

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ.ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ

ΤΙΤΛΟΣ

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ
ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ
ΑΥΤΟΛΟΓΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της ΕΛΕΝΗΣ ΛΑΛΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2021

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΟΓΗΣ
ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μ.Κ. ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

Αιματολογική Κλινική, ΕΚΠΑ

Κ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

Αιματολογική Κλινική, ΕΚΠΑ

Π. ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Μ.Κ. ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική, ΕΚΠΑ
2. Κ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Παθολογίας – Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική, ΕΚΠΑ
3. Π. ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ, Καθηγητής Αιματολογίας, Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ
4. Θ.Π. ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, Αναπλ. Καθηγητής Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική, ΕΚΠΑ
5. Μ.Π. ΣΙΑΚΑΝΤΑΡΗ, Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογίας – Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική, ΕΚΠΑ
6. Φ. ΚΟΝΤΟΠΙΔΟΥ, Αναπλ. Καθηγήτρια Αιματολογίας, Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ
7. Σ. ΚΟΚΟΡΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, ΕΚΠΑ

Στον Αντώνη, την Αφροδίτη, τον Γιώργο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ βαθύτατα την Καθηγήτρια Μαρία Αγγελοπούλου, διότι αναθέτοντας μου αυτή τη διδακτορική διατριβή, με ώθησε να διερευνήσω σε ακόμα μεγαλύτερο βάθος το πεδίο της κρυσυντήρησης και μεταμόσχευσης προγονικών κυττάρων αίματος, αντικείμενο με το οποίο ασχολούμαι αποκλειστικά τα τελευταία 12 έτη, μετατρέποντας την καθημερινή εργαστηριακή ρουτίνα σε πηγή εμπειρικής και επιστημονικής γνώσης. Είναι ανεκτίμητη η τεράστια και διαρκής υποστήριξή της σε όλα τα επίπεδα.

Τον κ. Καθηγητή Κ. Κωνσταντόπουλο ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη της προσπάθειάς μου όλα αυτά τα έτη. Το ενδιαφέρον και η συμβολή του ήταν σημαντικά και καθοριστικά για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Τον κ. Καθηγητή Π. Παναγιωτίδη ευχαριστώ θερμά για την σημαντική συμβολή του στην περάτωση των εργαστηριακών μετρήσεων και την ολοκλήρωση της μελέτης.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Διευθύντρια του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Λαϊκού Νοσοκομείου, κα Ν. Καφάση, διότι επί επτά τουλάχιστον συναπτά έτη μου διέθεσε απλόχερα χώρο και ιατρικά μηχανήματα για την εκτέλεση των πειραμάτων στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας ροής. Στις Βιοπαθολόγους κ. Α. Δημητρακοπούλου και Π. Γκασούκα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ για τον άπλετο χρόνο που διέθεσαν και τον τεράστιο κόπο που κατέβαλλαν για την εκτέλεση των πειραμάτων. Η συμμετοχή τους στο τόσο στο εργαστηριακό όσο και στο συγγραφικό κομμάτι της διατριβής ήταν καθοριστική για την επιτυχία της.

Τέλος ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους στην Αιματολογική κλινική για την υποστήριξή τους και ιδιαίτερα τους Καθηγητές κ. Θ. Βασιλακόπουλο, κα Μ. Σιακαντάρη, και τους Αιματολόγους κ. Π. Τσαφταρίδη, κα Ε. Πλατά. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους Α. Μπενέκου, Π. Πέτσα, Θ. Σταθόπουλο και Κ. Κεραμάρη για την πολυεπίπεδη βοήθειά τους για την ολοκλήρωση της διατριβής.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο : Ελένη Λάλου
Ημερομηνία γεννήσεως : 11 Φεβρουαρίου 1977
Τόπος Γέννησης : Αθήνα
Εθνικότητα/Υπηκοότητα : Ελληνική/Καναδική

Τηλέφωνο : 6974642343
Διεύθυνση εργασίας : Αγ. Θωμά 17, Αθήνα, 11527, Λαϊκό
Νοσοκομείο Αθηνών
Τηλέφωνο εργασίας : 2132061508,2132061702
Ηλεκτρονικό Ταχυδρομείο : eleni_lalou@yahoo.gr

ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΘΕΣΗ

Βιολόγος, Εργαστήριο Κρυοβιολογίας, Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Λαϊκό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- **1997-2000:** Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Λάρισας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας & Πρόνοιας, **Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων**
(βαθμός πτυχίου: 8.5, «Άριστα»)
Βράβευση δύο έτη με υποτροφία από το ΙΚΥ
- **2001-2006:** Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, **Τμήμα Βιολογίας**
(βαθμός πτυχίου: 6.73, «Λίαν καλώς»)

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- **2000:** Γ.Ν.Α «**Αλεξάνδρα**», Αιμοδοσία, Βιοχημικό Εργαστήριο, Ορολογικό Εργαστήριο, Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Ανοσολογικό Εργαστήριο, Αιματολογικό Εργαστήριο
Διάρκεια εκπαίδευσης: 6 μήνες
Αντικείμενο εκπαίδευσης: Πρακτική άσκηση Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων

- **2009:** **Hôpitaux Universitaires de Genève, Unité d'Hématologie clinique, Laboratoire Central d'Hématologie, Γενεύη, Ελβετία**
Διάρκεια εκπαίδευσης: 3 μήνες
Αντικείμενο εκπαίδευσης:
 - Επεξεργασία και κρυσυντήρηση αιμοποιητικών κυττάρων ομφαλίου λώρου και αιμοποιητικών κυττάρων και T-λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος προς Αλλογενή Μεταμόσχευση Μυελού των οστών
 - Ποιοτικός Έλεγχος σύμφωνα με το EBMT και τα Ευρωπαϊκά πρότυπα (πρότυπο JACIE).
 - Κρυσυντήρηση αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος προς Αυτόλογη μεταμόσχευση Μυελού των Οστών (Transfusion Blood Center, Λωζάνη, Ελβετία)

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **2002-2007:** Π.Γ.Ν Αθηνών «**ΛΑΪΚΟ**», Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας, **Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας**, Θέση Μόνιμου Υπαλλήλου, Κλάδος ΤΕ Ιατρικών Εργαστηρίων

- **2007-2008:** Π.Γ.Ν Αθηνών «**ΛΑΪΚΟ**», Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας, **Μονάδα Προγεννητικού Ελέγχου**, Θέση Μόνιμου Υπαλλήλου, Κλάδος ΠΕ Βιολόγων

- **2008-σήμερα:** Π.Γ.Ν Αθηνών «**ΛΑΪΚΟ**», Αιματολογική Κλινική, **Εργαστήριο Κρυσκατάψυξης Αιμοποιητικών Κυττάρων**, Θέση Μόνιμου Υπαλλήλου, Κλάδος ΠΕ Βιολόγων

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

1. ΠΤΥΧΙΑΚΕΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

- **1999:** «Προγεννητικός Έλεγχος», Σεμινάριο Τελειοφοίτων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Λάρισας
- **2000:** «Καρκίνος μαστού», Πτυχιακή Εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Λάρισας
- **2006:** «Χαρακτηρισμός σημειακών μεταλλαγών που προκαλούν αιμοσφαιρινοπάθειες», Διπλωματική Εργασία, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2. ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

- **2006:** “Hb Complutence, $\beta 127$ (H5) Gln→Glu, first presentation in the Greek population”
Lalou E¹, Karababa Ph¹, Boussiou M¹, Samoili-Dutto P², Gyparaki M¹, Loutradi-Anagnostou A¹. ¹Unit of Prenatal Diagnosis, National Thalassemia Center, “Laikon” General Hospital, Athens, Greece. ²Unit of Prevention, Thalassemia Center, Corfu General Hospital
- 10th International Conference on Haemoglobinopathies & 12th International TIF for Thalassemia Patients and Parents , Dubai, United Arab Emirates
- **2007:** «Hb Beograd: $\beta 121$ GAA→GTA, Glu→Val, πρώτη αναφορά στον Ελληνικό πληθυσμό»
Λάλου, Φ. Καραμπάμπα, Μ. Γυπαράκι, Χ. Παπανικολάου, Μ. Μπουσίου. Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, Προγεννητική Διάγνωση, ΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ».
- 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- **2007:** «Ανίχνευση πολυμορφισμών και σπανίων νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων στην περιοχή του β-γονιδίου στην Ελλάδα»

Φ. Καράμπαμπα, Μ. Μπουσίου, Ε. Λάλου, Κ. Σινοπούλου, Α. Λουτράδη-Αναγνώστου. Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, Προγεννητική Διάγνωση, ΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ»

