ανάκτηση των CFU-GM να είναι $83,19 \pm 13,30$, (εύρος τιμών: 55,88-100) και $81,11 \pm 20,18$, (εύρος τιμών: 42,86-100) για τα CFU-GEMM, ενώ μετά 3 έτη κρυοσυντήρησης, η μέση εκατοστιαία ανάκτηση των BFU-E μετά την απόψυξη ήταν $86,06 \pm 9,78$, (εύρος τιμών: 61,11-100), η μέση εκατοστιαία ανάκτηση των CFU-GM $86,05 \pm 12,68$, (εύρος τιμών: 52,38-100) και η μέση εκατοστιαία ανάκτηση των CFU-GEMM ήταν $85,41 \pm 14,11$, (εύρος τιμών: 60-100).

Όσον αφορά την ολική μέση εκατοστιαία ανάκτηση των CFU (για όλες τις κατηγορίες αποικιών), στους 6 μήνες κρυοσυντήρησης ήταν $79,39 \pm 11,74$, (εύρος τιμών: 56,12-100) μετά την απόψυξη ενώ μετά 1 έτος κρυοσυντήρησης ήταν $80,48 \pm 7,67$, (εύρος τιμών: 61,54-100), 2 έτη μετά ήταν $80,66 \pm 8,42$, (εύρος τιμών: 63,49-100) και 3 έτη μετά ήταν $81,01 \pm 9,14$, (εύρος τιμών: 56,12-100). Η ολική μέση εκατοστιαία ανάκτηση των BFU-E και για τις τρεις χρονικές κατηγορίες (6mo, 1yr, 2 yrs)-μετά την απόψυξη ήταν $82,43 \pm 10,57$, (εύρος τιμών: 40-100) με την αντίστοιχη τιμή των CFU-GM να είναι $83,34 \pm 13,66$, (εύρος τιμών: 52,38-100), μετά την απόψυξη και $81,13 \pm 20,07$, (εύρος τιμών: 25-100) μετά την απόψυξη για τα CFU-GEMM. Τέλος, η ολική μέση εκατοστιαία CFU ανάκτηση για όλα τα είδη των αποικιών – ανεξαρτήτως της διάρκειας της κρυοσυντήρησης, ήταν $81,01 \pm 9,14$, (εύρος τιμών: 56,12-100).

4.6. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στον αριθμό των αποικιών (CFU-colony forming units) των HSPCs

Ο **Πίνακας 7** παρουσιάζει τις απόλυτες τιμές του αριθμού των αποικιών όλων των ειδών (BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM). Οι αποικίες CFU-E ουσιαστικά δεν εμφανίζονται σε δείγματα κυτταροκαλλιεργειών μετά από 14-16 ημέρες επώασης και έτσι δεν μετρήθηκαν. Μετά 6 μηνών κρυοκατάψυξη ο μέσος απόλυτος αριθμός αποικιών CFU που μετρήθηκαν ήταν $0,63 \pm 0,47$, (εύρος

τιμών: 0,20-1,75) όταν πριν την κρυσυντήρηση ήταν $0,69 \pm 0,46$, (εύρος τιμών: 0,10-1,93, $p=NS$).

Πίνακας 7. Ολικές cfu μετρήσεις πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη. Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σύμφωνα με πρωτόκολλα αναφοράς χρησιμοποιώντας Methylcellulose based medium.

	Πριν την κατάψυξη		Μετά την απόψυξη		n	P
	Mean±SD	Range	Mean±SD	Range		
CFU[x10⁶]						
6 Μήνες	0,69±0,46	0,10-1,93	0,63±0,47	0,20-1,75	21	NS
1 Έτος	0,75±0,36	0,24-1,57	0,73±0,49	0,17-1,74	19	NS
2 Έτη	0,43±0,36	0,05-1,87	0,41±0,28	0,02-1,47	47	NS
3 Έτη	0,75±0,45	0,13-1,65	0,56±0,33	0,13-1,15	18	NS
Total	0,59±0,43	0,05-1,93	0,54±0,40	0,02-1,75	105	NS

Δεν εντοπίστηκε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των απόλυτων τιμών μετρήσεων των αποικιών πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη ύστερα από ένα έτος κρυσυντήρησης με την μέση απόλυτη τιμή CFU να είναι $0,73 \pm 0,49$, (εύρος τιμών: 0,17-1,74) όταν πριν την κατάψυξη, για την ίδια διάρκεια συντήρησης, ήταν, $0,75 \pm 0,36$, (εύρος τιμών: 0,24-1,57, $p=NS$). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και για μεγαλύτερης διάρκειας συντήρηση (2 έτη) σε θερμοκρασίες κρυσυντήρησης με μέση απόλυτη τιμή CFU πριν την κατάψυξη να είναι $0,43 \pm 0,36$, (εύρος τιμών: 0,24-1,57) και μετά την απόψυξη $0,41 \pm 0,28$, (εύρος τιμών: 0,02-1,47 , $p=NS$).

Όταν η διάρκεια κρυσυντήρησης ήταν 3 έτη, τα αποτελέσματα για την μέση απόλυτη τιμή CFU πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη ήταν επίσης συναφείς με την μέση απόλυτη τιμή CFU πριν την κατάψυξη να είναι $0,75 \pm 0,45$, (εύρος τιμών: 0,13-1,65) και μετά την απόψυξη $0,56 \pm 0,33$, (εύρος τιμών: 0,13-1, , $p=NS$). Τέλος, η ολική μέση απόλυτη τιμή CFU και για τις τρεις περιόδους κρυσυντήρησης (6 μήνες, 1,2 και 3 έτη) ήταν $0,59 \pm 0,43$, (εύρος τιμών: 0,05-1,93) πριν την κατάψυξη και $0,54 \pm 0,40$, (εύρος τιμών: 0,02-1,75) μετά την απόψυξη, αντίστοιχα ($p=NS$).

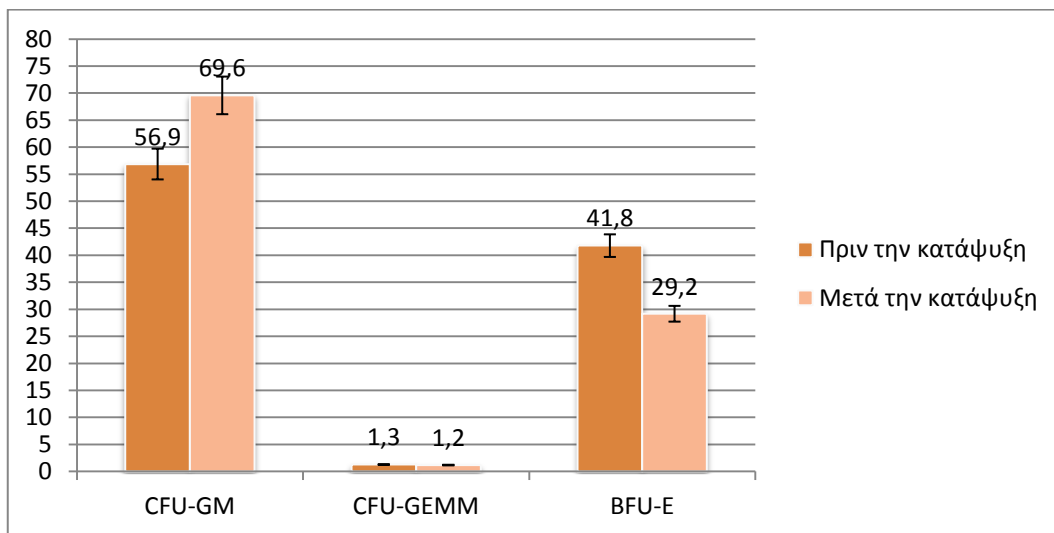
4.7. Επίδραση της κρυοκατάψυξης στην ανακαλλιεργητική ικανότητα των CFU-GEMM

Οι αποικίες CFU-GEMM που ανιχνεύθηκαν σε καλλιέργειες από τα αποψυχθέντα δείγματα ΟΠ.Α, ανεξάρτητα της διάρκειας της (6 μήνες, 1 έτος, 2 και 3 έτη), έδειξαν ανακαλλιεργητική ικανότητα παρόμοια με τα CFU-GEMM που ανακαλλιεργήθηκαν από πρόσφατα δείγματα ΟΠ.Α, πριν την κατάψυξη (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6. Εκατοστιαία αποτελέσματα των μετρήσεων των CFU μετά από CFU-GEMM ανακαλλιέργεια τόσο σε δείγματα πριν την κατάψυξη όσο και σε αποψυχθέντα δείγματα

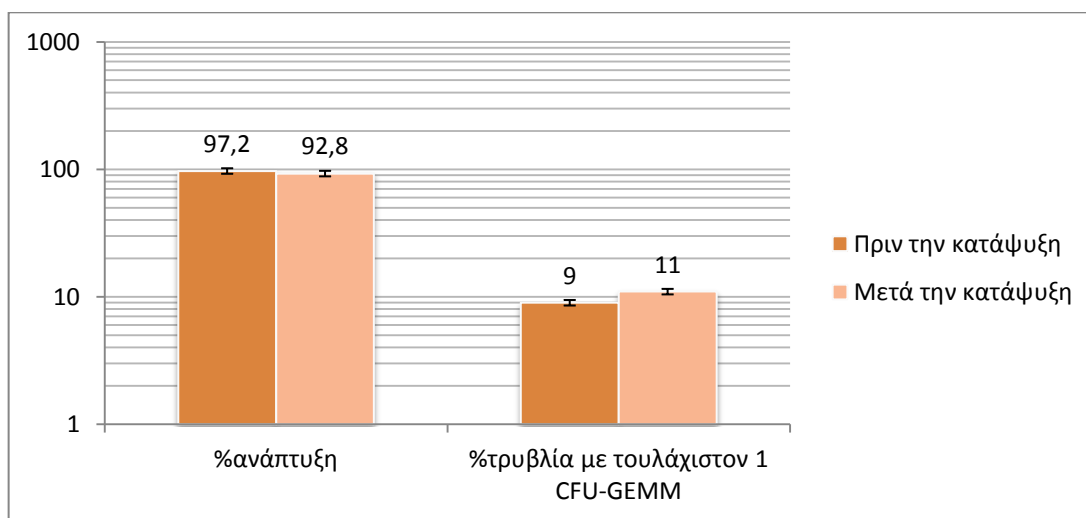
	<u>Fresh CBUs (n=36)</u>	<u>Cryopreserved CBUs (n=28)</u>
%Ανάπτυξη αποικιών από κάθε είδος CFU	97,2%	92,8%
	CFU-GM:56,9%	CFU-GM:69,6 %
%Κατανομή των υποτύπων CFU	CFU-GEMM: 1,3%	CFU-GEMM: 1,2%
	BFU-E: 41,8%	BFU-E: 29,2%
<hr/>		
% ² καλλιέργειες στις οποίες αναπτύχθηκε τουλάχιστον ένα CFU-GEMM	9%	11%

Ειδικότερα, η εκατοστιαία κατανομή των υποτύπων CFU στην ανακαλλιέργεια ήταν, 69,6% CFU-GM, 29,2% BFU-E και 1,2% CFU-GEMM για τα κρυοσυντηρημένα δείγματα (n=28) και 56,8% CFU-GM, 41,8% BFU-E και 1,3% CFU-GEMM για τα πρόσφατα δείγματα πριν την κρυοσυντήρηση (n=36)(**Εικ.13**).



Εικόνα 13

Επίσης, 11% των ανακαλλιεργειών, από κρυοσυντηρημένα CFU-GEMM, περιείχαν τουλάχιστον 1 CFU-GEMM και αντίστοιχα, 9% των ανακαλλιεργειών από πρόσφατα CFU-GEMM περιείχαν 1 CFU-GEMM, επίσης (**Εικ.14**).



Εικόνα 14

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ανακαλλιεργητική ικανότητα των κρυοσυντηρημένων CFU-GEMM είναι παρόμοια με εκείνη των πρόσφατων δειγμάτων πριν την κρυοσυντήρηση και αποδεικνύουν την διατήρηση της ικανότητας της αυτοανανέωσης (self-renewal) των CFU-GEMM έως και μετά 3 έτη στην κρυοσυντήρηση. Τέλος, 92,8% των ανακαλλιεργειών, που ανακαλλιεργήθηκαν από κρυοσυντηρημένα CFU-GEMM, περιείχαν τουλάχιστον 1 αποικία που ήταν ή BFU-E, CFU-GM ή CFU-GEMM (**Εικ.10**). Συγκριτικά, οι

αντίστοιχες τιμές των ανακαλλιεργειών, που ανακαλλιεργήθηκαν από πρόφρατα μη κρυοσυντηρημένα CFU-GEMM, ήταν 97,2%.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαδικασία της κρυοσυντήρησης είναι σημαντική για όλα τα είδη των συλλογών στελεχιαίων κυττάρων, αλλά είναι κρίσιμης σημασίας στην περίπτωση του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Οι μακροχρόνιες επιδράσεις της κρυοσυντήρησης σε θερμοκρασίες υγρού (-196⁰C) και ατμών (-156⁰C) αζώτου επί των στελεχιαίων κυττάρων (HSPCs) του CB, BM (Blood marrow) και MPB (Mobilized Peripheral blood) έχουν διερευνηθεί ως ένα βαθμό από διάφορους ερευνητές, αλλά υπάρχουν λίγες αναφορές που αφορούν τις επιδράσεις της κρυοσυντήρησης σε ηλεκτρικό κρυογονικό καταψύκτη, ανεξάρτητα της θερμοκρασίας ή της διάρκειας της κρυοσυντήρησης, επί της ποιότητας της μονάδας ομφαλοπλακουντιακού αίματος³⁸³⁻⁸⁸.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί κατά πόσον η κρυοσυντήρηση των μονάδων ΟΠΑ επιδρά στις μονάδες ΟΠΑ με τέτοιο τρόπο ώστε να μεταβάλλονται σημαντικά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους, με κυριότερο την πολλαπλασιαστική ικανότητα των HSPCs, και συνεπώς να τίθεται σε αμφιβολία το αποτέλεσμα της μεταμόσχευσης και ακόμη περισσότερο, όταν οι μονάδες ΟΠ.Α. έχουν καταψυχθεί στους - 150⁰C και σε ηλεκτρικό κρυογονικό καταψύκτη.

Με αυτόν τον τρόπο, διερευνήθηκαν διάφορες σημαντικές παραμέτροι αξιολόγησης της μονάδας ΟΠΑ, οι οποίες, εν πολλοίς, είναι εξαιρετικά ενδεικτικές τόσο για την ποιότητα της μονάδας ΟΠΑ, όσο, τελικά, και για το αποτέλεσμα της μεταμόσχευσης.

Αυτή η μελέτη περιελάμβανε in vitro διερεύνηση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) συντηρημένων σε μηχανικό κρυογονικό καταψύκτη σε θερμοκρασία -150⁰C. Αυτή η θερμοκρασία συντήρησης ακολουθεί τις οδηγίες των NetCord-FACT - International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration Cells, 4th Edition (D7.5.1)- για την κρυοσυντήρηση αιμοποιητικών κυττάρων και γενικότερα οι προδιαγραφές του

κρυοκαταψύκτη ακολουθούν τα D8.4, D8.1, D7.5 Standards ³⁸⁹ των ιδίων οδηγιών.

Το σύνολο του εξοπλισμού κρυοσυντήρησης που χρησιμοποιήθηκε στην ΕΛΤΡ.ΟΠ.Α (Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλαουντιακού Αίματος) είναι συνδεδεμένο με σύστημα ηλεκτρονικού ελέγχου. Ο έλεγχος είναι συνεχής και επιτρέπει την μεμακρυσμένη πρόσβαση από σταθμό εργασίας (workstation) που βρίσκεται εντός του GMP εργαστηρίου με αποτέλεσμα να μπορεί να αναληφθεί εγκαίρως δράση για τη διόρθωση τυχόν αστοχίας υλικού που δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε υπερθέρμανση (warming event).

Επίσης, σε περίπτωση θερμικού γεγονότος (warming event) αποστέλλονται αυτόματα προηχογραφημένα μηνύματα, καθώς και μέσω sms και email, σε υπευθύνους του εργαστηρίου.

Οι 105 μονάδες ΟΠΑ που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, επεξεργάστηκαν με τα ίδια ακριβώς πρωτόκολλα κατάψυξης και απόψυξης όπως και οι μονάδες που χρησιμοποιήθηκαν για μεταμόσχευση, σημείο που θεωρήθηκε κριτικής σημασίας για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων γιατί αρκετές μελέτες που χρησιμοποίησαν in vitro τεχνικές οδηγήθηκαν σε αμφίβολα και δύσκολο να ερμηνευθούν αποτελέσματα εξαιτίας της χρήσης όχι πλήρως προτυπωμένων μεθόδων και λόγω αποτυχίας διαχωρισμού των σημαντικών επιδράσεων που οφείλονται στην διαδικασία της επεξεργασίας και της κατάψυξης ^{224,362,385}.

Με σκοπό την αποφυγή περαιτέρω επιδράσεων από άλλους παράγοντες, δεν χρησιμοποιήθηκαν στοιχεία (μετρήσεις κυττάρων, κ.λ.π.) από συνοδά φιαλίδια, που συνδέονται με τις μονάδες ΟΠΑ, γιατί θα υπήρχε το ερώτημα της σωστής αντιπροσώπευσης της κυρίως μονάδας ΟΠΑ από τα στοιχεία του φιαλιδίου ³⁶².

Επειδή υπήρχε η δυνατότητα να γίνουν πολλαπλές απευθείας συγκρίσεις πριν την κατάψυξη καθώς και μετά την απόψυξη έγιναν πολλαπλές μετρήσεις κυττάρων (TNCs CD34⁺, CD133⁺) καθώς και CFU μετρήσεις για την ίδια μονάδα-χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας-και υπολογίστηκε η ανάκτηση για κάθε δείγμα από τις μονάδες ΟΠΑ.

Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψιν ότι, σύμφωνα με διάφορες μελέτες, στελεχιαία κύτταρα που έχουν προέλευση από το μυελό των οστών, και έχουν επίσης επεξεργαστεί και καταψυχθεί σε συνθήκες κρυοσυντήρησης, σε ηλεκτρικό κρυογονικό καταψύκτη, με τον ίδιο τρόπο όπως σε

αυτή τη μελέτη, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων^{225,364-66,384,385}.

Η πιθανή εναλλακτική χρήση ηλεκτρικών κρυογονικών καταψυκτών σε σχέση με τους συμβατικούς υγρού αζώτου ή ατμών αζώτου, για μικρής ή μακράς διάρκειας κρυοκατάψυξης, για την κρυοσυντήρηση στελεχειαίων κυττάρων ΟΠ.Α έχει εξεταστεί σε μικρό αριθμό μελετών^{383,390}, αν και τα στελεχειαία κύτταρα του ΟΠ.Α. έχουν μοναδικά βιολογικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να αποβούν πλεονεκτικά στην περίπτωση της αλλογενούς μεταμόσχευσης. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι αν και 100 ml του ΟΠ.Α. περιέχουν περίπου 1 log λιγότερα ολικά εμπύρηνα κύτταρα (Total nucleated cells-TNC) και CD34⁺ σε σχέση με 1000 ml μυελού των οστών, τα στελεχειαία κύτταρα του ΟΠ.Α. έχουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού^{43,54,93,268,390}, μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής αποικιών^{45,54}, μεγαλύτερη ικανότητα αυτοανανέωσης^{54,93}, μακρύτερα τελομερή¹⁰⁶, βελτιωμένη ικανότητα homing στο μυελό των οστών^{391,392} καθώς και μεγαλύτερη ανταπόκριση στην χρήση αιμοποιητικών παραγόντων ανάπτυξης⁹⁶.

Αυτές οι in vitro ιδιότητες έχουν κλινικά καταδειχθεί από την επιτυχή μεταμόσχευση ΟΠ.Α. σε αιματολογικούς ασθενείς, παρά το γεγονός της έγχυσης του 1/10 του αριθμού στελεχειαίων κυττάρων σε σχέση με την αντίστοιχη έγχυση μυελού των οστών³⁹³⁻⁹⁵.

Από τις διάφορες μεταβλητές που επιδρούν στο αποτέλεσμα μιας μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων που προέρχονται από ΟΠΑ, η δόση των TNC έχει συσχετιστεί περισσότερο με την ταχύτητα εμφύτευσης του μοσχεύματος (engraftment speed) και την επιβίωση του λήπτη^{272,305,312,314,396}. Αν και η συσχέτιση αυτή είναι αρκετά σημαντική, η δόση των TNCs είναι μόνο μια από τις παραμέτρους που μπορούν να εκτιμήσουν την επιτυχία μιας μεταμόσχευσης ΟΠ.Α.-μεταξύ άλλων περιλαμβάνονται: ο ασθενής, η διάγνωση, το στάδιο της νόσου, τα CD34⁺ καθώς και τα CFC (Colony forming cells)²⁶⁶.

Θεωρητικά, τα στελεχειαία κύτταρα που συντηρούνται σε θερμοκρασίες κρυοσυντήρησης θα έπρεπε να μην εμφανίζουν σημεία πτώσης της ποιότητάς τους, στην πραγματικότητα όμως πιθανότατα αυτό δεν ισχύει³⁶².

Σε αυτή τη μελέτη, παρατηρήθηκε ≈81% μέση ανάκτηση(recovery) για τα TNC και ≈83,6

μέση TNC% βιωσιμότητα(viability) μετά την απόψυξη, αποτελέσματα που συμφωνούν και με άλλους ερευνητές ^{238,360,392,397-403}.

Ο Alonso και συν.(St Louis Cord Blood Bank) αφού αξιολόγησαν πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη 25 μονάδες ΟΠ.Α., που διατηρήθηκαν σε κατάψυξη για 48 μήνες κατά μέσο όρο, βρήκαν 81% και 88% μέση εκατοστιαία ανάκτηση (recovery) και βιωσιμότητα (viability), αντίστοιχα. Οι συγγραφείς επισήμαναν ότι τα ουδετερόφιλα που περιλαμβάνονταν στην κατεψυγμένη μονάδα δεν αναμενόταν να επιβιώσουν τον κύκλο κατάψυξης/απόψυξης. Οι μονάδες ΟΠ.Α. χρησιμοποιήθηκαν για μεταμόσχευση στο Cardinal Glennon Children Hospital και εμφύτευση (engraftment) πραγματοποιήθηκε με επιτυχία στους περισσότερους ασθενείς, ακόμη και σε εκείνες τις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των TNC που μεταμοσχεύθηκαν ήταν κατώτερος του προτεινόμενου ορίου ³⁹⁹.

Η στατιστικά σημαντική πτώση των απολύτων τιμών των TNCs και των MNCs καθώς και της βιωσιμότητας τους μετά από 1,2 και 3 έτη σε συνθήκες κρυοσυντήρησης (**Πίνακες 1,4**), σχετίζεται πιθανότατα με την απώλεια των περισσότερων ωρίμων κυττάρων, π.χ. πολυμορφοπυρήνων, τα οποία είναι περισσότερο ευαίσθητα σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες καθώς και οι συνολικές απώλειες από όλες τις κατηγορίες εμπυρήνων κυττάρων εξαιτίας της διαδικασίας κρυοκατάψυξης και απόψυξης ^{397,366,399,238,404-7}.

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, τα πολυμορφοπύρηνα εμφανίζουν αρκετά χαμηλότερη οσμωτική αντοχή ⁴⁰⁴ και ότι τα CD34⁺ κύτταρα είναι περισσότερο ανθεκτικά στην κρυοκατάψυξη σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό εμπύρηνων κυττάρων (TNCs) ²³⁸. Μεταβολές τόσο στο άμεσο περιβάλλον των κυττάρων όσο και χημικές που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της κατάψυξης επηρεάζουν την διαπερατότητα της μεμβράνης με την αυξημένη οσμωτική πίεση να την οδηγεί σε συρρίκνωση που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταβολές όπως κατάρρευση ή απώλεια τμημάτων της μεμβράνης ⁴⁰⁵.

Επίσης, η απώλεια των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να εξηγήσει την μείωση των TNCs και σε αυτή την περίπτωση η ικανότητα εμφύτευσης του μοσχεύματος (engrafting potential) και συνεπώς των μονάδων ΟΠΑ δεν θα έχει επηρεαστεί, τουλάχιστον μερικώς, γιατί η

συγκεκριμένη κατηγορία ωρίμων κυττάρων δεν διαθέτει ικανότητα αυτοανανέωσης (self-renewal ability) ή πολλαπλασιασμού (proliferation) και έτσι δεν επηρεάζει το δυναμικό της μονάδας για επιτυχή μεταμόσχευση^{397,408}.

Όσον αφορά, τέλος, το μέγεθος του εύρους κατανομής σε ορισμένα αποτελέσματα των κυτταρικών μετρήσεων (TNC, MNC, CD34+, CD133+) - όπως φαίνεται από την SD (stand. dev.) και το μεγάλο εύρος τιμών- αυτό, πιθανά, και σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, αντανακλά την βιολογική μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων και των συλλογών CB^{397,406}.

Παρ'όλα αυτά, η αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα καθώς και το δυναμικό εμφύτευσης (engraftment potential) των CD34⁺ κυττάρων του ΟΠ.Α., μπορούν να εξισορροπήσουν αυτά τα μειονεκτήματα που προαναφέρθηκαν σε βαθμό που να επιτρέπει στο ΟΠ.Α. να είναι μια σημαντική πηγή προέλευσης στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση, ακόμη και όταν η ο αριθμός των TNCs στη μονάδα ΟΠ.Α. που μεταμοσχεύεται είναι χαμηλότερος από τον ιδεώδη⁴⁰⁹.

Η έκφραση των κυτταρικών δεικτών επιφανείας στα αιμοποιητικά κύτταρα παρέχει τη μέθοδο για τον χαρακτηρισμό υποπληθυσμών κυττάρων με ξεχωριστές βιολογικές δράσεις.

Η σχέση μεταξύ του φαινοτύπου που προκύπτει από τη χρήση των δεικτών επιφανείας σε αυτούς τους υποπληθυσμούς και της δυνατότητας τους για διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό είναι βασικής σημασίας στον καθορισμό της ιεραρχικής οργάνωσης των κυττάρων που απαρτίζουν το αιμοποιητικό σύστημα του ανθρώπου.

Η ταυτοποίηση και απομόνωση των αιμοποιητικών κυττάρων που εκφράζουν CD34⁺ και CD133⁺, σε συνδυασμό με τη χρήση in vitro και in vivo μεθόδων, έχει αποδώσει τα μέγιστα όσον αφορά την κατανόηση του αιμοποιητικού προγονικού κυττάρου και των στελεχιαίων κυττάρων γενικότερα.

Πρόσφατες έρευνες, όπως και για τις περιπτώσεις του μυελού των οστών όσο και του κινητοποιημένου περιφερικού αίματος, έχουν καταδείξει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CD34⁺ κυττάρων στην μονάδα ΟΠΑ και στον χρόνο που απαιτείται για την πραγματοποίηση της εμφύτευσης (engraftment)⁴¹⁰⁻¹⁵. Σύμφωνα με αρκετούς ερευνητές, ο

προσδιορισμός του αριθμού των CD34⁺ κυττάρων της προς μεταμόσχευση μονάδας ΟΠ.Α. πριν την έγχυση της, μπορεί να προβλέψει τον ρυθμό καθώς και την πιθανότητα αναγέννησης του αιμοποιητικού συστήματος του λήπτη με μεγαλύτερη ασφάλεια σε σχέση με τον αριθμό των TNCs, παρά τα μειονεκτήματα της μεθόδου προσδιορισμού των CD34⁺ ^{238,264,315,397,416-23}.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες στην κατεύθυνση της κατανόησης των πιθανών αιτιών διακύμανσης όσον αφορά την παραπάνω μέθοδο καθώς και στον καθορισμό σταθερών πρότυπων πρακτικών οι οποίες θα οδηγούσαν σε εκμεταλεύσιμα αποτελέσματα από τα μεταμοσχευτικά κέντρα ^{410,424-28}.

Η Ana Flores και συν. αφού ανέλυσαν κατά ζεύγη 50 δείγματα από κρυοσυντηρημένες μονάδες ΟΠ.Α., κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το κρίσιμο σημείο στην μέτρηση των CD34⁺ με την κυτταρομετρία ροής είναι η επίτευξη υψηλού βαθμού επαναληψιμότητας στην αρχική μέτρηση (acquisition) των κυττάρων ⁴¹⁰. Πρότειναν μάλιστα την χρήση μιας έμβιας χρώσης, όπως η 7-aminoactinomycin (7-ADD), ως υποχρεωτική εξέταση στο πρωτόκολλο της μέτρησης των CD34⁺, πράγμα που θα επέτρεπε την ακριβέστερη μέτρηση των έμβιων CD34⁺. Επίσης, επειδή αυτή η μέτρηση λαμβάνει υπόψιν την απώλεια κυττάρων εξαιτίας του κύκλου κατάψυξης/απόψυξης, είναι αντιπροσωπευτική του προϊόντος που μεταμοσχεύεται ^{397,429} με άλλους ερευνητές να έχουν προτείνει παρόμοιες προσεγγίσεις ^{424,425,430}.

Είναι σαφές ότι ο ακριβής καθορισμός του αποπτωτικού πληθυσμού των CD34⁺, βελτιώνει και τη δυνατότητα εκτίμησης της εξέλιξης της μεταμόσχευσης κάνοντας έτσι την μέθοδο αυτή έναν γρήγορο τρόπο επιλογής καταλλήλων μονάδων ΟΠ.Α. για κλινική χρήση από τα μεταμοσχευτικά κέντρα.

Όσον αφορά τον δεύτερο κυτταρικό δείκτη που χρησιμοποιήθηκε, CD133⁺, πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται εκλεκτικά στα CD34^{bright} αιμοποιητικά κύτταρα, στελεχιαία και προγονικά, που προέρχονται από το εμβρυϊκό ήπαρ, το μυελό των οστών και το ΟΠ.Α. Αρκετοί ερευνητές έχουν καταδείξει την παρουσία των AC133⁺ κυττάρων που συνεκφράζουν το CD34⁺, c-kit και άλλους δείκτες επιφανείας με την πλειοψηφία αυτών των εργασιών να καταλήγουν ότι το AC133 παρέχει έναν σημαντικό δείκτη για την ταυτοποίηση

άωρων προγονικών και στελεχειαίων κυττάρων σε *de novo* απομόνωση⁴³¹⁻³⁴, ενώ *in vitro* κλωνογονικές μέθοδοι απέδειξαν ότι ο διπλά θετικός πληθυσμός CD34⁺CD133⁺ από μυελό των οστών ενηλίκου περιέχει την πλειονότητα των CFU-GM.

Ο Yin και συν. ανέφεραν ότι περίπου το 70% των αποικιών που προήλθαν από CD34⁺CD133⁺ πληθυσμό ήταν CFU-GM, ενώ οι περισσότερες (>70%) των αποικιών που προήλθαν από CD34⁺CD133⁻ ήταν BFU-E και CFU-Mix αποικίες. Επίσης, το CD133⁺ αντίσωμα μπορεί να παρέχει έναν εναλλακτικό-αν και όχι απαραίτητα πλεονεκτικότερο- τρόπο, σε σχέση με το CD34⁺, για την επιλογή και τον χαρακτηρισμό των προγονικών κυττάρων που είναι απαραίτητα τόσο για επιτυχημένη εμφύτευση του μοσχεύματος (engraftment), καθώς και για μελέτες *ex vivo* έκπτυξης και για γονιδιακές θεραπείες⁴³³⁻⁴³⁶.

Για τους πρώτους 6 μήνες διάρκεια κρυοσυντήρησης η υπολογισθείσα εκατοστιαία ανάκτηση για τα CD34⁺ κύτταρα ήταν ψηλότερη του 100% (**Πίνακας 2**). Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν επίσης αναφέρει ανακτήσεις των CD34⁺ πάνω από 100% μετά από κρυοσυντήρηση χρησιμοποιώντας ΟΠ.Α^{397,406}.

Αυτή η παρατήρηση που αφορά την αύξηση των CD34⁺ έχει γίνει προσπάθεια να αιτιολογηθεί με μηχανισμούς όπως η θετική ρύθμιση της έκφρασης των CD34⁺ που σχετίζεται με την κατάψυξη και την απόψυξη των μονάδων ΟΠ.Α, πιθανά μέσω του δρόμου της C κινάσης και την χρήση της μεθοδολογίας της διπλής πλατφόρμας (dual platform) για τον προσδιορισμό των CD34⁺ κυττάρων^{397,406,437}.

Εκτός της ανωτέρω παρατήρησης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στους αριθμούς των CD34⁺ και CD133⁺, την εκατοστιαία ανάκτηση και την βιωσιμότητα, ανεξάρτητα από την χρονική έκταση της κρυοκατάψυξης (6 μήνες με 3 έτη) (**Πίνακες 1,2,4**).

Μια άλλη παράμετρος που είναι εξαιρετικά σημαντική στην εκτίμηση του αποτελέσματος μιας μεταμόσχευσης στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων είναι η καταμέτρηση των CFU (Colony Forming Units) που αντιπροσωπεύουν το πληθυσμό των CFC (Colony Forming Cells)^{45,96,266,360,438}.

Στις εικόνες του **παραρτήματος** παρουσιάζονται διάφορα είδη αποικιών όπως

αναπτύσσονται μετά από 14-16 ημέρες επώασης σε ημιστερεό θρεπτικό υλικό μεθυλοκυτταρίνης.

Τα στελεχειαία κύτταρα μονάδας ΟΠ.Α., ακόμη και μετά κρυοκατάψυξη διάρκειας 36 μηνών, επέδειξαν πολλαπλασιαστική ικανότητα, όπως αυτή προσεγγίστηκε με την μέτρηση του αριθμού των αποικιών σε καλλιέργεια, αντίστοιχη με εκείνη στελεχειαίων κυττάρων μονάδας ΟΠ.Α. πριν την κατάψυξη-παρατήρηση που βρίσκεται σε συμφωνία με παρατηρήσεις άλλων ερευνητών^{360,363,366,398,439}.

Αν και υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των TNC τόσο με την ταχύτητα εμφύτευσης (engraftment), των μυελοειδών κυττάρων, όσο και των αιμοπεταλίων, όσο και με την μακρού χρόνου επιβίωση του μοσχεύματος μετά την μεταμόσχευση, η Migliaccio A.R και συν.²⁶⁶, μετά από ανάλυση δεδομένων από 562 ασθενών, ανέφεραν ότι η συσχέτιση μεταξύ της TNC δόσης και του απαιτούμενου χρόνου για να επιτευχθεί εμφύτευση (engraftment) δεν είναι πλέον σημαντική αν χρησιμοποιήσουμε ως παράμετρο εκτίμησης και την CFC δόση και ότι αυτή η τελευταία έχει μεγαλύτερο συντελεστή πρόβλεψης, παρά τους περιορισμούς της μεθόδου.