- 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη

• **2014: «Η κατ' επίκληση χορήγηση του plerixafor : επιτυχής κινητοποίηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων»**

Ε. Λάλου¹, Β. Τελώνης¹, Α. Ζάννου¹, Α. Δημητρακοπούλου², Θ. Βασιλακόπουλος¹, Π. Τσιρκινίδης³, Γ. Μπούτσικας¹, Ι. Ασημακόπουλος¹, Π. Τσαφταρίδης¹, Ζ. Γαλάνη¹, Μ. Μοσχογιάννη⁴, Π. Τσιριγώτης⁵, Φ. Κοντοπίδου⁶, Κ. Αναργύρου⁷, Σ. Σαχανάς⁴, Α. Κούτση¹, Π. Φλεβάρη¹, Γ. Γκαϊνάρου¹, Λ. Παπαγεωργίου¹, Ε. Πλατά¹, Ν-Α Βύνιου⁸, Π. Παναγιωτίδης⁹, Μ-Χ Κυρτσώνη⁹, Α. Σαρρής¹⁰, Κ. Κωνσταντόπουλος¹, Μ. Αγγελοπούλου¹

- 25^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη

3. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

• **2005: «Hb Complutense, β127 (H5) Gln→Glu, πρώτη αναφορά στον ελληνικό πληθυσμό»**

Ε. Λάλου, Φ. Καράμπαμπα, Μ. Μπουσίου, Π. Σαμοίλη-Dutto¹, Μ. Γυπαράκι, Α. Λουτράδη Αναγνώστου. Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, Προγεννητική Διάγνωση, ΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ», ¹Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας Κέρκυρας, Γενικό Νοσοκομείο Κέρκυρας

- 16^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη

• **2006: «Μια νέα β⁰ μεταλλαγή, η CD7(G→T) σε άτομο αλβανικής καταγωγής. Πρώτη αναφορά παγκοσμίως»**

Κ. Σινοπούλου, Ε. Λάλου, Φ. Καράμπαμπα, Μ. Μπουσίου, Μ. Παπαδάκης, Μ. Θεοδωρίδου¹, Α. Καραφουλίδου. Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, Προγεννητική Διάγνωση, ΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ», ¹Κέντρο Αιμοδοσίας, Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ».

- 17^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα

- **2007: «Hb Pontos, μια νέα αιμοσφαιρινική παραλλαγή β131 (H9), CAG→CAC, Gln→His»**

Φ. Καράμπαμπα, Ε. Λάλου, Π. Σαμοίλη-Dutto¹, Μ. Γυπαράκι, Κ. Σινοπούλου, Ε. Πλατά, Μ. Μπουσίου. Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, Προγεννητική Διάγνωση, ΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ». ¹Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας Κέρκυρας, Γενικό Νοσοκομείο Κέρκυρας
 - 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη

4. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Bone metabolism markers and angiogenic cytokines as regulators of human hematopoietic stem cell mobilization.

Tsirkinidis P, Terpos E, Boutsikas G, Papatheodorou A, Anargyrou K, Lalou E, Dimitrakopoulou A, Kalpadakis C, Konstantopoulos K, Siakantaris M, Panayiotidis P, Pangalis G, Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos T, Angelopoulou MK. *J Bone Miner Metab.* 2018 Jul;36(4):399-409. doi: 10.1007/s00774-017-0853-4. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28660376

2. Study of bone metabolism and angiogenesis in patients undergoing high-dose chemotherapy/autologous hematopoietic stem cell transplantation.

Boutsikas G, Terpos E, Papatheodorou A, Tsirkinidis P, Tsirigotis P, Meletiou A, Lalou E, Telonis V, Zannou A, Kanellopoulos A, Galani Z, Stefanou A, Tsaftaridis P, Viniou NA, Panayiotidis P, Kyrtsonis MC, Meletis J, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK. *Eur J Haematol.* 2018 Feb;100(2):131-139. doi: 10.1111/ejh.12990. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29105864

3. The effect of cryopreservation on the viability and apoptosis of hematopoietic stem cells: reap-appraisal by a single center experience

Lalou E, Makrakis G, Dimitrakopoulou A, Gkasouka P, Triantafyllou E-F., Efstathopoulou M., Konstantinou I., Galopoulos D., Asimakopoulos J.V., Petsa P., Benekou A., Siakantaris M.P., Tsourouflis G., Kafasi N., Vassilakopoulos T.P., Konstantopoulos K., Angelopoulou M.K. *Haema Journal.* Accepted on 7th December 2020.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	19
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	21

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ – ΝΕΚΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	
1.1 Γενικά	29
1.2 Νέκρωση	29
1.3 Απόπτωση	30
1.4 Μεταβολές της κυτταρικής μεμβράνης κατά τον κυτταρικό θάνατο	38
1.5 Νέκρωση και απόπτωση κατά την κρουκατάψυξη και απόψυξη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	40
1.6 Το «σημείο χωρίς επιστροφή»	47
1.7 Είναι αντιστρεπτή η απόπτωση;	49

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Ασθενείς και δείγματα	54
2.1.1 Κινητοποίηση AAK περιφερικού αίματος	54
2.1.2 Μέτρηση CD34+/μl στο περιφερικό αίμα πριν τη συλλογή	55
2.1.3 Συλλογή AAK	56
2.1.4 Μέτρηση CD34+/Kg στο προϊόν συλλογής	56
2.1.5 Κρουσυντήρηση προϊόντος συλλογής	57
2.1.6 Μεγαθεραπεία	58

2.1.7 Απόψυξη και έγχυση CD34+ κυττάρων	58
2.2 Μέθοδοι	59
2.2.1 Απόψυξη δειγμάτων	59
2.2.2 Μέτρηση βιωσιμότητας και απόπτωσης κυτταρικών πληθυσμών	61
2.2.3 Στατιστική μέθοδος	66
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Γενικά	70
3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών	70
3.2 Συλλογή και κρυοσυντήρηση AAK	70
3.2.1 Κινητοποίηση AAK περιφερικού αίματος	70
3.2.2 Συλλογή AAK περιφερικού αίματος	74
3.2.3 Καταμέτρηση AAK στο προϊόν της συλλογής	76
3.2.4 Κρυοκατάψυξη προϊόντος συλλογής	78
3.3 Αυτόλογη μεταμόσχευση AAK	80
3.3.1 Γενικά	80
3.3.2 Αποκατάσταση Αιμοποίησης - Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων	81
3.3.3 Αποκατάσταση Αιμοποίησης - Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων	85
3.3.4 Αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών στην AMMO	88
3.3.5 Αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του μοσχεύματος	92
3.3.6 Αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των CD34+/Kg που χορηγήθηκαν στην AMMO	97
3.4 Βιωσιμότητα και απόπτωση αποψυγμένων AAK	99
3.4.1 Γενικά	99
3.4.2 Βιωσιμότητα και απόπτωση των CD45+ και CD34+ κυττάρων	101
3.4.3 Σύγκριση βιωσιμότητας με Trypan Blue έναντι βιωσιμότητας με	

FACS	103
3.4.4 Παράγοντες που επηρέασαν τη βιωσιμότητα και την απόπτωση των AAK	110
3.4.5 Επίδραση της βιωσιμότητας και της απόπτωσης στην έκβαση της AMMO	126
3.5 Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO	151
3.5.1 Γενικά	151
3.5.2 Έλεγχος της επίδρασης παραγόντων στην ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση με διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση	161
3.5.3 Βέλτιστη ελάχιστη δόση CD34+/Kg για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση	177
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	192
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	257
ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	267
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	268
ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	274
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	279
ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ	280
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	299

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κρυσυντήρηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με σκοπό την αυτόλογη μεταμόσχευση αποτελεί το σκέλος μιας συνολικής προσπάθειας μιας ομάδας επιστημόνων, τόσο του ιατρικού όσο και του εργαστηριακού κλάδου. Η κρυσυντήρηση, δεν αποτελεί το πιο δύσκολο στάδιο, είναι όμως – μαζί με την απόψυξη – το πιο κρίσιμο, αφού κανένα λάθος δε συγχωρείται. Το μόσχευμα που συλλέγεται, κρυοκαταψύχεται και φυλάσσεται για ένα σύντομο ή μακρύ χρονικό διάστημα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, αποψύχεται και εγχύεται «τυφλά», με την ευθύνη του εργαστηριακού επιστήμονα. Αν και στην κλινική πράξη, ως εργαστηριακή τεχνική θεωρείται απλή, χρειάζεται επιστημονική εξειδίκευση, ικανότητα και εμπειρία, αλλά κυρίως, απαιτεί διαρκή επαγρύπνηση και υπευθυνότητα.