Ο Larghero και συν.⁴⁴⁰, μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων 34 ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες, που υπέστησαν αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι περισσότερο σημαντικές παράμετροι για την εκτίμηση της πορείας μιας μεταμόσχευσης και της εμφύτευσης (engraftment) του μοσχεύματος ήταν ο υπότυπος κυττάρων CD34(+)CD38(+)HLA-DR(-) καθώς και ο ολικός αριθμός LTC-CFC της έγχυσης. Ακόμη περισσότερο, δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον ολικό απόλυτο αριθμό CFUs (colony forming units) πριν κατάψυξη και μετά την απόψυξη οι δε εκατοστιαίες ανακτήσεις (recovery) όλων των ειδών CFUs ήταν άνω του 80% **(Πίνακες 6,7)**.

Άλλοι ερευνητές που χρησιμοποίησαν ηλεκτρομηχανικούς κρυοκαταψύκτες για την κατάψυξη των στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων, με εκτεταμένο εύρος θερμοκρασιών (-80°C to -135°C) και για διάφορες χρονικές περιόδους, παρουσίασαν ανάλογα αποτελέσματα.

Ο Pascale Halle και συν.²²⁵ ανέφερε 60.8%, 79.6% και 35.6% μέσες ανακτήσεις των TNC, CD34⁺ και CFU-GM αντίστοιχα, μετά την απόψυξη με μέση χρονική διάρκεια 6 εβδομάδες

κρυοσυντήρησης για τα PBPC (Peripheral blood progenitor cells) στους -80°C , σε ηλεκτρικό κρυοκαταψύκτη. Ο Ratajczak και συν.³⁶³ σύγκριναν την βιωσιμότητα, την ανάκτηση και την κλωνογονικότητα (clonogenic capacity) των CD34^{+} προελεύσεως μυελού των οστών, μετά από ένα μήνα προηγηθείσας κρυοσυντήρησης σε υγρό άζωτο στους -196°C ή σε ηλεκτρικό κρυοκαταψύκτη στους -80°C και κατέληξαν σε παρόμοια συμπεράσματα.

Οι Valeri CR και Pivacek LE³⁸⁴, μετά από αξιολόγηση της ανάκτησης και της βιωσιμότητας *in vitro* των κατεψυγμένων PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα PBMCs μπορούν να παραμείνουν σε κατάψυξη στους -135°C σε ασκούς πολυολεφίνης για τουλάχιστον 2,4 έτη. Τέλος, Οι Choi CW και συν.³⁶⁶ ανέφεραν υψηλά επίπεδα ανάκτησης ($>78\%$) για τα MNCs, CFU-GM και τα CD34^{+} μετά από 76 ημέρες μέση διάρκεια παραμονής στην κρυοσυντήρηση στους -80°C .

Επίσης, ερευνητές που χρησιμοποίησαν στις πειραματικές μελέτες τους στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα που βρίσκονταν σε κατάψυξη σε υγρό άζωτο (-196°C) ή σε ατμούς αζώτου (-150°C) και αξιολόγησαν παραμέτρους όπως TNCs, CD34^{+} ή CFCs, έχουν καταλήξει σε παρόμοια συμπεράσματα με εκείνα της παρούσης μελέτης.

Ο Alonso και συν.³⁹⁹ μετά μελέτη 25 αποψυγμένων μονάδων που χρησιμοποιήθηκαν για μεταμόσχευση σε μια περίοδο 4 ετών, ανέφεραν 81% ανάκτηση για TNCs, 88% βιωσιμότητα και 76% ανάκτηση των CFUs, μετά την απόψυξη. Ο Rubinstein και συν.³⁹⁸ ανέφεραν απώλειες 8% στο μέσο αριθμό TNC ανά αποψυγμένο δείγμα, 39% απώλεια στα έμβια TNC και σχετικά μη σημαντικές απώλειες στους αριθμούς CFU, αφού οι μονάδες ΟΠ.Α παρέμειναν τουλάχιστον για 48 ώρες σε υγρό άζωτο. Ο Vincent Laroche και συν.³⁹⁷ ανέφεραν σημαντική πτώση, περίπου 18% στον αριθμό των TNC, μετά την φάση της απόψυξης και του πλυσίματος 10 μονάδων ΟΠ.Α, παρατήρηση που σχετίζεται με πρότυπες διαδικασίες επεξεργασίας μετά την απόψυξη. Οι ίδιοι ερευνητές δεν παρατήρησαν σημαντική διαφορά στον αριθμό των CD34^{+} πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη, αλλά παρατηρήθηκε μια σημαντική πτώση των απόλυτων αριθμών CFU-GM (ανά 10^6 κύτταρα/τρουβλίο) μετά την απόψυξη. Τέλος, ο Broxmeyer και συν.³⁶⁰ δεν ανέφερε στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά από σύγκριση πριν κατάψυξη και μετά την απόψυξη των

TNCs ή των CFU αριθμού αποικιών (CFU-GM,CFU-GEMM και BFU-E), μετά από μακράς διάρκειας κατάψυξη (έως 15 έτη), και ανέφεραν μια μέση εκατοστιαία ανάκτηση 83% για τα TNCs και μια μέση τιμή 84-95% ανάκτηση των CFU μετά την απόψυξη.

Ποιο πρόσφατα, σε κεντρική αναδρομική μελέτη από την Page και συν.⁴⁴¹, εξετάστηκε ένα νέο σύστημα αξιολόγησης των μονάδων ΟΠ.Α. που χρησιμοποιούνται για μεταμόσχευση το οποίο περιλαμβάνει αρκετές παραμέτρους οι οποίες μπορούν να προβλέψουν την επιτυχία της μεταμόσχευσης ΟΠ.Α. Επιπλέον, η ομάδα ανέφερε ισχυρότερη συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων CFCs και της εμφύτευσης του μοσχεύματος (engraftment) μετά την έγχυση, παρά μεταξύ αυτής και του αριθμού των TNCs ⁴⁴².

Τα στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) χαρακτηρίζονται γενικά από σημαντική πολλαπλασιαστική ικανότητα καθώς και, στενά συνδεδεμένη με την πρώτη, ικανότητα αυτοανανέωσης. Η αυτοανανέωση (self-renewal) απαιτεί κυτταρική διαίρεση χωρίς την απώλεια της αωρότητας (stemness) και της πολυδυνάμου ικανότητας (pluripotentiality) σε τουλάχιστον ένα από τα θυγατρικά κύτταρα (ασύμμετρος κυτταρικός πολλαπλασιασμός-asymmetric cell division), ενώ ταυτόχρονα η ανακαλλιέργεια μεμονωμένων αποικιών, ειδικά των CFU-GEMM, φαίνεται ότι προσφέρει μια εκτίμηση της ικανότητας αυτοανανέωσης ^{189,360}. Αν και τα CFU-GEMM πιθανά δεν διαθέτουν την ικανότητα επαναποικισμού (repopulation) του στελεχειαίου κυττάρου, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι ορισμένοι υποπληθυσμοί των CFU-GEMM μπορούν να ταξινομηθούν σε μια κατηγορία περισσότερο ώριμων στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων, παρά σε μια πρώιμη κατηγορία προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων ^{360,383}.

Η παραγωγή από CFU-GEMM, BFU-E και CFU-GM αποικιών από ανακαλλιεργηθέντα CFU-GEMM υποδεικνύει με σαφήνεια την ικανότητα της αυτό-ανανέωσης από τα εν λόγω CFU-GEMM, ικανότητα που χαρακτηρίζει τα στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα ^{92,93,160}.

Στην παρούσα μελέτη, πλάσμα προερχόμενο από τις μονάδες ΟΠ.Α δεν χρησιμοποιήθηκε ούτε κατά την επεξεργασία πριν την κατάψυξη, ούτε μετά την απόψυξη έτσι ώστε να αποφευχθεί πιθανή επίδραση διαφόρων παραγόντων του πλάσματος ^{93,360}. Ακόμα, παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν παράγοντες ανάπτυξης- Epo, SCF, GM-CSF, IL-3- όλες οι μονάδες ΟΠ.Α

καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη. Από τα αποτελέσματα δεν διαφαίνεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ικανότητα ανακαλλιέργειας (replating ability) μεταξύ των CFU-GEMM αποικιών που προέρχονταν από καλλιέργειες στελεχειαίων κυττάρων πριν την κατάψυξη σε σχέση με τις CFU-GEMM αποικίες που προέρχονταν από καλλιέργειες στελεχειαίων κυττάρων μετά την απόψυξη. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο μέγεθος των αποικιών μεταξύ πρωτογενών και δευτερογενών CFU-GEMM πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη.

Οι διαδικασίες κρυοσυντήρησης, εν γένει, για τις μονάδες ΟΠ.Α απαιτούν ελεγχόμενο τρόπο ψύξης που ακολουθείται από τοποθέτηση της μονάδας σε υγρό άζωτο (-196°C) ή σε ατμόσφαιρα αζώτου (-150°C). Όπως όμως έχει τονιστεί από ορισμένους ερευνητές, οι προαναφερθείσες διαδικασίες απαιτούν εξελιγμένα συστήματα παρακολούθησης της θερμοκρασίας του αζώτου σε όλο το περιβάλλον του δοχείου, αρκετά μεγάλο απόθεμα φιαλών αζώτου και συνεπώς αυξημένο κόστος, ειδικά στις αναδυόμενες οικονομικά χώρες^{238,408}.

Η χρήση ηλεκτρομηχανικών καταψυκτών για την συντήρηση των μονάδων ΟΠ.Α σε θερμοκρασίες παραπλήσιες (-150°C) με τη θερμοκρασία των αζώτου είναι μια πιθανή βιώσιμη εναλλακτική λύση, χωρίς τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα ενώ ταυτόχρονα η συντήρηση των μονάδων ΟΠ.Α. σε ηλεκτρομηχανικό κρυοκαταψύκτη βοηθά σημαντικά στην αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων και διασποράς λοιμωδών παραγόντων, γεγονότα που έχουν συσχετιστεί με την κρυοσυντήρηση σε συστήματα αζώτου^{287,288,365,443}. Σε σχέση με την ασφάλεια της κατεψυγμένης μονάδας, η πιθανότητα επιμόλυνσης και διασποράς λοιμωδών παραγόντων μεταξύ κρυοσυντηρούμενων μονάδων ΟΠ.Α., τόσο τοπικά όσο και διεθνώς, θα μπορούσε να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην κλινική πράξη⁴⁴³⁻⁴⁵

Στην παρούσα μελέτη, αν και δεν χρησιμοποιήθηκαν στοιχεία από να αφορούν την πορεία ασθενών μετά την μεταμόσχευση, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι 2 μονάδες ΟΠ.Α. που διατηρήθηκαν σε κρυοσυντήρηση στους -150°C και σε ηλεκτρομηχανικό κρυοκαταψύκτη για χρονικό διάστημα ενός έτους χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία σε μετάμόσχευση στο Νοσοκομείο Παίδων «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ» στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος που αφορούσε την

αντιμετώπιση της β-ομόζυγης θαλασσαιμίας σε παιδιά με την μεταμόσχευση μονάδων ΟΠ.Α. προερχόμενες από συμβατούς συγγενείς δότες⁴⁴⁶.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με τη συγκεκριμένη μελέτη, γίνεται σαφές ότι η κρυοσυντήρηση των μονάδων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και μάλιστα σε ηλεκτρομηχανικό καταψύκτη με θερμοκρασία κατάψυξης -150°C δεν είχε σημαντικές επιπτώσεις τόσο πάνω στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των στελεχιαίων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων όσο και σε διάφορες άλλες, κριτικής σημασίας, στενά συσχετιζόμενες με την προαναφερθείσα ιδιότητα των HSPCs, παραμέτρους που ελέγχουν την ποιότητα των μονάδων ΟΠ.Α, ανεξάρτητα από την διάρκεια της κρυοσυντήρησης.

Οι μεταβολές των ποιοτικών χαρακτηριστικών των μονάδων του ΟΠ.Α. μετά από την κρυοσυντήρησή τους σε ηλεκτρομηχανικό κρυοκαταψύκτη και σε θερμοκρασία -150°C φαίνεται ότι είναι τουλάχιστον συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες επίδρασεις της κρυοκατάψυξης στην ποιότητα των μονάδων ΟΠ.Α. σε περιβάλλον υγρού ή ατμών αζώτου, γεγονός που κάνει την χρήση ηλεκτρομηχανικών κρυοκαταψυκτών για την συντήρηση των μονάδων ΟΠ.Α., με σκοπό την δυνητική επιλογή τους για μεταμόσχευση, μια βιώσιμη εναλλακτική λύση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Οι μονάδες του ΟΠ.Α. (CB) παραμένουν στην κρυοσυντήρηση σε υγρή φάση αζώτου ή ατμούς αζώτου για εβδομάδες έως έτη μέχρι να χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι επιδράσεις της κρυοσυντήρησης σε ηλεκτρομηχανικό κρυοκαταψύκτη στους -150°C πάνω σε κριτικής σημασίας παραμέτρους ποιοτικού ελέγχου των συλλογών ΟΠ.Α., όπως η πολλαπλασιαστική ικανότητα των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (HSPCs) των μονάδων του ΟΠ.Α., με τελικό σκοπό και ύστερα από μελέτη των αποτελεσμάτων, να προσδιοριστεί η πιθανή μεταβολή τόσο της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των προγονικών κυττάρων του Ο.Π.Α όσο και άλλων, στενά συσχετιζόμενων με την παραπάνω ιδιότητα των HSPCs, παραμέτρων ποιοτικού ελέγχου των μονάδων του Ο.Π.Α. και ταυτόχρονα να εξεταστεί η πιθανή χρήση ηλεκτρομηχανικού κρυοκαταψύκτη στους -150°C ως εναλλακτικό μέσο της κρυοσυντήρησης των μονάδων Ο.Π.Α σε υγρή φάση αζώτου ή ατμούς αζώτου .

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Έγινε επεξεργασία 105 μονάδων ΟΠ.Α. σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (6, 12, 24 και 36 μήνες). Από κάθε αποψυγμένη μονάδα ελήφθησαν δείγματα για κυτταρικές μετρήσεις (total nucleated cells-TNCs, mononuclear cells-MNCs, CD34^+ , CD133^+). Επιπρόσθετα, ελέγχθηκε η βιωσιμότητα (viability) των κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής και υπολογίστηκε η εκατοστιαία ανάκτηση (per cent recovery) για κάθε κατηγορία κυττάρων. Τέλος, έγινε υπολογισμός, μετά από μετρήσεις, του απολύτου αριθμού μονάδων παραγωγής αποικιών (colony forming units-CFU) και μελετήθηκε η εκατοστιαία ανάκτηση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων με τη βοήθεια κυτταρικών καλλιιεργειών.

ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ: Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) σε ορισμένες μεταβλητές (TNC, MNC, βιωσιμότητα) όταν εξετάστηκαν σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα κατάψυξης, ενώ άλλες μεταβλητές (CD34^+ , CD133^+ , CFU) παρέμειναν χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p = \text{NS}$) σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα παραμονής στην κρυοσυντήρηση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τόσο η πολλαπλασιαστική ικανότητα των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων του Ο.Π.Α όσο και άλλες, στενά συσχετιζόμενες με την πολλαπλασιαστική ικανότητα, κρίσιμης σημασίας παράμετροι ποιοτικού ελέγχου των μονάδων Ο.Π.Α. παραμένουν σχετικά σταθερές κατά την κρυοσυντήρηση και ότι η χρήση ηλεκτρομηχανικού κρυοκαταψύκτη στους -150°C μπορεί να είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη μακροχρόνια συντήρηση των μονάδων ΟΠ.Α.

Abstract in English

BACKGROUND: Cord blood (CB) units are stored from weeks to years in liquid or vapour phase nitrogen until they are used for transplantation. We examined the effects of cryostorage in a mechanical freezer at -150°C on the proliferative capacity and other critical quality control variables of CB collections and to investigate the possible use of mechanical freezers at -150°C as an alternative to storage in liquid (or vapour) phase nitrogen.

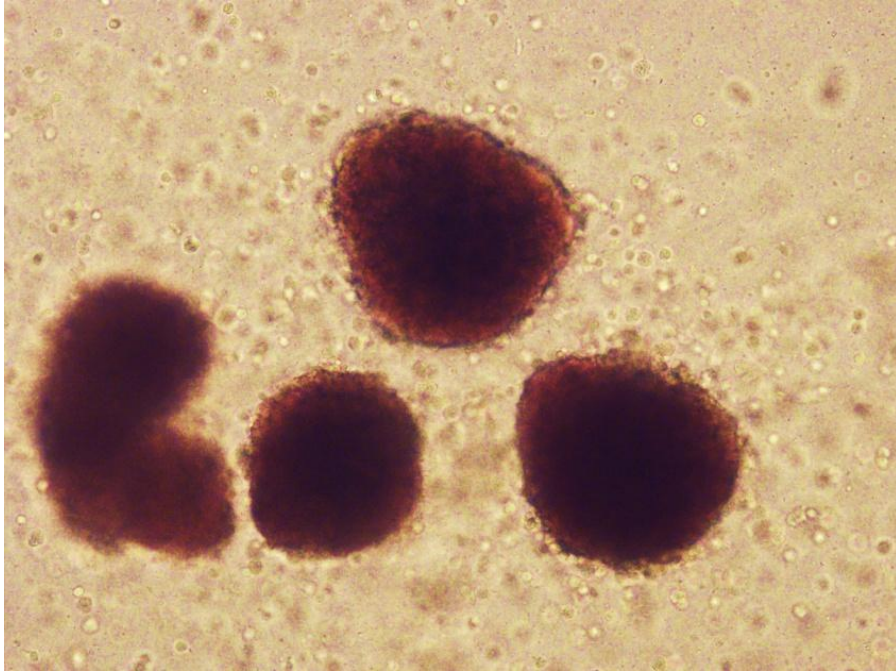
STUDY DESIGN AND METHODS: One-hundred and five cord blood units were thawed and washed at different time intervals (6, 12, 24 and 36 months). For every thawed CB unit, samples were removed and cell enumeration (total nucleated cells-TNCs, mononuclear cells-MNCs, CD34^+ , CD133^+) was performed. In addition, viability was obtained with the use of flow cytometry and recoveries were calculated. Also, total absolute colony forming units (CFU) counts were performed and progenitor cell recoveries were studied by clonogenic assays.

RESULTS: Significant differences ($p < 0.05$) were observed in certain variables (TNC, MNC numbers, viability) when they were examined in relation with time intervals, while others (CD34^+ , CD133^+) were relatively insensitive ($p = \text{NS}$) to the duration of time interval the CB units were kept in cryostorage condition.

CONCLUSIONS: The data presented suggest that cryopreservation of CB units has little if no influence on the extensive proliferative capacity of the hematopoietic progenitor cells of the CB and that mechanical freezers at -150°C may represent an alternative cryostorage condition for CB cryopreservation .

KEY WORDS: Cord blood banking, cryopreservation, mechanical freezers.

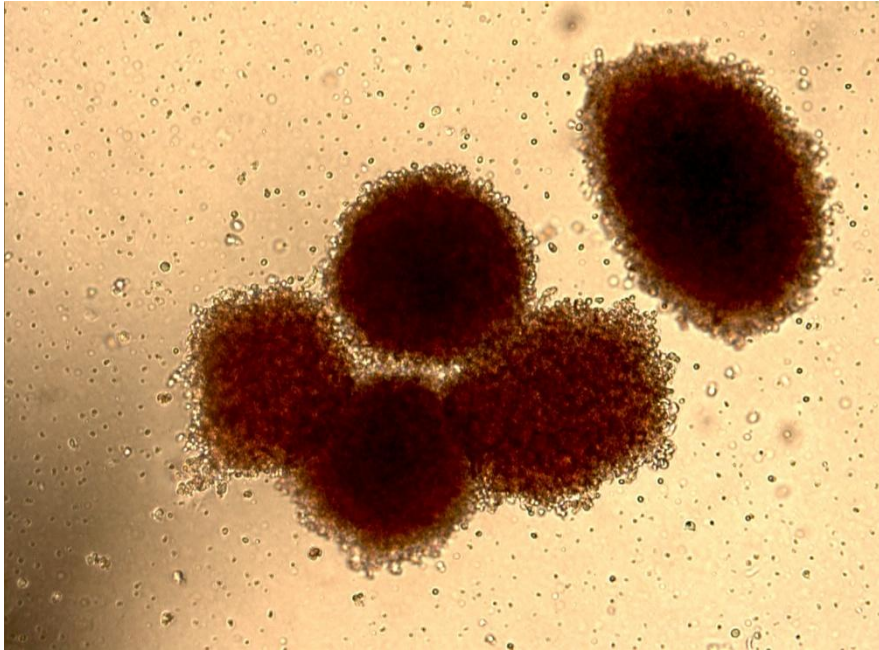
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



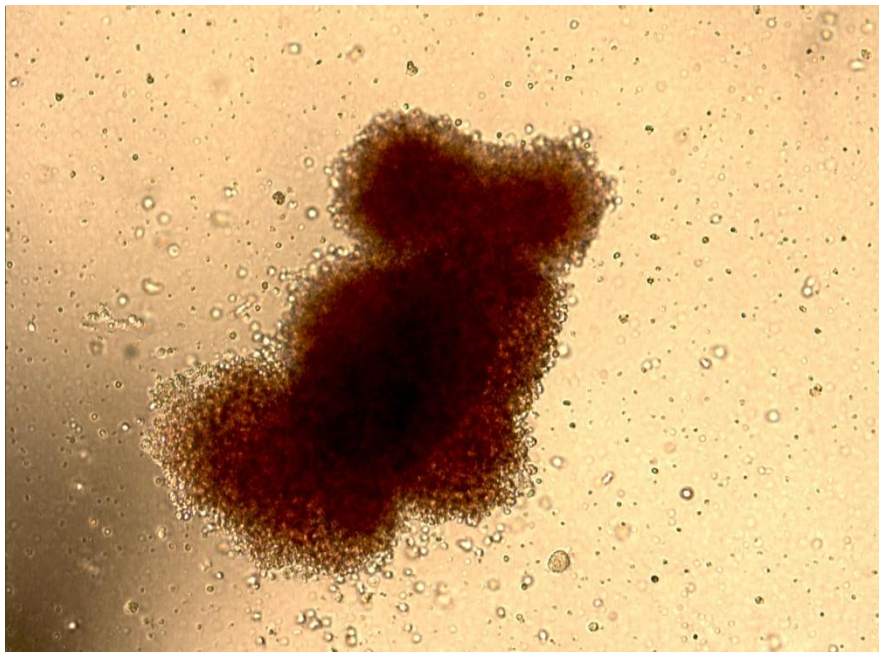
Εικ. 15 (BFU-E)

Εικ.16 (BFU-E)





Еик. 17 (BFU-E)



Еик. 18 (BFU-E)

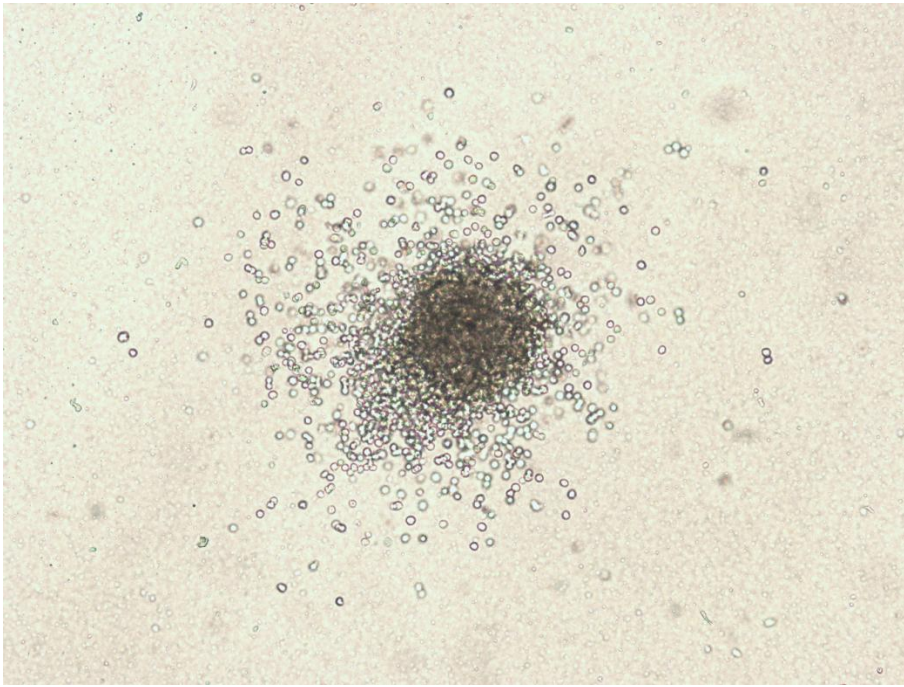


Fig. 19(CFU-GM)

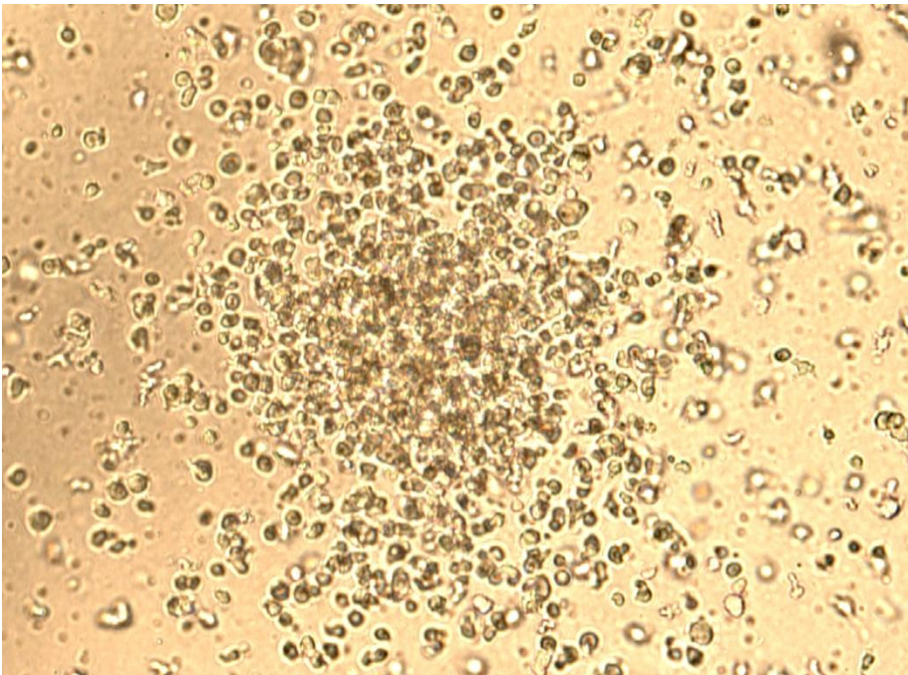
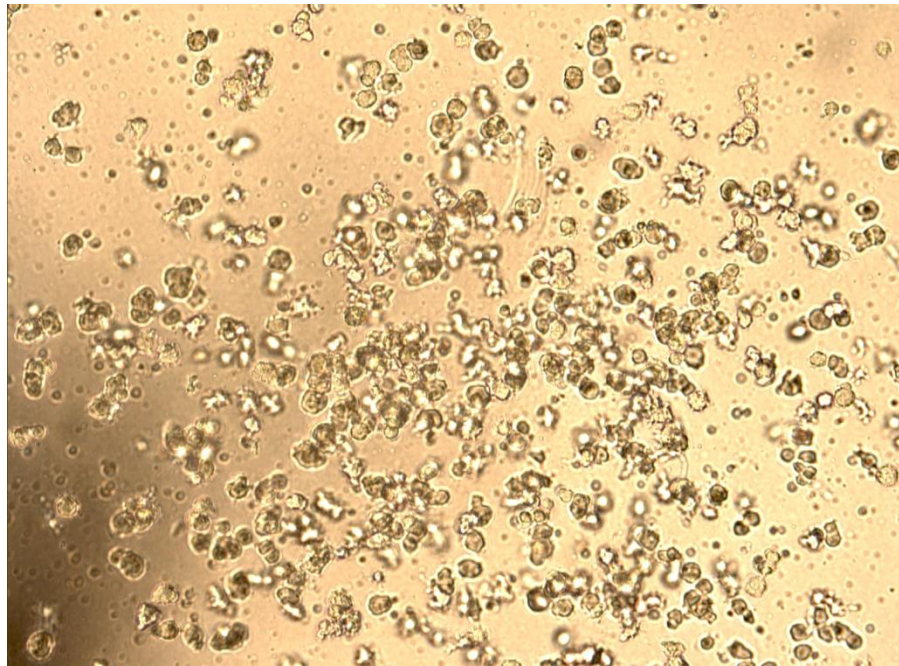
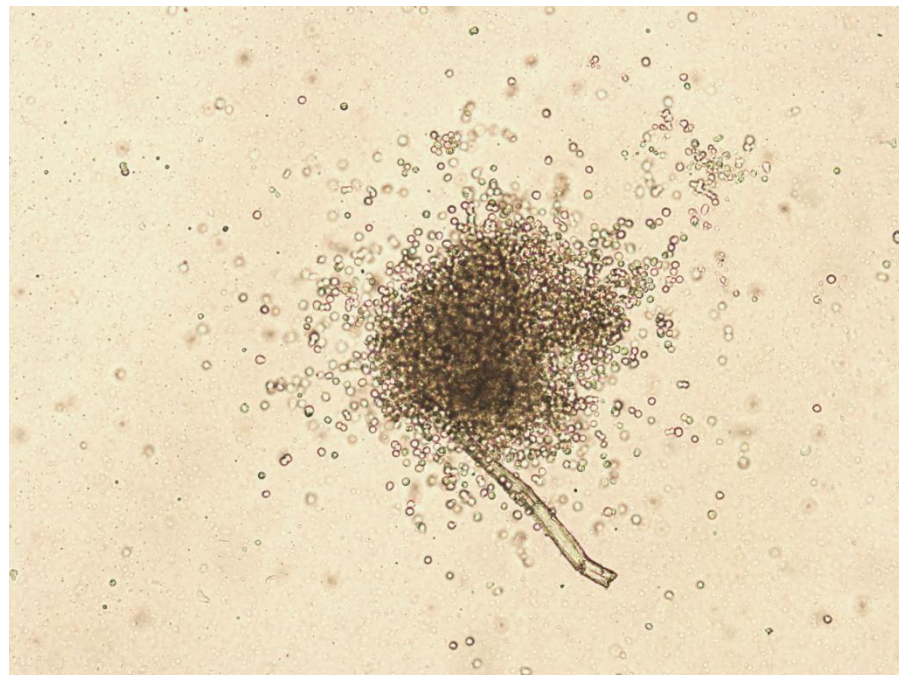


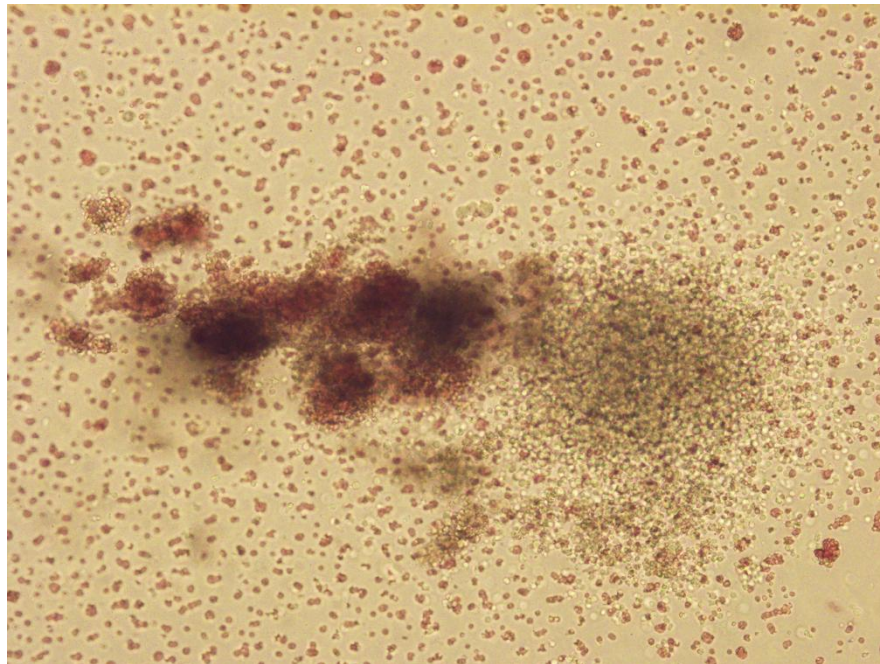
Fig. 20 (CFU-GM)



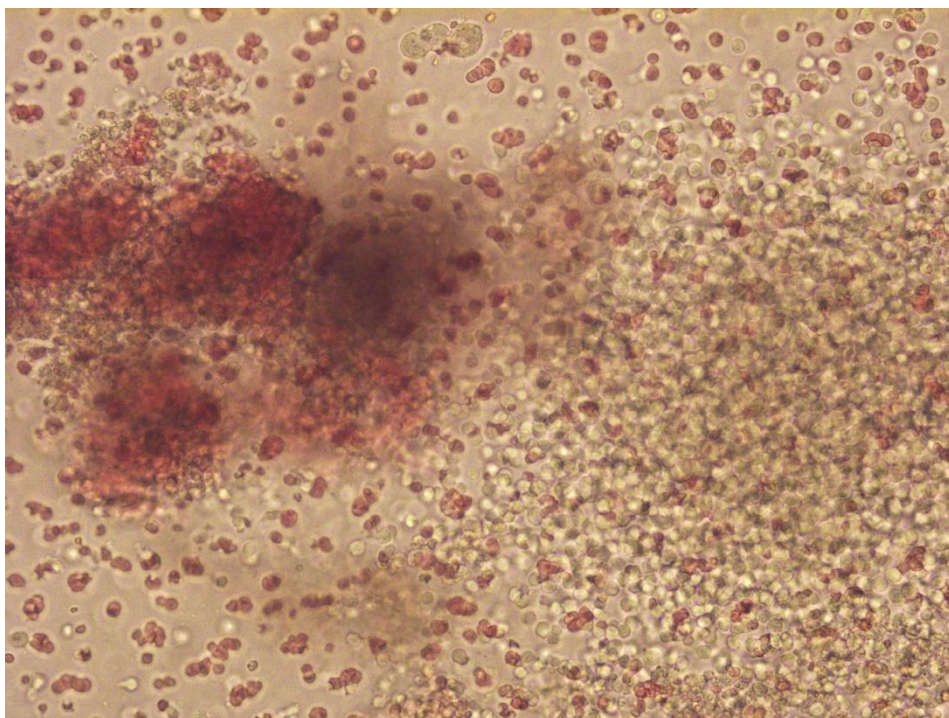
Εικ. 21 (CFU-GM)



Εικ. 22 (CFU-GM) με τμήμα μεθυλλοσελουλόζης



Etik. 23 (CFU-GEMM)



Etik. 24 (CFU-GEMM)