Τα τελευταία 13 χρόνια η συλλογή και η κρυοκατάψυξη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, αποτελεί την αποκλειστική μου επιστημονική απασχόληση. Παρά την ασφάλεια που προσφέρει η τεράστια εμπειρία που έχει αποκτηθεί μετά από περίπου 900 συλλογές και κρυοκαταψύξεις, ο εφησυχασμός σε μια διαδικασία ρουτίνας δεν είναι επιλογή. Η αναζήτηση εκείνων των παραμέτρων, που μπορούν να εξασφαλίσουν ένα ακόμα καλύτερο αποτέλεσμα αλλά, πρωτίστως, να προλάβουν μια κακή έκβαση στη μεταμόσχευση, είναι διαρκής. Μέσα από αυτήν την αναζήτηση προέκυψε αρχικά εμπειρικά η συσχέτιση χαρακτηριστικών των ασθενών και των κρυοκατεψυγμένων προϊόντων συλλογής AAK με τη κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης στην AMMO. Η επιβεβαίωση των παραπάνω παρατηρήσεων μέσω τη συσχέτισή τους με τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά την κρυσυντήρηση, είναι το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης. Η καθηγήτρια Μ. Αγγελούπουλου, η οποία ως επικεφαλής της ΜΜΜΟ της Αιματολογικής Κλινικής, συμμερίζεται το άγχος και την προσπάθεια μου για το βέλτιστο κάθε φορά αποτέλεσμα, μου εμπιστεύθηκε αυτό το έργο, το οποίο στήριξε με κάθε τρόπο.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

7-AAD	7-actinomycin
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease
CLP	Common lymphoid precursor
CMP	Common myeloid precursor
DISC	Death-inducing signaling complex
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
FACS	Flow cytometry, Κυτταρομετρία ροής
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FL	Follicular lymphoma
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
HL	Hodgkin's Lymphoma
HPC	Hematopoietic progenitor cell
HSC	Hematopoietic Stem Cell
ICAD	Caspase-activated deoxyribonuclease inhibitor
LTC-ICs	Long-term culture-initiating cells
LT-HSC	Long-term Hematopoietic Stem Cell
MAPs	Microtubule-associated proteins
MCL	Mantle cell lymphoma
MM	Multiple myeloma
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeability
NHL	Non- Hodgkin's Lymphoma
PLT	Platelets
PMN	Polymorphonuclear cells
PTP	Permeability transition pore
ROS	Reactive Oxygen Species
ST-HSC	Short-term Hematopoietic Stem Cell
TB	Trypan Blue

T-NHL	T-cell non- Hodgkin's Lymphoma
WBC	White blood cells
AAK	Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
AMAAK	Αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
AMMO	Αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΑΠΟ ΑΛΛΕΣ ΠΗΓΕΣ

Εικ 1.1	10.1016/B978-0-12-394309-5.00003-1 (1)
Εικ. 2.2α	http://medical.tpub.com/14295cssFigure-7-16-Hemacytometer-Counting-Chamber-279.htm
Εικ. 2.2β	https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=50SwlYkDxEQ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η θεωρία της ύπαρξης ενός κοινού προγόνου για όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος προτάθηκε αρχικά από τον Neuman και εδραιώθηκε από τον Maximow το 1909, ο οποίος εισήγαγε τον όρο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (AAK, HSC: hematopoietic stem cell) (2). Τρία λειτουργικά κριτήρια οφείλουν να υφίστανται ταυτόχρονα για τον ορισμό ενός κυττάρου ως αρχέγονο (στελεχιαίο) αιμοποιητικό: στο επίπεδο του ενός κυττάρου, να υπάρχει η ικανότητα της δια βίου αυτοανανέωσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης προς όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος (3-5). Μορφολογικά το AAK μοιάζει με λεμφοβλάστη, είναι μικρομεσαίου μεγέθους μονοπύρηνο κύτταρο με άωρο πυρήνα, επικρατή πυρηνίσκο και ελάχιστο, βασεόφιλο, ακοκκιοκυτταρικό κυτταρόπλασμα (2).