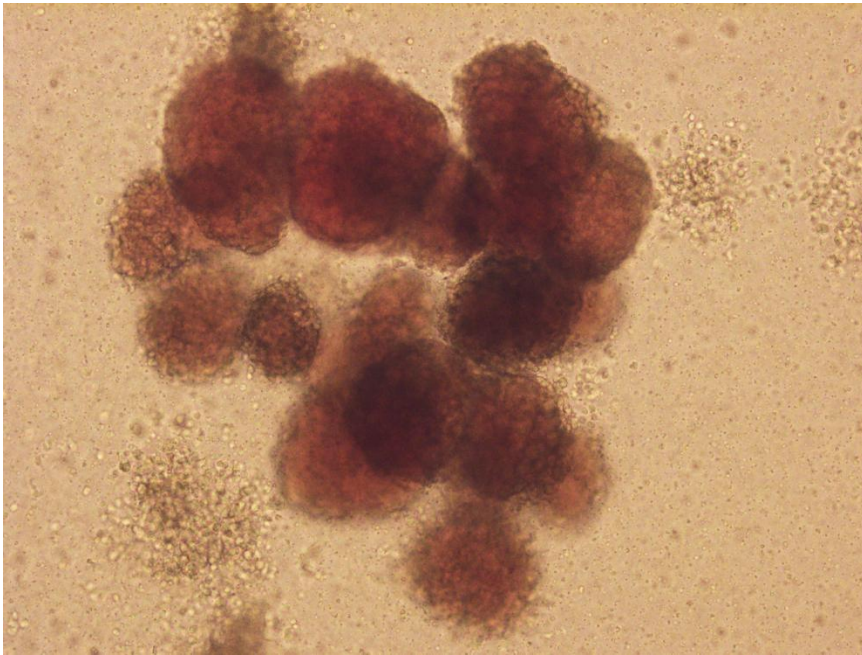


Fig. 25 (CFU-GEMM)

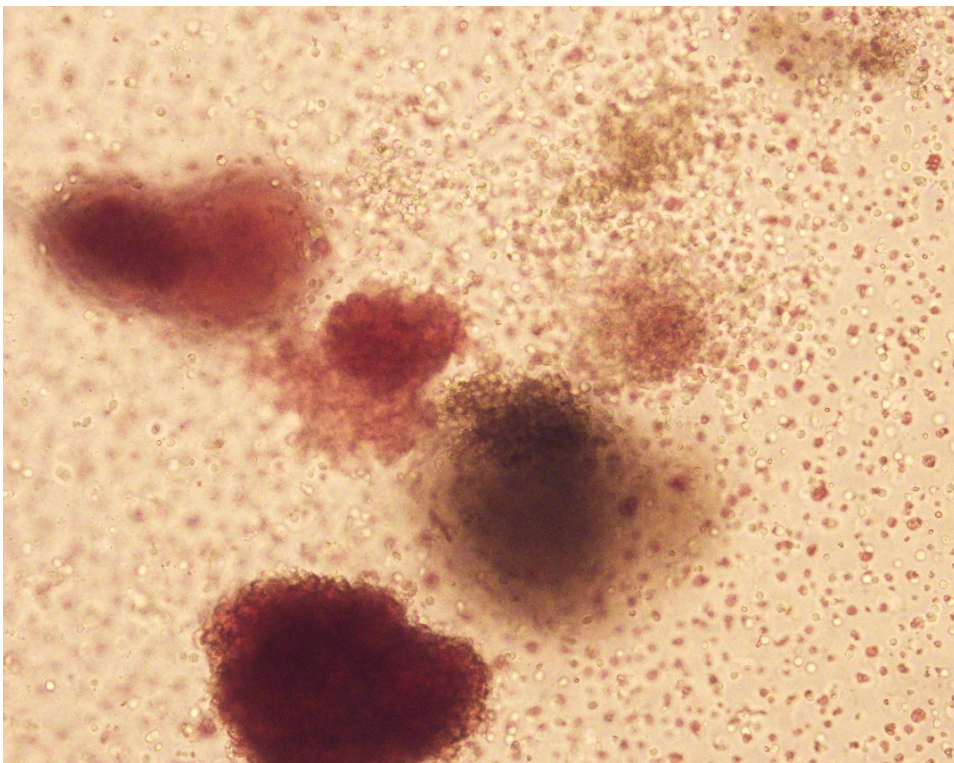


Fig. 26 (CFU-GEMM)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swieegiel, J.J., Marshall, V.S. and Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282, 1145-1147.
2. Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., and Rossant, J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990; 110, 815-821.
3. Wiles, M.V., and Johansson, B.M. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp. Cell Res.*1999; 247, 241-248.
4. Roach, M.L., Stock, J.L., Byrum, R., Koller, B.H. and Mc Neish, J.D. A new embryonic stem cell line from DBA/1lacJ allow genetic modification in a murine model of human inflammation. *Exp. Cell Res.* 1995, 221, 520-525.
5. Jones, E.A., Tosh, D., Wilson, D.I., Lindsay, S. and Forrester, L.M. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp. Cell. Res.*2002; 272, 15-22.
6. Vittel, D., Prandini, M.H., Berthier, R., Schweitzer, A., Martin-Sisteron, H., Uzan, G. and Dejana, E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 1996; 88, 3424-3431.
7. Balconi, G., Spagnuolo, R., and Dejana, E. (2000) Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: a tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*2000; 20, 1443-1451.
8. Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yuguri, T., Naito, M. and Nakao, K. Flk 1- positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; 408, 92-96.
9. Bותרy, L.D., Bourne, S., Xynos, J.D., Wood, H., Hughes, F.J., Hughes, S.P., Episkopou, V. and Polak, J.M. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng.*2001; 7, 89-99.
10. Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R. and Gearhart, J.D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured primordial germ cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; 95, 13726-13731.
11. Shamblott, M.J., Axelman, J., Littlefield, J.W., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Cui, Y., Cheng, L., and Gearhart, J.D. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001; 98, 113-118.
12. Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J. and Thomson, J.A. Clonally derived human embryonic stem cell lines

- maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.*2000; 227, 271-278.
13. Odorico, J.S., Kaufman, D.S. and Thomson, J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19, 193-204.
 14. Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H. and Benvenisty, N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryonic bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.*2000; 6, 88-95.
 15. Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A. and Benvenisty, N. From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived of human embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97, 11307-11312.
 16. Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. and Gepstein, L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*2001; 108, 407-414.
 17. Amit, M. and Itskovitz-Eldor, J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2002; 96, 3399-3405.
 18. Green, R.M. Four moral questions for human embryonic stem cell research. *Wound repair Regen.*2001; 9, 425-428.
 19. Trounson, A.O. The derivation and potential use of human embryonic stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.*2001; 13, 523-532.
 20. Terada, N., Hamazaki, T., Oka M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E. and Scott, E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416, 542-545.
 21. Wurmser, A.E. and Gage, F.H. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 2002; 416, 485-487.
 22. Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P. and Smith, A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416, 545-548.
 23. Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M.G., Bjornson, C., Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M.G., Fiocco, R., Cossu, G. et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nature Neurosci.*2000; 3, 986-991.
 24. Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M. and Krause, D.S. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000a; 31, 235-240.
 25. Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.b., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O. and Krause, D.S. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000b, 32, 11-16.
 26. Hochedlinger, K. and Jaenisch, R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002; 415, 1035-1038.

27. Theise, N.D., and Krause, D.S. (2002) Toward a new paradigm of cell plasticity. *Leukemia* 2002; 16, 542-548.
28. Cognet ,P.A. and Minguell, J.J Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell physiol.*1999; 181, 667-73.
29. Minguell, J.J, Cognet, P. and Erices, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*2000; 33, 881-887.
30. Eglitis, M.A and Mezey, E. (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl acad. Sci. USA* 1997; 94, 4080-4085.
31. Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A. and McKercher, S.R. (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290, 1779-1782.
32. Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A.I. (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995Dec;18(12):1417-26.
33. Prockop, D.j. (1997) Marrow stromal cells as stem cells from nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276, 71-74.
34. Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and Sharkis, S.J. (2001) Multi-organ, multi lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell.*Cell* 2001; 105, 369-377.
35. Thomas, E.D. (1999) Bone marrow transplantation: a review. *Semin.Hematol.*1999; 36,95-103.
36. Bhatia, M., Wang, J.C., Kapp, U., Bonnet, D. and Dick, J.E (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 1997; 94, 5320-5325.
37. Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Dane, A., Gammaitoni, L., Fagioli, F., Perissinotto, E., Cavalloni, G., Kollet, O., Lapidot, T. et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34⁺ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999; 93, 3736-3749.
38. Dorrell,C., Gan, O.I., Preira, D.S., Hawley, R.G. and Dick, J.E. Expansion of human cord blood CD34⁺CD38⁻ cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* 2000; 95, 102-110.
39. Abkowitz, J.L., Golinelli, D., Harrison, D.E. and Gutterg, P. In vivo kinetics of murine hemopoietic stem cells. *Blood* 2000; 96, 3399-3405.

40. Muller-Sieburg, C.E, Cho, R.H., Thoman, M., Adkins, B. and Sieburg, H.B. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 2002; 100, 1779-1309.
41. Huber, T.L., Zhou, Y., Mead, P.E. and Zon, L.I. Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood* 1998; 92, 4128-4137.
42. Knudtson S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974;43:357-361.
43. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 1982;70:1324.
44. Leary AG, Ogawa M. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood* 1987;69:953-956.
45. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828-3832.
46. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution of a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.
47. Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience. *Blood Cells* 1994;20:227-234.
48. Civin CI, Strauss LC, Brovall C et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-165.
49. Civin CI, Loken MR. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *Int J Cell Cloning* 1987;5:1-13.
50. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993;2:137-144.
51. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematother* 1992;1:115-129.
52. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996;87:3828-32.
53. Lu L, Xiao M, Shen RN, et al. Enrichment, characterization and responsiveness of single primitive CD34⁺ human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells with high proliferative and replating potential. *Blood* 1993;81:41-8.

54. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993;178:787-91.
55. Cardoso AA, Li ML, Batard P, et al. Release from quiescence of CD34⁺CD38⁺ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8707-11.
56. Healy L, May G, Gale K et al. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12240-12244.
57. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, et al. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor, a ligand for the tyrosine kinase receptor Flk-1. *Int J Hematol* 1995; 62: 203-15.
58. Kinniburgh D, Russell NH. Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1993;12:489-494.
59. Fritsch G, Stimpfl M, Buchinger P et al. Does cord blood contain enough progenitor cells for transplantation? *J Hematother* 1994;3:291-298.
60. Van Epps DE, Bender J, Lee W et al. Harvesting, characterization, and culture of CD34⁺ cells from human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood Cells* 1994;20:411-423.
61. Sutherland DR, Keating A, Nayar R et al. Sensitive detection and enumeration of CD34⁺ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol* 1994;22:1003-1010.
62. Thilaganathan B, Nicolaidis KH, Morgan G. Subpopulations of CD34-positive haemopoietic progenitors in fetal blood. *Br J Haematol* 1994;87:634-636.
63. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J et al. Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1994;22:215-222.
64. Caux C, Favre C, Saeland S et al. Sequential loss of CD34 and class II MHC antigens on purified cord blood hematopoietic progenitors cultured with IL-3: characterization of CD34⁺,HLA-DR⁺ cells. *Blood* 1989;74:1287-1294.
65. Thoma SJ, Lamping CP, Ziegler BL. Phenotype analysis of hematopoietic CD34⁺ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood* 1994;83:2103-2114.
66. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* 1993;81:3252-3258.
67. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 1993;82:2664-2672.
68. Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994;83:2410-7.

69. Laver JH, Abboud MR, Kawashima I, et al. Characterization of c-kit expression by primitive hematopoietic progenitors in umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1993; 23:1515-9.
70. Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, et al. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing Flt3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 1997;90:111-25.
71. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, et al. Flt-3-ligand stimulates/co-stimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp hematol* 1995;23:1121-9.
72. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, et al. Evaluation of in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1994;22:215-22.
73. Cicuttini FM, Welch KL, Boyd AW. The effect of cytokines in CD34⁺Rh-123^{high} and ^{low} progenitor cells from umbilical cord blood . *Exp Hematol* 1994;22:1244-51.
74. Craig W, Kay R, Cutler RL et al. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993;177:1331-1338. 162 Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor Cells.
75. Rappold I, Ziegler BL, Köhler I et al. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 1997;90:111-125.
76. Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994;83:2410-2417.
77. Yarden Y, Kuang W-J, Yang-Feng T et al. Human protooncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987;6:3341-3348.
78. Geissler EN, Ryan MA, Housman DE. The dominantwhite spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1988;55:185-191.
79. Berardi AC, Wang A, Levine JD et al. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 1995;267:104-108.
80. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN et al. Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990;63:213-224.
81. Anderson DM, Lyman SD, Baird A et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hemopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990;63:235-242.
82. Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine-123. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:990-994.
83. Saeland S, Duvert V, Caux C et al. Distribution of surfacemembranemolecules on bone marrow and cord blood CD34⁺ hematopoietic cells. *Exp Hematol* 1992;20:24-33.

84. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-5.
85. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, et al. Human bone marrow CD34⁺ cells engraft in vivo and undergo multilineage expression including giving rise to CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 1998;26:353-60.
86. Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999;94:2548-54.
87. Ruggieri L, Heimfeld S, Broxmeyer HE. Cytokine-dependent ex vivo expansion of early subsets of CD34⁺ cord blood myeloid progenitors is enhanced by cord blood plasma, but expansion of more matured subsets of progenitors is favored. *Blood Cells* 1994;120:436-54.
88. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, et al. Human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells: Are they the same as their adult bone marrow counterparts? *Blood cells* 1994;20:382-91.
89. Cooper S, Broxmeyer HE. Clonogenic methods in vitro for the enumeration of granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) in human bone marrow and mouse bone marrow and spleen. *J Tissue Culture Methods* 1991; 13: 77-82.
90. Cooper S, Broxmeyer HE. Measurement of interleukin-3 and other hematopoietic growth factors, such as GM-CSF, G-CSF, M-CSF, erythropoietin and the potent co-stimulating cytokines steel factor and Flt-3 ligand. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, et al, eds. *Current protocols in immunology*. Vol 1, Suppl 18. New York: John Wiley and sons, Inc., 1996:6.4.1-6.4.20.
91. Broxmeyer HE. Update: Biomolecule-cell interactions and the regulation of myelopoiesis. In: Murphy MJ Jr, ed. *Concise reviews in clinical and experimental hematology*. Dayton, Ohio: Alpha Med Press, 1987:119-49.
92. Carow CE, Hangoc G, Cooper S, et al. Mast cell growth factor (c-kit ligand) supports the growth of human multipotential (CFU-GEMM) progenitor cells with a high replating potential. *Blood* 1991;78:2216-21.
93. Carow CE, Hangoc G, Broxmeyer HE Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: An effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* 1993;81:942-9.
94. Lu L, Xiao M, Grigsby S, et al. Comparative effects of suppressive cytokines on isolated single CD34⁺⁺⁺ stem/progenitor cells from human bone marrow and umbilical cord blood plated with and without serum. *Exp Hematol* 1993;21:1442-6.
95. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, et al. High efficiency recovery of hematopoietic progenitor cells with extensive proliferative and ex-vivo expansion activity and of hematopoietic stem cells with NOD/SCID mouse repopulation ability from human cord blood stored frozen for 15 years. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;100:645-50.

96. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation of adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4109-13.
97. Hows JM, Bradley BA, Marsh JCW, et al. Growth of human umbilical-cord blood in long term haematopoietic cultures. *Lancet* 1992;340:73-6.
98. Xiao M, Broxmeyer HE, Horie M, et al. Extensive proliferative capacity of single isolated CD34⁺⁺ human cord blood cells in suspension culture. *Blood Cells* 1994; 20:455-67.
99. Smith S, Broxmeyer HE. The influence of oxygen tension on the long term growth in vitro of haematopoietic progenitor cells from human cord blood. *Br J Haematol* 1986; 63: 29-34.
100. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, et al. Rapid exit from G₀/G₁ phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34⁺ cells an enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol* 1994; 22: 1264-72.
101. Moore MAS, Hopkins I. Ex vivo expansions of cord blood derived stem cells and progenitors. *Blood cells* 1994:20:468-81.
102. Bertolini F, Lazzari L, Lauri E, et al. Cord blood plasma-mediated ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:347-53.
103. Piacibello W, Sanavio F, Garretto L, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89:2644-53.
104. Lu L, Ge Y, Li ZH, et al. CD34⁺⁺ stem/progenitor cells purified from cryopreserved normal cord blood can be transduced with high efficiency by a retroviral vector and expanded ex vivo with stable integration and expression of Fancony anemia complementation C gene. *Cell Transplant* 1995;4:493-503.
105. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, et al. A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 1995;86:3745-53.
106. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, et al. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9857-60.
107. Harrison DE, Astle CM. Short- and Long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: Models of human umbilical cord blood. *Blood* 1997;90:174-81.
108. Leitner A, Strobl H, Fischmeister G, et al. Lack of DNA synthesis among CD34⁺ cells in cord blood and in cytokine mobilized blood. *Br J Haematol* 1996;92:255-62.
109. Movassagh M, Caillot L, Baillou C, et al. Optimization of the cycling of clonogenic and primitive cord blood progenitors by various growth factors. *Stem cells* 1997;15:214-22.

110. Brener MK, Rill DR, Holladay MS, et al. Gene marketing to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haematopoiesis in cancer patients. *Lancet* 1993;342:1134-7.
111. Uribe L, Weinberg KI. X-linked SCID and other defects of cytokine pathways. *Semin Hematol* 1998;35:299-309.
112. Barbosa MDFS, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996;382:262-5.
113. Nolte JA, Hanley MB, Koln DB. Sustained Human hematopoiesis in immunodeficient mice by contrasplation of marrow stroma expressing human interleukin-3: Analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood* 1994; 83:3041-51.
114. Arakawa-Hoyt J, Dao MA, Thiemann F, et al. The number and generative capacity of human B lymphocyte progenitors, measured in vitro and in vivo, is higher in umbilical cord blood than in adult or pediatric bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:1167-76.
115. Nolte JA, Dao MA, Wells S, Smogorzewska EM, Kohn D. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2414-9.
116. Schmidt M, Hoffmann G, Wissler M, et al. Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther*. 2001 May 1;12(7):743-9.
117. Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GC, Demengeot J, Gottlieb TM, Mizuta R, Varghese AJ, Alt FW, Jeggo PA, et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell*. 1995 Mar 10;80(5):813-23.
118. Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*. 1992 Feb 28;255(5048):1137-41.
119. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*. 1995 Jan 1;154(1):180-91.
120. Gan OI, Dorrell C, Pereira DS, Ito CY, Wang JC, Dick JE. Characterization and retroviral transduction of an early human lymphomyeloid precursor assayed in nonswitched long-term culture on murine stroma. *Exp Hematol*. 1999 Jun;27(6):1097-106.
121. Larochelle A, Vormoor J, Lapidot T, Sher G, Furukawa T, Li Q, Shultz LD, Olivieri NF, Stamatoyannopoulos G, Dick JE. Engraftment of immune-deficient mice with primitive hematopoietic cells from beta-thalassemia and sickle cell anemia patients: implications for evaluating human gene therapy protocols. *Hum Mol Genet*. 1995 Feb;4(2):163-72.
122. Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL, Hesselton RM, Kittler EL, Tiarks CY, Rao SS, Reilly J, Leif JH, Ramshaw H, Stewart FM, Quesenberry PJ. Improved engraftment of human

- cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1996 Feb;2(1):15-23.
123. Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):3731-40.
124. Dick JE, Bhatia M, Gan O, Kapp U, Wang JC. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells*. 1997;15 Suppl 1:199-203; discussion 204-7. Review.
125. Guenechea G, Gan OI, Dorrell C, Dick JE. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol*. 2001 Jan;2(1):75-82.
126. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1038-45.
127. Dao MA, Arevalo J, Nolta JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):112-8. Epub 2002 Jul 25.
128. Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H, Yee EJ, McCune JM. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med*. 1990 Oct 1;172(4):1055-63.
129. Krowka JF, Sarin S, Namikawa R, McCune JM, Kaneshima H. Human T cells in the SCID-hu mouse are phenotypically normal and functionally competent. *J Immunol*. 1991 Jun 1;146(11):3751-6.
130. Vandekerckhove BA, Namikawa R, Bacchetta R, Roncarolo MG. Human hematopoietic cells and thymic epithelial cells induce tolerance via different mechanisms in the SCID-hu mouse thymus. *J Exp Med*. 1992 Apr 1;175(4):1033-43.
131. Kyoizumi S, Baum CM, Kaneshima H, McCune JM, Yee EJ, Namikawa R. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood*. 1992 Apr 1;79(7):1704-11.
132. Fraser CC, Kaneshima H, Hanstee G, Kilpatrick M, Hoffman R, Chen BP. Human allogeneic stem cell maintenance and differentiation in a long-term multilineage SCID-hu graft. *Blood*. 1995 Sep 1;86(5):1680-93.
133. Kollmann TR, Kim A, Zhuang X, Hachamovitch M, Goldstein H. Reconstitution of SCID mice with human lymphoid and myeloid cells after transplantation with human fetal bone marrow without the requirement for exogenous human cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 16;91(17):8032-6.
134. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):841-6.

135. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size..*Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):836-41.
136. Temple S. Embryonic stem cell self-renewal, analyzed. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):247-8.
137. Kyba M, Daley GQ. Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny. *Exp Hematol*. 2003 Nov;31(11):994-1006. Review.
138. Shaheen M, Broxmeyer HE. The humoral regulation of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz E, Shattil, et al, eds. *Hematology: Basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone, 2004.
139. Broxmeyer HE. Regulation of myelopoiesis as assessed by gene depletion and gene transduction. In: Zon L, ed. *Hematopoiesis, a developmental approach*. New York: Oxford University press, 2001: 247-57.
140. Broxmeyer HE. Regulation of hematopoiesis by chemokine family members. *Int J Hematol*. 2001 Jul;74(1):9-17. Review.
141. Bagby GC Jr, Henrich M. Growth factors, cytokines and the control of hematopoiesis. In: Hoffman R, Shattil S, Furie B, et al, eds. *Hematology: Basic principles and practice*, 3rd ed. New York; Churchill Livingstone, 1999: 154-201.
142. Mantel CR, Gelfano VM, Kim YJ, McDaniel A, Lee Y, Boswell HS, Broxmeyer HE. P21waf-1-Chk1 pathway monitors G1 phase microtubule integrity and is crucial for restriction point transition. *Cell Cycle*. 2002 Sep-Oct;1(5):327-36.
143. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1101-34. Review.
144. Milner LA, Kopan R, Martin DI, Bernstein ID. A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood*. 1994 Apr 15;83(8):2057-62.
145. Milner LA, Bigas A, Kopan R, Brashem-Stein C, Bernstein ID, Martin DI. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):13014-9.
146. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, Brashem-Stein C, Flowers D, Staats S, Moore KA, Le Roux I, Mann R, Gray G, Artavanis-Tsakonas S, Bernstein ID. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood*. 1998 Jun 1;91(11):4084-91.
147. Bigas A, Martin DI, Milner LA. Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol*. 1998 Apr;18(4):2324-33.
148. Li L, Milner LA, Deng Y, Iwata M, Banta A, Graf L, Marcovina S, Friedman C, Trask BJ, Hood L, Torok-Storb B. The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity*. 1998 Jan;8(1):43-55.
149. Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*. 1999 Apr 15;93(8):2431-48. Review.

150. Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3624-35.
151. Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3189-202.
152. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):409-14. Epub 2003 Apr 27.
153. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):448-52. Epub 2003 Apr 27.
154. Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat Med*. 2000 Nov;6(11):1235-40.
155. Stier S, Cheng T, Forkert R, Lutz C, Dombkowski DM, Zhang JL, Scadden DT. Ex vivo targeting of p21Cip1/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1260-6. Epub 2003 Apr 17.
156. Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C, Spiekermann K, Eaves CJ, Coulombel L, Sauvageau G, Hogge DE, Humphries RK. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):862-8.
157. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*. 2002 Apr 5;109(1):39-45.
158. Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*. 2002 Apr 5;109(1):29-37.
159. Krosl J, Austin P, Beslu N, Kroon E, Humphries RK, Sauvageau G. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med*. 2003 Nov;9(11):1428-32. Epub 2003 Oct 26.
160. Krosl J, Beslu N, Mayotte N, Humphries RK, Sauvageau G. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity*. 2003 Apr;18(4):561.
161. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH, Dubart-Kupperschmitt A, Fichelson S. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med*. 2003 Nov;9(11):1423-7. Epub 2003 Oct 26.
162. Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):302-5. Epub 2003 Apr 20.

163. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):255-60. Epub 2003 Apr 20.
164. Ueno H, Sakita-Ishikawa M, Morikawa Y, Nakano T, Kitamura T, Saito M. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*. 2003 May;4(5):457-63. Epub 2003 Mar 31.
165. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003 May 30;113(5):631-42.
166. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003 May 30;113(5):643-55.
167. Cavaleri F, Schöler HR. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell*. 2003 May 30;113(5):551-2. Review.
168. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 1998 Jul 1;12(13):2048-60.
169. Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):2846-51.
170. Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science*. 2001 Dec 21;294(5551):2542-5.
171. Guo Y, Chan R, Ramsey H, Li W, Xie X, Shelley WC, Martinez-Barbera JP, Bort B, Zaret K, Yoder M, Hromas R. The homeoprotein Hex is required for hemangioblast differentiation. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2428-35. Epub 2003 Jun 5.
172. Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, Kano A, Iwamoto Y, Li E, Craft JE, Bothwell AL, Fikrig E, Koni PA, Flavell RA, Fu XY. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):1879-84. Epub 2003 Feb 5.
173. Gotoh A, Takahira H, Mantel C, Litz-Jackson S, Boswell HS, Broxmeyer HE. Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood*. 1996 Jul 1;88(1):138-45.
174. Mack DL, Leibowitz DS, Cooper S, Ramsey H, Broxmeyer HE, Hromas R. Down-regulation of the myeloid homeobox protein Hex is essential for normal T-cell development. *Immunology*. 2002 Dec;107(4):444-51.
175. Zhang S, Fukuda S, Lee Y, Hangoc G, Cooper S, Spolski R, Leonard WJ, Broxmeyer HE. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med*. 2000 Sep 4;192(5):719-28.

176. Kim CH, Hangoc G, Cooper S, Helgason CD, Yew S, Humphries RK, Krystal G, Broxmeyer HE. Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP. *J Clin Invest*. 1999 Dec;104(12):1751-9.
177. Helgason CD, Antonchuk J, Bodner C, Humphries RK. Homeostasis and regeneration of the hematopoietic stem cell pool are altered in SHIP-deficient mice. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3541-7. Epub 2003 Jul 10.
178. Carver-Moore K, Broxmeyer HE, Luoh SM, Cooper S, Peng J, Burstein SA, Moore MW, de Sauvage FJ. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin- and c-mpl-deficient mice. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):803-8.
179. Perlingeiro RC, Kyba M, Bodie S, Daley GQ. A role for thrombopoietin in hemangioblast development. *Stem Cells*. 2003;21(3):272-80.
180. Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J, Lemischka IR, Moore KA, Zanjani ED, Verfaillie CM. Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3441-9.
181. Broxmeyer HE, Bruns HA, Zhang S, Cooper S, Hangoc G, McKenzie AN, Dent AL, Schindler U, Naeger LK, Hoey T, Kaplan MH. Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):815-25.
182. Blumberg H, Conklin D, Xu WF, Grossmann A, Brender T, Carollo S, Eagan M, Foster D, Haldeman BA, Hammond A, Haugen H, Jelinek L, Kelly JD, Madden K, Maurer MF, Parrish-Novak J, Prunkard D, Sexson S, Sprecher C, Waggle K, West J, Whitmore TE, Yao L, Kuechle MK, Dale BA, Chandrasekhar YA. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*. 2001 Jan 12;104(1):9-19.
183. Rich BE, Kupper TS. Cytokines: IL-20 - a new effector in skin inflammation. *Curr Biol*. 2001 Jul 10;11(13):R531-4.
184. Liu L, Ding C, Zeng W, Heuer JG, Tetreault JW, Noblitt TW, Hangoc G, Cooper S, Brune KA, Sharma G, Fox N, Rowlinson SW, Rogers DP, Witcher DR, Lambooy PK, Wroblewski VJ, Miller JR, Broxmeyer HE. Selective enhancement of multipotential hematopoietic progenitors in vitro and in vivo by IL-20. *Blood*. 2003 Nov 1;102(9):3206-9. Epub 2003 Jul 10.
185. Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol*. 2001 Oct 1;167(7):3545-9.
186. Zhao S, Zoller K, Masuko M, Rojnuckarin P, Yang XO, Parganas E, Kaushansky K, Ihle JN, Papayannopoulou T, Willerford DM, Clackson T, Blau CA. JAK2, complemented by a second signal from c-kit or flt-3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hemopoietic cells. *EMBO J*. 2002 May 1;21(9):2159-67.
187. Burns CE, Zon LI. Portrait of a stem cell. *Dev Cell* 2002;3:612-3.
188. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):287-98. Review. No abstract available.

189. Jan YN, Jan LY. Asymmetric cell division. *Nature*. 1998 Apr 23;392(6678):775-8. Review.
190. Brummendorf TH, Dragowska W, Zijlmans JMJM, Thornbury G, Lansdorp PM. Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J Exp Med*. 1998 Sep 21;188(6):1117-24.
191. Mantel C, Luo Z, Canfield J, Braun S, Deng C, Broxmeyer HE. Involvement of p21cip-1 and p27kip-1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21cip-1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):3710-9.
192. Braun SE, Mantel C, Rosenthal M, Cooper S, Liu L, Robertson KA, Hromas R, Broxmeyer HE. A positive effect of p21cip1/waf1 in the colony formation from murine myeloid progenitor cells as assessed by retroviral-mediated gene transfer. *Blood Cells Mol Dis*. 1998 Jun;24(2):138-48.
193. Mantel C, Hendrie P, Broxmeyer HE. Steel factor regulates cell cycle asymmetry. *Stem Cells*. 2001;19(6):483-91.
194. Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH, Lee Y, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Shaheen M, Li X, Clapp DW. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol*. 2003 May;73(5):630-8.
195. Broxmeyer HE, Cooper S, Kohli L, Hangoc G, Lee Y, Mantel C, Clapp DW, Kim CH. Transgenic expression of stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 enhances myeloid progenitor cell survival/antiapoptosis in vitro in response to growth factor withdrawal and enhances myelopoiesis in vivo. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):421-9.
196. Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Miyazawa K, Ohyashiki K, Broxmeyer HE. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4307-17.
197. Mulloy JC, Cammenga J, Berguido FJ, Wu K, Zhou P, Comenzo RL, Jhanwar S, Moore MA, Nimer SD. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4369-76. Epub 2003 Aug 28.
198. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;49:225-233.
199. Metcalf D. Hemopoietic Colonies. In *In Vitro Cloning of Normal and Leukemic Cells*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1977:227.
200. Cicuttini FM, Welch KL, Boyd AW. The effect of cytokines on CD34+ Rh-123high and low progenitor cells from human umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1994;22:1244-1251.

201. De Winter EA, Nadali G, Coutinho LH et al. Extensive amplification of single cells from CD34⁺ subpopulations in umbilical cord blood and identification of long-term culture-initiating cells present in two subsets. *Stem Cell* 1996;14:566-576.
202. Mayani H, Lansdorp PM. Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Exp. Hematol* 1995;23:1453-1462.
203. Mayani H, Little M-T, Dragowska W et al. Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1a, TGF- β , and TNF- α on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34⁺ cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp Hematol* 1995;23:422-427.
204. Rawlings DJ, Quan SG, Kato RM et al. Long-term culture system for selective growth of human B-cell progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1570-1574.
205. DiGiusto DL, Lee R, Moon J et al. Hematopoietic potential of cryopreserved and ex vivo manipulated umbilical cord blood progenitor cells evaluated in vitro and in vivo. *Blood* 1996;87:1261-1271.
206. Berardi AC, Meffre E, Pflumio F et al. Individual CD34⁺CD38^{low}CD19⁻CD10⁻ progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes. *Blood* 1997;89:3554-3564.
207. Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P et al. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 1997;98:775-777.
208. Miller DA. Human gene therapy comes of age. *Nature* 1992;357:455-459.
209. Hogge DE, Humphries KR. Gene transfer to primary normal human hematopoietic progenitors using recombinant retroviruses. *Blood* 1987;69:611-617.
210. Bodine DM, Karlsson S, Nienhuis AW. Combination of interleukins 3 and 6 preserves stem cell function in culture and enhances retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8897-8901.
211. Sorrentino BP, Brandt D, Bodine D et al. Selection of drugresistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 1992;257:99-103.
212. Moritz T, Keller DC, Williams DA. Human cord blood cells as targets for gene transfer: potential use in genetic therapies of severe combined immunodeficiency disease. *J Exp Med* 1993;178:529-536.
213. Lu L, Xiao M, Clapp DW et al. High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood. *J Exp Med* 1993;178:2089-2096.
214. Zhou SZ, Cooper S, Kang LY, Ruggieri L, Heimfeld S, Srivastava A, Broxmeyer HE. Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *J Exp Med*. 1994 Jun 1;179(6):1867-75.
215. Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA et al. Engraftment of genemodified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995;1:1017-1023.

- 216.Sanz MA. Cord-blood transplantation in patients with leukemia—a real alternative for adults. *N Engl J Med* 2004;351:2328–2330.
- 217.Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 1994;83: 2731–2736.
- 218.Rebulla P. Cord blood banking 2002: 112,010 of 7,914,773 chances. *Transfusion* 2002;42:1246–1248.
- 219.Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:613–619.
- 220.Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* 1990;75:781–786.
- 221.Hoyt R, Szer J, Grigg A. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:1285–1287.
- 222.Cilloni D, Garau D, Regazzi E, Sammarelli G, et al. Primitive hematopoietic progenitors within mobilized blood are spared by uncontrolled rate freezing. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:497–503.
- 223.Galmes A, Besalduch J, Bargay J, et al. Long-term storage at -80°C of hematopoietic progenitor cells with 5% dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion* 1999;39:70–73.
- 224.Aird W, Labopin M, Gorin NC, Antin JH. Long-term cryopreservation of human stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1992;9: 487–490.
- 225.Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80°C , with only 3.5 DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion* 2001;41:667–673.
- 226.Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:283–287.
- 227.Perez-Oteyza J, Bornstein R, Corral M, et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: A prospective multicenter study. Group for cryobiology and biology of bone marrow transplantation (CBTNO), Spain. *Haematologica* 1998;83:1001–1005.
- 228.Matsumoto N, Yoshizawa H, Kagamu H, et al. Successful liquid storage of peripheral blood stem cells at subzero non-freezing temperature. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:777–784.
- 229.Humpe A, Riggert J, Vehmeyer K, et al. Comparison of CD34+ cell numbers and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: Influence of prior chemotherapy. *Transfusion* 1997;37:1050–1057.