Τα AAK φαίνεται πως έχουν κοινό πρόγονο με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τον αιμαγγειοβλάστη, ένα αγγειοαιμοποιητικό προγονικό κύτταρο του μέσου βλαστικού δέρματος (6-8). Κατά την εμβρυογένεση ο λεκιθικός σάκος αποτελεί τη μοναδική θέση de novo σχηματισμού τους από την οποία τροφοδοτούνται όλοι οι αιμοποιητικοί ιστοί (9). Τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα που σχηματίζονται στο λεκιθικό σάκο κατά την έναρξη της αιμοποίησης την 3η εβδομάδα της κύησης, μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο προς την μυελική και την ερυθρά σειρά, σε αντίθεση με τα κύτταρα, που γεννώνται στο έμβρυο λίγο πριν την έναρξη της αιμοποίησης στο ήπαρ, κατά την 5η εβδομάδα της κύησης, και τα οποία διαφοροποιούνται και προς τη λεμφική σειρά. Τα τελευταία αντιπροσωπεύουν τα πρώτα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (10).

Τα AAK χαρακτηρίζονται ως μονάδες μακροπρόθεσμης αιμοποιητικής ανασύστασης. Είναι τα πιο άωρα κύτταρα με το μεγαλύτερο δυναμικό αυτοανανέωσης μεταξύ των αιμοποιητικών κυττάρων και με μοναδική ικανότητα να παράγουν δευτερογενή αρχέγονα προγονικά κύτταρα με δυνατότητα διαφοροποίησης προς πολλαπλές αιμοποιητικές σειρές. Υπολογίζεται ότι αφορούν το $1/10^4$ - 10^5 των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού (11). Ονομάστηκαν LTC-ICs (long-term culture-initiating cells) δεδομένης της in vitro ιδιότητάς τους να διατηρούν την δυνατότητα σχηματισμού αποικιών υπό κατάλληλες συνθήκες σε καλλιεργητικό μέσο για τουλάχιστον 5 εβδομάδες. Ως πολυδύναμα κύτταρα, είναι

ικανά να παράγουν περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα καταλήγοντας μετά από περισσότερα του ενός στάδια διαφοροποίησης στην παραγωγή ώριμων κυττάρων όλων των κυτταρικών σειρών του αίματος (4, 5, 12). Άμεσος απόγονος του AAK είναι το προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο (HPC), που διατηρεί μικρή ικανότητα αυτοανανέωσης αλλά είναι επίσης πολυδύναμο και διαφοροποιείται σε μορφολογικά αναγνωρίσιμα πλέον προγονικά κύτταρα, τα οποία δεσμευμένα προς μια κυτταρική σειρά και μέσω της αντίστοιχης αλληλουχίας βημάτων ωρίμανσης καταλήγουν ως ώριμα κύτταρα στην περιφέρεια (εικ. 1.1) (1, 13). Μέσω της διαφοροποίησης σε ενδιάμεσους προγονικούς πληθυσμούς ένας σχετικά μικρός αριθμητικά πληθυσμός AAK μπορεί να δώσει γένεση σε ένα τεράστιο αναλογικά αριθμό ώριμων κυττάρων (5, 12).

Δύο είναι οι βασικοί τύποι προγονικών κυττάρων: το προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς (λεμφικό στελεχειαίο κύτταρο, common lymphoid precursor, CLP), που αποτελεί το 0,02% των κυττάρων του μυελού και το προγονικό κύτταρο της μυελικής ή αιμοποιητικής σειράς (common myeloid precursor, CMP, CFU-GEMM), που αποτελεί το 0,1% των κυττάρων του μυελού (10). Ο αριθμός των αιμοποιητικών σειρών προς τις οποίες μπορούν τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα των τριών βαθμίδων (HSC→HPC→CLP/CMP) να διαφοροποιηθούν περιορίζεται προοδευτικά, οπότε δεσμεύονται τελικά και μη αντιστρεπτά προς μια αιμοποιητική σειρά (5, 7, 14). Δεδομένου ότι η αιμοποίηση αποτελεί μια συνεχή δυναμική διαδικασία, στον φυσιολογικό μυελό των οστών την ίδια στιγμή βρίσκονται κύτταρα από όλα τα στάδια διαφοροποίησης (13).

Όλα τα HSC και HPC εκφράζουν τον επιφανειακό δείκτη CD34, μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 90-120kD, με θεμελιώδη ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του μυελού (13, 15, 16). Η ένταση της έκφρασης του δείκτη CD34 ελαττώνεται όσο αυξάνεται η ωρίμανση, με αποτέλεσμα τα αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα να έχουν την υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τους μορφολογικά αναγνωρίσιμους βλάστες, στους οποίους η έκφραση είναι χαμηλότερη (17).