230. Shlebak AA, Marley SB, Roberts IA, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Jan;23(2):131-6.
231. Ademokun JA, Chapman C, Dunn J, Lander D, Mair K, Proctor SJ, Dickinson AM. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1997 May;19(10):1023-8.
232. Lewis JP, Passovoy M, Conti SA, McFate PA, Trobaugh FE, Jr. The effect of cooling regimens on the transplantation potential of marrow. *Transfusion* 1967;7:17-32.
233. Ketheesan N, Whiteman C, Malczewski AB, Hirst RG, La Brooy JT. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells. *Transfus Apher Sci* 2004;30:47-54.
234. Attarian H, Feng Z, Buckner CD, MacLeod B, Rowley SD. Long-term cryopreservation of bone marrow for autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:425-430.
235. Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW. Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem Cells Dev* 2004;13:295-305.
236. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993;81:1679-1690.
237. Xiao M, Dooley DC. Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:115-122.
238. Yang H, Acker JP, Hannon J, Miszta-Lane H, Akabutu JJ, McGann LE. Damage and protection of UC blood cells during cryopreservation. *Cytotherapy* 2001;3:377-386.
239. Woods EJ, Liu J, Derrow CW, Smith FO, Williams DA, Criser JK. Osmometric and permeability characteristics of human placental/ umbilical cord blood CD34+ cells and their application to cryopreservation. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9:161-173.
240. Zhang XB, Li K, Yau KH, et al. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUs, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells. *Transfusion* 2003;43: 265-272.
241. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994;83:2489-2497.
242. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, et al. SCID mice as an in vivo model of human cord blood hematopoiesis. *Blood Cells* 1994;20: 316-320; discussion 320-322.
243. Bock TA, Orlic D, Dunbar CE, Broxmeyer HE, Bodine DM. Improved engraftment of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice carrying human cytokine transgenes. *J Exp Med* 1995;182:2037-2043.

244. Orazi A, Braun SE, Broxmeyer HE. Commentary: Immunohistochemistry represents a useful tool to study human cell engraftment in SCID mice transplantation models. *Blood Cells* 1994;20:323–330.
245. Kobyłka P, Ivanyi P, Breur-Vriesendorp BS. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation* 1998;65: 1275–1278.
246. Mugishima H, Harada K, Chin M, et al. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:395,396.
247. Walter Z, Szostek M, Weglarska D, et al. Methods for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. *Przegl Lek* 1999;56:34–39.
248. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature* 1959;183:1394,1395.
249. Eberhardt R, Zwingers T, Hofmann R. DMSO in patients with active gonarthrosis. A double-blind placebo controlled phase III study. *Fortschr Med* 1995;113:446–450.
250. Albanell J, Baselga J. Systemic therapy emergencies. *Semin Oncol* 2000;27:347–361.
251. Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, Herst R, Solh H. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion* 1994;34:887–890.
252. Zambelli A, Poggi G, Da Prada G, et al. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res* 1998;18(6B):4705–4708.
253. Hequet O, Dumontet C, El Jaafari-Corbin A, et al. Epileptic seizures after autologous peripheral blood progenitor infusion in a patient treated with high-dose chemotherapy for myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:544.
254. Higman MA, Port JD, Beauchamp NJ, Jr., Chen AR. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:797–800.
255. Ferrucci PF, Martinoni A, Cocorocchio E, et al. Evaluation of acute toxicities associated with autologous peripheral blood progenitor cell reinfusion in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:173–177.
256. Burger J, Gilmore MJ, Jackson B, Prentice HG. Acute haemoglobinaemia associated with the reinfusion of bone marrow buffy coat for autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:322–324.
257. Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K, Chadderton T, Gluck S. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: On hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:135–141.
258. Bakken AM, Bruserud O, Abrahamsen JF. No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5% or 10% dimethyl sulfoxide. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:351–358.

- 259.Sasnour LM, Kale VP, Limaye LS. Supplementation of conventional freezing medium with a combination of catalase and trehalose results in better protection of surface molecules and functionality of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12:553–564.
- 260.Kessinger A, Schmit-Pokorny K, Smith D, Armitage J. Cryopreservation and infusion of autologous peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1990;5 (Suppl. 1):25–27.
- 261.Kawano Y, Lee CL, Watanabe T, et al. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer. *Ann Hematol* 2004;83:50–54.
- 262.Cabezudo E, Dalmases C, Ruz M, et al. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. *Transfusion* 2000;40:1223–1227.
- 263.Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas G, Cooper S, Falkenburg JH, Bard J, Boyse EA. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells*. 1991;17(2):313-29. Review.
- 264.Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NK, Davies SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1611-8.
- 265.Grisaru D, Deutsch V, Pick M, Fait G, Lessing JB, Dollberg S, Eldor A. Placing the newborn on the maternal abdomen after delivery increases the volume and CD34 cell content in the umbilical cord blood collected: an old maneuver with new applications. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 May;180(5):1240-3.
- 266.Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2717-22.
- 267.Villalon L, Odriozola J, Ramos P, Ramos ML, Herrera P, de Oteyza JP. Cryopreserving with increased cellular concentrations of peripheral blood progenitor cells: Clinical results. *Haematologica* 2002;87:ELT06.
- 268.Gluckman E. Hematopoietic stem cell transplants using umbilical cord blood. *N Engl J Med* 2001;344:1860,1861.
- 269.Rollig C, Babatz J, Wagner I, et al. Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood-comparison between water bath and dry warming device. *Cytotherapy* 2002;4:551–555.
- 270.Moroff G, Seetharaman S, Kurtz JW, et al. Retention of cellular properties of PBPCs following liquid storage and cryopreservation. *Transfusion* 2004;44:245–252.

271. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 24;92(22):10119-22.
272. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996;335:157-166.
273. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le Forestier C, Divine M, Duedari N. A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant* 1991;8:291-294.
274. Zingsem J, Strasser E, Weisbach V, et al. Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion* 2003;43:806-813.
275. Ayello J, Hesdorffer C, Reiss RF. A semi-automated technique for volume reduction of stem cell suspensions for auto transplantation. *J Hematother* 1995;4:545-549.
276. FDA. Current good tissue practice for manufacturers of human cellular tissue based products. Inspection and enforcement; Proposed rule 2001.
277. Jestice HK, Farrington M, Hunt C, Matthews I, Scott MA, Foreman J, Marcus RE. Bacterial contamination of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus Med* 1996;6:103-110.
278. Padley D, Koontz F, Trigg ME, Gingrich R, Strauss RG. Bacterial contamination rates following processing of bone marrow and peripheral blood progenitor cell preparations. *Transfusion* 1996;36:53-56.
279. Espinosa MT, Fox R, Creger RJ, Lazarus HM. Microbiologic contamination of peripheral blood progenitor cells collected for hematopoietic cell transplantation. *Transfusion* 1996;36:789-793.
280. Webb IJ, Coral FS, Andersen JW, et al. Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: Implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion* 1996; 36:782-788.
281. Schwella N, Zimmermann R, Heuft HG, et al. Microbiologic contamination of peripheral blood stem cell autografts. *Vox Sang* 1994;67:32-35.
282. Prince HM, Page SR, Keating A, et al. Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:87-91.
283. Attarian H, Bensinger WI, Buckner CD, McDonald DL, Rowley SD. Microbial contamination of PBSC collections. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:699-702.
284. Kipp F, Linnemann E, Fischer RJ, Sibrowski W, Cassens U. Cryopreservation reduces the concentration of detectable bacteria in contaminated peripheral blood progenitor cell products. *Transfusion* 2004;44:1098-1103.
285. Brecher ME, Means N, Jere CS, Heath D, Rothenberg S, Stutzman LC. Evaluation of an automated culture system for detecting bacterial contamination of platelets: An analysis with 15 contaminating organisms. *Transfusion* 2001;41:477-482.

- 286.Schafer TW, Everett J, Silver GH, Came PE. Biohazard: Virus contaminated liquid nitrogen, Scientific Letter. Science 1976;191: 25,26. No. 4222.
- 287.Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. Lancet 1995;346:137–140.
- 288.Hawkins AE, Zuckerman MA, Briggs M, et al. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: Linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. J Virol Methods 1996;60:81–88.
- 289.Fountain D, Ralston M, Higgins N, et al. Liquid nitrogen freezers: A potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. Transfusion 1997;37:585–591.
- 290.Voak D, Cann R, Finney RD, et al. Guidelines for administration of blood products: Transfusion of infants and neonates. British Committee of Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. Transfus Med 1994;4:63–69.
- 291.Ware CB, Nelson AM, Blau CA. Controlled-rate freezing of human ES cells. Biotechniques 2005;38:879,880,882,883.
- 292.Husebekk A, Skaug K, Kostad A, Dahl IM, Gutteberg T, Skogen B. Hepatitis B virus-infected peripheral blood progenitor cell harvests in liquid nitrogen freezer containing non-infectious products. Transfusion 2004;44:942,943.
- 293.FDA. Guidelines for quality assurance in blood establishments. Docket no.91N-0450.Fed Regist 1995;58:35959.
- 294.FDA. Current good tissue practice for manufacturers of human cellular and tissue-based products;inspection and enforcement. Docket No. 97n-484P. Fed Regist 2001;66:1508-59.
- 295.Issitt LA, ed. Standards for cord blood services, 1st ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2001.
- 296.NETCORD and FACT. International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection and release, 2nd ed. Omaha, NE. Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, 2001.
- 297.Code of Federal Regulations. Title 21 CFR Part 211. Washington, DC: US Government Printing Office, 2003.
- 298.Code of Federal Regulations. Title 21 CFR Part 820. Washington, DC: US Government Printing Office, 2003.
- 299.Stroncek DF, Fautsch S, Burger S, Wagner JE, McCullough J. Mislabeling of elutriation medium: a demonstration of the need to improve the quality control of reagents produced for cell processing. Transfusion. 1995 Nov-Dec;35(11):952-4.
- 300.McCullough J, Kadidlo D, Krepski T, et al. Erroneous labeling of a cord blood unit detected by quality control testing of the final product. Presented at the 9th Annual Meeting of ISCT, Phoenix, Arizona (May 29-June 1, 2003).

301. Smith AG. Basic biology of hematopoietic. In: Snyder E, Haley NR, eds. Hematopoietic progenitor cells: A primer for medical professionals. Bethesda, MD: AABB Press, 2000:3-24.
302. Deeg HJ. Hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant diseases. In: Hoffman R, ed. Hematology basic principles and practice. Philadelphia, PA. : Churchill Livingstone, 2000:1554-74.
303. Gross TG, Egeler RM, Smith FO. Pediatric hematopoietic stem cell transplantation. Hematol Oncol Clin North Am. 2001 Oct;15(5):795-808. Review.
304. Neupogen-(G-CSF) – AMGEN. Physicians' desk reference. Montvale, NJ: Medical Economics Company, 2001: 555.
305. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. N Engl J Med. 1997 Aug 7;337(6):373-81.
306. Martin TG, Gajewski JL. Allogeneic stem cell transplantation for acute lymphocytic leukemia in adults. Hematol Oncol Clin North Am. 2001 Feb;15(1):97-120. Review.
307. Gee A. Malignant cell purging: Immunophysical techniques. In: Lasky LC, Warkentin P, eds. Marrow and stem cell processing for transplantation. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1995: 83-102.
308. Warkentin P. Clinical background for marrow and progenitor cell processing. In: Lasky LC, Warkentin P, eds. Marrow and stem cell processing for transplantation. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1995:1-15.
309. Howell WM, Navarrete C. The HLA system: an update and relevance to patient-donor matching strategies in clinical transplantation. Vox Sang. 1996;71(1):6-12. Review.
310. Wagner JE. Allogeneic umbilical cord blood transplantation. In: Broxmeyer HE, ed. Cellular characteristics of cord blood and cord blood transplantation. Bethesda, MD: AABB Press, 1998: 113-45.
311. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. Exp Hematol. 2000 Nov;28(11):1197-205. Review.
312. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N Engl J Med. 1998 Nov 26;339(22):1565-77.
313. Woodard P, Lubin B, Walters CM. New approaches to hematopoietic cell transplantation for hematological diseases in children. Pediatr Clin North Am. 2002 Oct;49(5):989-1007. Review.
314. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, McGlave PB, Sender L, Cairo MS. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. Blood. 1996 Aug 1;88(3):795-802.

315. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2001 Jun 14;344(24):1815-22.
316. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*. 1995 Jul 22;346(8969):214-9.
317. Rappaport J, Mihm M, Reinherz E, Lopansri S, Parkman R. Acute graft-versus-host disease in recipients of bone-marrow transplants from identical twin donors. *Lancet*. 1979 Oct 6;2(8145):717-20.
318. Burakoff S, Deeg HJ, Ferrara J, Atkinson K. Graft-vs-host disease: Immunology, pathophysiology, and treatment. New York: Marcel Dekker, 1990.
319. Shulman H. Is graft-vs-host disease an alloimmune or autoimmune disorder? In: Tan E, ed. *Clinical aspects of autoimmunity*. New York: Fones & Mann, 1988:18.
320. Collins N. T-cell depletion of allogeneic bone marrow transplants by immunologic and physical techniques. In: Lasky LC, Warkentin P, eds. *Marrow and stem cell processing of transplantation*. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1995:149-65.
321. Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, Sanders JE, Deeg HJ, Stewart P, Appelbaum FR, Clift R, Fefer A, Witherspoon RP, et al. Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood*. 1985 Sep;66(3):664-72.
322. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann RG, Jacobsen SJ, Marmont AM, McGlave PB, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*. 1988 Jun;108(6):806-14.
323. Fisher C, McGrath MD, Cannon ME. Related and Autologous cord blood banking. In: Broxmeyer HE, ed. *Cellular characteristics of cord blood and cord blood transplantation*. Bethesda, MD: AABB Press, 1998: 199-216.
324. Wall DA, Noffsinger JM, Mueckl KA, Alonso JM 3rd, Regan DM, Johnson CE, Weinstein DL, Duarte LM, Winn HN. Feasibility of an obstetrician-based cord blood collection network for unrelated donor umbilical cord blood banking. *J Matern Fetal Med*. 1997 Nov-Dec;6(6):320-3.
325. Ballen K, Broxmeyer HE, McCullough J, Piaciabello W, Rebullia P, Verfaillie CM, Wagner JE. Current status of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(12):635-45. Review.
326. Broxmeyer HE. Cord blood stem and progenitor cell therapy for immunodeficiency and other disorders. *Immunol Allergy Clin* 1996; 16: 439-52.
327. Sparrow RL, Cauchi JA, Ramadi LT, Waugh CM, Kirkland MA. Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion*. 2002 Feb;42(2):210-5.

- 328.Surbek DV, Schönfeld B, Tichelli A, Gratwohl A, Holzgreve W. Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomized comparison of collection before vs after placenta delivery. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Aug;22(3):311-2.
- 329.Hubel A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev*. 1997 Jul;11(3):224-33. Review.
- 330.Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, Dvorak K, Fisher RI. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood*. 1987 Oct;70(4):974-8.
- 331.Scaradavou A, Sung D, Rubinstein P. Combination of low-dose allogeneic placental cord blood (PBC) transplants in a mouse model: Improved survival rates and stable long-engraftment (abstract). *Blood* 2002; 100:404b.
- 332.Barker J, Weisdorf D, DeFor T, Wagner J. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after myeloablative conditioning (abstract) *Blood* 2002;100:42a.
- 333.Maloney DG. Advances in the immunotherapy of hematologic malignancies: cellular and humoral approaches. *Curr Opin Hematol*. 1999 Jul;6(4):222-8. Review.
- 334.Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):756-63.
- 335.Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P, O'Brien S, Khouri I, Gajewski J, Mehra R, Claxton D, Andersson B, Beran M, Przepiorka D, Koller C, Kornblau S, Kørbling M, Keating M, Kantarjian H, Champlin R. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood*. 1997 Jun 15;89(12):4531-6.
- 336.Storb R, Yu C, Sandmaier BM, McSweeney PA, Georges G, Nash RA, Woolfrey A. Mixed hematopoietic chimerism after marrow allografts. Transplantation in the ambulatory care setting. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Apr 30;872:372-5; discussion 375-6.
- 337.Spitzer TR, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N, McAfee S, Sackstein R, Saidman S, Colby C, Sykes M, Sachs DH, Cosimi AB. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation*. 1999 Aug 27;68(4):480-4.
- 338.Champlin R, Khouri I, Komblau S, Molidrem J, Giralt S. Reinventing bone marrow transplantation. Nonmyeloablative preparative regimens and induction of graft-vs-malignancy effect. *Oncology (Williston Park)*. 1999 May;13(5):621-8; discussion 631, 635-8, 641.
- 339.Andreani M, Manna M, Lucarelli G, Tonucci P, Agostinelli F, Ripalti M, Rapa S, Talevi N, Galimberti M, Nesci S. Persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia. *Blood*. 1996 Apr 15;87(8):3494-9.

340. Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S, Angelucci E, Persini B, Agostinelli F, Donati M, Manna M. Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Feb;25(4):401-4.
341. Rizzieri DA, Long GD, Vredenburg JJ, Gasparetto C, Morris A, Stenzel TT, Davis P, Chao NJ. Successful allogeneic engraftment of mismatched unrelated cord blood following a nonmyeloablative preparative regimen. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3486-8.
342. Kögler G, Nürnberger W, Fischer J, Niehues T, Somville T, Göbel U, Wernet P. Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1999 Aug;24(4):397-403.
343. Pecora AL, Stiff P, Jennis A, Goldberg S, Rosenbluth R, Price P, Goltry KL, Douville J, Armstrong RD, Smith AK, Preti RA. Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Apr;25(7):797-9.
344. Fernández MN, Regidor C, Cabrera R, García-Marco J, Briz M, Forés R, Sanjuán I, McWhinnie A, Querol S, García J, Madrigal A. Cord blood transplants: early recovery of neutrophils from co-transplanted sibling haploidentical progenitor cells and lack of engraftment of cultured cord blood cells, as ascertained by analysis of DNA polymorphisms. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Aug;28(4):355-63.
345. Mackin W, Gunther KC, Kraus M. The frontier of cellular medicine: Expanding umbilical cord blood stem cells for clinical use. *Cancer J* 2001;7(Suppl 20): S95-105.
346. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998 Jul 15;92(2):362-7.
347. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
348. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001 Jun;107(11):1395-402.
349. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999 Sep 23;401(6751):390-4.
350. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998 Mar 6;279(5356):1528-30. Erratum in: *Science* 1998 Aug 14;281(5379):923.
351. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000 Dec 1;290(5497):1775-9.

- 352.Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains.Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Sep 14;96(19):10711-6.
- 353.Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- 354.Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells.Blood. 2001 Nov 1;98(9):2615-25.
- 355.American Academy of Pediatrics work Group on Cord Blood Banking. Cord blood banking for potential future transplantation: Subject review. Pediatrics 1999; 104:116-8.
- 356.American Academy of Pediatrics/Section on Hematology/Oncology; Section on Allergy/Immunology, Lubin BH, Shearer WT. Cord blood banking for potential future transplantation. Pediatrics 2007; 119:165-70.
- 357.Storb RF, Lucarelli G, McSweeney PA, Childs RW. Hematopoietic cell transplantation for benign hematological disorders and solid tumors. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003; 372-97.
- 358.Gluckman E. History of cord blood transplantation.Bone Marrow Transplant. 2009; 44:621-6.
- 359.D. Berz, E. M. McCormack, E. S. Winer, G. A. Colvin, and P.J. Quesenberry. Cryopreservation of Hematopoietic stem cells. A J Hematol 2007;82:463-472.
- 360.Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 645–650.
- 361.Broxmeyer HE, Lee MR, Hangoc G, Cooper S, Prasain N, Kim YJ, Mallett C, Ye Z, Witting S, Cornetta K, Cheng L, Yoder MC. Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23.5-year cryopreserved cord blood. Blood 2011;117:4773-7.
- 362.Spurr EE, Wiggins NE, Marsden KA, Lowenthal RM, and Ragg SJ . Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5–14 years) cryostorage. Cryobiology 2002; 44: 210–217.
- 363.Ratajczak J, Marlicz W, Rozmyslowicz T, Machalinski B, Ratajczak MZ. Comparison of different strategies for cryopreserving and storage of bone marrow CD34⁺ cells. Possibility of unprogrammed rate freezing and storage at -80⁰C mechanical freezer. Ann Transplant 1996; 1:35-8.
- 364.Galmes A, Besalduch J, Bargay J, Matamoros N, Duran MA, Morey M, Alvarez F, Mascaro M. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80⁰C without rate-controlled freezing. Transfusion 1996; 36:794-7.
- 365.Galmes A, Gutierrez A, Sampol A, Canaro M ,Morey M, Inglesias J, Matamoros N, *et al.* Long-term hematological reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral

- blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% DMSO and -80 degrees in a mechanical freezer. *Haematologica* 2007; 92:986-9.
366. Choi CW, Kim BS, Seo JH, Shin SW, Kim YH, Kim JS. Long-term engraftment stability of PBSC -80°C mechanical freezer with 10% dimethyl sulfoxide. *Int J hematol.* 2001; 73:245-50.
367. McCullough J, Haley R, Clay M, Hubel A, Lindgren B, Moroff G. Long-term storage of peripheral blood stem cells frozen and stored with a conventional liquid nitrogen technique compared with cells frozen and stored in a mechanical freezer. *Transfusion.* 2010; 50:808-19.
368. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood.* 1997 Apr 1;89(7):2233-58. Review. PubMed PMID: 9116266.
369. Sutherland DR, Marsh JC, Davidson J, Baker MA, Keating A, Mellors A. Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by *Pasteurella haemolytica* glycoprotease: implications for purification of CD34-positive progenitor cells. *Exp Hematol.* 1992 Jun;20(5):590-9. PubMed PMID: 1375160.
370. Greaves M, Titley I, Colman S, et al. CD34 cluster workshop report. 1995, leukocyte typing V, eds. Schlossmann, S, et al., Oxford University Press, 840-846.
371. Greaves MF, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, Sutherland DR. Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia.* 1992;6 Suppl 1:31-6. Review. PubMed PMID: 1372379.
372. Newman W, Targan SR, Fast LD. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. *Mol Immunol.* 1984 Nov;21(11):1113-21.
373. Fabre JW, Williams AF. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterisation of the major antigen recognised. *Transplantation.* 1977 Apr;23(4):349-59.
374. Coffman RL, Weissman IL. B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature.* 1981 Feb 19;289(5799):681-3.
375. Dalchau R, Fabre JW. Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen. Evidence for structural and possible functional diversity of the human leukocyte common molecule. *J Exp Med.* 1981 Apr 1;153(4):753-65.
376. Omary MB, Trowbridge IS, Battifora HA. Human homologue of murine T200 glycoprotein. *J Exp Med.* 1980 Oct 1;152(4):842-52.
377. Dalchau R, Kinkley J., and Fabre J. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to leukocyte-common (L-C) antigen to the rat. 1981, *Eur. J. Immunol*, 10, 737-744.
378. Zelenin AV, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, Kolesnikov VA, Nikitin SM, Zhuze AL, Gnutchnev NV. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry.* 1984 Jul;5(4):348-54.

379. Gill JE, Jotz MM, Young SG, Modest EJ, Sengupta SK. 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties. *J Histochem Cytochem.* 1975 Nov;23(11):793-9.
380. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry.* 1992;13(2):204-8.
381. Lecoœur H, Ledru E, Prévost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods.* 1997 Dec 1;209(2):111-23.
382. Eaves, C. & Lambie, K. Colony culture media and scoring procedures. *Atlas of Human Hematopoietic Colonies*, pp. 3±4. Stem Cell Technologies Inc., Vancouver. 1995.
383. Paczkowska E. Freezing of umbilical blood cells in mechanical freezers (-80°C). *Ann Acad Med Stetin* 2002; 48:117-33.
384. Valeri CR, Pivacek LE. Effects of temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on *in vitro* measurements in human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion* 1996; 36:303-8.
385. Ayello J, Semidei-Pomales M, Preti R, Hesdorffer C, Reiss RF. Effects of long-term storage at -90 degrees C of bone marrow and PBPC on cell recovery, viability and clonogenic potential. *J Hematother* 1998; 7:385-90.
386. Clark J, Pati A, McCarthy D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:121-5.,
387. Raju GM, Kochupillai V, Kumar L. Storage of haemopoietic stem cells for autologous bone marrow transplantation. *Natl Med J India.* 1995 Sep-Oct;8(5):216-21. Review.
388. Ratajczak MZ, Kuczyński WI, Ratajczak J. Influence of different temperature of cryopreservation on the proliferative potential of human bone marrow progenitor cells. Transplantological implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1994;42(3):217-21.
389. FACT-Netcord International Cord Blood Standards, 4th edition.
390. Li X, Zhang Y, Chen FP. Comparison of cryopreservation methods of umbilical hematopoietic stem/progenitor cells. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2002 Dec28;27(6):563-6. Chinese.
391. Yong K, Fahey A, Reeve L, Nicholls C, Thomas NS, Pizzey A, Ings SJ, Watts MJ, Linch DC. Cord blood progenitor cells have greater transendothelial migratory activity and increased responses to SDF-1 and MIP-3beta compared with mobilized adult progenitor cells. *Br J Haematol.* 1999 Nov;107(2):441-9.
392. Voermans C, Gerritsen WR, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Increased migration of cord blood-derived CD34+ cells, as compared to bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cells across uncoated or fibronectin-coated filters. *Exp Hematol.* 1999 Dec;27(12):1806-14
393. Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, Gluckman E. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow

transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med.* 2000 Jun 22;342(25):1846-54.

394. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, Remberger M, Michel G, Arcese W, Dallorso S, Tiedemann K, Busca A, Chan KW, Kato S, Ortega J, Vowels M, Zander A, Souillet G, Oakill A, Woolfrey A, Pay AL, Green A, Garnier F, Ionescu I, Wernet P, Sirchia G, Rubinstein P, Chevret S, Gluckman E. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood.* 2001 May 15;97(10):2962-71.
395. Barker JN, Davies SM, DeFor T, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood.* 2001 May 15;97(10):2957-61.
396. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E. et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. *Blood* 1999; 93:3662-3671.
397. Laroche V, McKenna DH, Moroff G, Schierman T, Kadidlo D, McCullough J. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion* 2005; 45:1909-16.
398. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10119-10122.
399. Alonso III JM, Regan DM, Johnson CE, Oliver DA, Fegan R, Lasky LC, Wall DA. A simple and reliable procedure for cord blood banking, processing and freezing: St Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences. *Cytotherapy* 2001; 3:429-33.
400. Antonenas V, Bradstock KF, Shaw PJ. Effect of washing procedures on unrelated cord blood units for transplantation in children and adults abstract. *ISCT; 2002; Barcelona, Spain.*
401. Rogers I, Sutherland DR, Holt D, et al. Human UC-blood banking: impact of blood volume, cell separation and cryopreservation on leukocyte and CD34+ cell recovery. *Cytotherapy* 2001;3:269-76.
402. Goodwin HS, Grunzinger LM, Regan KA, et al. Long term cryostorage of UC blood units: ability of the integralsegment to confirm both identity and hematopoietic potential. *Cytotherapy* 2003;5:80-6.
403. Yamamoto S, Ikeda H, Toyama D, Hayashi M, Akiyama K, Suzuki M, Tanaka Y, Watanabe T, Fujimoto Y, Hosaki I, Nishihira H, Isoyama K. Quality of long-term cryopreserved umbilical cord blood units for hematopoietic cell transplantation. *Int J Hematol.* 2011 Jan;93(1):99-105.
404. Law P, Alsop P, Dooley DC, Meryman HT, et al: Studies of cell separation. A Comparison of the osmotic response of human lymphocytes and granulocytes monocyte progenitor cells. *Cryobiology* 1983;20:644-51.

- 405.Moezzi L, Pourfathollah AA, Alimoghaddam K, Soleimani M, Ardjmand AR. The effect of cryopreservation on clonogenic capacity and *in vitro* expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells. *Transplantation proceedings* 2005; 37: 4500-4503.
- 406.Meyer TPH, Hofmann B, Zaisserer J, Jacobs VR, Fuchs B, Rapp S, Weinauer F, Burkhart J. Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2006; 8:265-276.
- 407.Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan KW, Takahashi TA, Ortega J, Filipovich A, Locatelli F, Asano S, Fagioli F, Vowels M, Sirvent A, Laporte JP, Tiedemann K, Amadori S, Abecassis M, Bordigoni P, Diez B, Shaw PJ, Vora A, Caniglia M, Garnier F, Ionescu I, Garcia J, Koegler G, Rebullia P, Chevret S. Eurocord Group. Factors associated with outcome of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004; 32:397-407.
- 408.Charrier S, Boiret N, Fouassier M, Berger J, Rapatel C, Pigeon P, Mareynat G, Bonhomme J, Camilleri L, Berger MG. Normal human bone marrow CD34⁺CD133⁺ cells contain primitive cell able to produce different categories of colony-forming unit megakaryocytes *in vitro*. *Exp Hematol* 2002; 30:1051-60.
- 409.Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol.* 2008 Jun;127(3):286-97. doi: 10.1016/j.clim.2008.02.008. Epub 2008 Apr 18. Review.
- 410.Flores AI, McKenna DH, Montalbán MA, De la Cruz J, Wagner JE, Bornstein R. Consistency of the initial cell acquisition procedure is critical to the standardization of CD34⁺ cell enumeration by flow cytometry: results of a pairwise analysis of umbilical cord blood units and cryopreserved aliquots. *Transfusion.* 2009 Apr;49(4):636-47.
- 411.Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother.* 1992 Winter;1(4):329-41.
- 412.Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, West W. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood.* 1995 Nov 15;86(10):3961-9.
- 413.Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, Yu M, Dunbar C, Barrett J. CD34⁺ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood.* 1996 Oct 15;88(8):3223-9.
- 414.Bahçeci E, Read EJ, Leitman S, Childs R, Dunbar C, Young NS, Barrett AJ. CD34⁺ cell dose predicts relapse and survival after T-cell-depleted HLA-identical haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2000 Feb;108(2):408-14.
- 415.Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socié G, Espérou H, Devergie A, Dal Cortivo L, Marolleau JP, Garnier F, Ribaud P, Gluckman E. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2002 Apr 15;99(8):2726-33.

416. Kurtz J, Seetharaman S, Greco N, Moroff G. Assessment of cord blood hematopoietic cell parameters before and after cryopreservation. *Transfusion*. 2007; 47:1578-1587.
417. Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry* 2001; 46:254-61.
418. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. *et al.* Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE Guidelines. *Int Soc Hematother Graft Eng Cytometry* 1998; 34:61-70.
419. Rivadeneyra-Espinoza L, Romano BP, Flores AG, Guzmán-García MO, Carvajal-Armora F, Alejandro Ruiz-Argüelle A. Instrument-and protocol-dependent variation in the enumeration of CD34+ cells by flow cytometry. *Transfusion* 2006; 46:530-6.
420. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M, Sutherland DR, Chin-Yee IH. Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:967-72.
421. Styczynski J, Cheung YK, Garvin J, Savage DG, Billote GB, Harrison L, Skerrett D, Wolownik K, Wischhover C, Hawks R, Bradley MB, Del Toro G, George D, Yamashiro D, van de Ven C, Cairo MS. Outcomes of unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Jul;34(2):129-36.
422. Sanz G, Lorenzo I, Moscardo F, Planelles D, Larrea L, et al. Outcome and prognostic factors after unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adult patients with hematologic malignancies transplanted in early disease stages. *Blood* 2004;104:591a.
423. Terakura S, Azuma E, Murata M, Kumamoto T, Hirayama M, Atsuta Y, Kodera Y, Yazaki M, Naoe T, Kato K. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34+ and CD8+ cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jul;13(7):822-30.
424. Duggleby RC, Querol S, Davy RC, Fry LJ, Gibson DA, Horton RB, Mahmood SN, Gomez SG, Madrigal JA. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion*. 2012 Mar;52(3):549-59.
425. Scaradavou A, Smith KM, Hawke R, Schaible A, Abboud M, Kernan NA, Young JW, Barker JN. Cord blood units with low CD34+ cell viability have a low probability of engraftment after double unit transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Apr;16(4):500-8.
426. Van haute I, Lootens N, De Smet S, De Buck C, Verdegem L, Vanheusden K, Pinxteren J, Vandekerckhove B. Viable CD34+ stem cell content of a cord blood graft: which measurement performed before transplantation is most representative? *Transfusion*. 2004 Apr;44(4):547-54.
427. Dauber K, Becker D, Odendahl M, Seifried E, Bonig H, Tonn T. Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit. *Cytotherapy*. 2011 Apr;13(4):449-58.

- 428.Kudo Y, Minegishi M, Seki O, Takahashi H, Suzuki A, Narita A, Sato Y, Abe M, Ishioka N, Harigae H, Tsuchiya S. Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. *Int J Hematol.* 2011 May;93(5):645-51.
- 429.Wagner E, Duval M, Dalle JH, Morin H, Bizier S, Champagne J, Champagne MA. Assessment of cord blood unit characteristics on the day of transplant: comparison with data issued by cord blood banks. *Transfusion.* 2006 Jul;46(7):1190-8.
- 430.de Boer F, Dräger AM, Pinedo HM, Kessler FL, Monnee-van Muijen M, Weijers G, Westra G, van der Wall E, Netelenbos T, Oberink JW, Huijgens PC, Schuurhuis GJ. Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34⁺ cells in frozen-thawed stem cell grafts. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002Dec;11(6):951-63.
- 431.Bitán M, Or R, Shapira MY, Resnick IB, Ackerstein A, Samuel S, Elad S, Slavin S. Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133⁺ purified stem cells. *Exp Hematol* 2005; 33:713-8.
- 432.Bhathia M. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia* 2001; 15:1685-1688.
- 433.Yin AH, Miraglia S. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90:5002-5012.
- 434.Miraglia S, Godfrey W, Yin AH. A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning. *Blood* 1997; 90:5013-5021.
- 435.Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, Van der Schoot CE, Schmitz G, Papa S. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. European Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 1998; 34: 128-142.
- 436.Kuci S, Wessels JT, Buhning HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Löffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R. Identification of a novel class of human adherent CD34⁻ stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 2003; 101:869-876.
- 437.Fackler MJ, Civin CI, May WS. Up-regulation of surface CD34 expression is regulated by protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34. *J Biol Chem* 1992; 267:17540-6.
- 438.Lamana M, Albella B, Rodríguez F, Regidor C, Bueren JA. Conclusions of anational multicenter intercomparative study of in vitro cultures of human hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant.* 1999 Feb;23(4):373-80.
- 439.Paczkowska E. Freezing of umbilical blood cells in mechanical freezers (-80⁰C). *Ann Acad Med Stetin* 2002; 48:117-33.
- 440.Larghero J., Rea D., et al. Prospective flow cytometric evaluation of nucleated red blood cells in cord blood units and relationship with nucleated and CD34⁺ cell quantification. *Transfusion*(2006);46:403-406.

441. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Shoulars K, Gentry T, Balber AE, Kurtzberg J. The Cord Blood Apgar: a novel scoring system to optimize selection of banked cord blood grafts for transplantation (CME). *Transfusion*. 2012 Feb;52(2):272-83.
442. 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 Sep;17(9):1362-74.
443. Mirabet V, Alvarez M, Solves P, Ocete D, Gimeno C. Use of liquid nitrogen during storage in a cell and tissue bank: contamination risk and effect on the detectability of potential viral contaminants. *Cryobiology*. 2012 Apr;64(2):121-3.
444. Morris GJ. The origin, ultrastructure, and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels. *Cryobiology*. 2005 Jun;50(3):231-8.
445. Grout BW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology*. 2009 Apr 15;71(7):1079-82.
446. Goussetis E, Petrakou E, Theodosaki M, Kitra V, Peristeri I, Vessalas G, Dimopoulou MN, Spiropoulos A, Papassavas AC, Stavropoulos-Giokas C, Graphakos S. Directed sibling donor cord blood banking for children with beta-thalassemia major in Greece: usage rate and outcome of transplantation for HLA-matched units. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Mar-Apr;44(2):107-10.