Τα αιμοποιητικά κύτταρα εντοπίζονται στον λειτουργικό ερυθρό μυελό των οστών σε ειδικά διαμερίσματα του μικροπεριβάλλοντος του στρώματος, τις «φωλιές» ή «εσοχές» (18). Η θεωρία της αιμοποιητικής νησίδας προτάθηκε από

τον Schofield το 1978 προκειμένου να περιγραφεί το μικροπεριβάλλον, του οποίου τα ιδιαίτερα χωροταξικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά επιτρέπουν και ευνοούν στα αιμοποιητικά κύτταρα να εγκαθίστανται και να αναπτύσσονται (1, 18). Τα AAK συνυπάρχουν με μεσεγχυματικά και ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα αλλά κυρίως βρίσκονται κοντά στο ενδόστεο σε στενή επαφή με τους οστεοβλάστες (18-20).

Εκεί παράγουν τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν προς το αγγειακό διαμέρισμα στο κέντρο της μυελικής κυψελίδας όπου διαφοροποιούνται και ωριμάζουν (10). Η κατανομή των αιμοποιητικών κυττάρων, αρχέγονων και προγονικών, όπως και των ώριμων κυττάρων δεν είναι καθόλου τυχαία (2). Μετά τη επανέγχυση και την εγκατάστασή τους στο μυελό, τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα διαφορετικών ιεραρχικών βαθμίδων παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα εγκατάστασης. Παρότι μια ώρα μετά την έγχυση η πλειοψηφία των αιμοποιητικών κυττάρων εντοπίζεται στην κεντρική περιοχή του μυελού, τα AAK ανακατανέμονται κοντά στο ενδόστεο, ενώ τα προγονικά και διαφοροποιημένα κύτταρα παραμένουν στην αρχική τους θέση (21).

Στα αρχικά στάδια της ζωής, αιμοποιητικά κύτταρα εντοπίζονται σχεδόν σε όλες τις μυελικές κοιλότητες, μετά τα πρώτα τέσσερα έτη όμως, ο ερυθρός μυελός αντικαθίσταται από λιποκύτταρα και μετατρέπεται σε κίτρινο μυελό, εκτός από τις κοιλότητες του θόλου του κρανίου, των πλευρών, του στέρνου, των ωμοπλάτων, των σπονδύλων, της πυέλου, του άνω ήμισυ του ιερού και των εγγύς άκρων των μακρών οστών (10). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η κύρια θέση των αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων είναι ο μυελός των οστών όπου συνιστούν το 0,005% των κυττάρων του (2, 22). Εξέρχονται όταν ωριμάσουν, ώστε να αντικαταστήσουν γερασμένα ή κατεστραμμένα κύτταρα του περιφερικού αίματος ή πριν ωριμάσουν, υπό συνθήκες stress, όπως η άσκηση ή η φλεγμονή ή υπό την επίδραση εξωγενώς χορηγούμενων αυξητικών παραγόντων (10). Φυσιολογικά, προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα υπάρχουν σε εξαιρετικά μικρή συχνότητα στην περιφέρεια, περίπου σε ποσοστό 0,06% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του αίματος (2, 22)

Η μεθεταμόσχευση ακολουθούμενη από αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αίματος αποτελεί βασική θεραπευτική στρατηγική σε αιματολογικές κακοήθειες, κυρίως το λέμφωμα Hodgkin σε υποτροπή, τα μη

Hodgkin λεμφώματα σε υποτροπή, το πολλαπλό μυέλωμα, την αμυλοείδωση και την οξεία μυελική λευχαιμία σε 1^η ύφεση (10).

Σήμερα, βασική πηγή αυτόλογης μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AMAAK) αποτελεί το περιφερικό αίμα, στο οποίο τα AAK μπορούν να κινητοποιηθούν με χορήγηση αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων με ή χωρίς τη χορήγηση χημειοθεραπείας (23, 24). Η καταμέτρηση των AAK στο αίμα με τον προσδιορισμό των κυκλοφορούντων CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής αποτελεί την παράμετρο εκείνη που καθορίζει τη χρονική στιγμή της συλλογής τους. Η συλλογή των AAK γίνεται με τη μέθοδο της λευκαφαίρεσης (συλλογή των μονοπύρηνων κυττάρων) σε μηχανήμα κυτταρικού διαχωρισμού συνεχούς ροής. Ακολουθεί η διαδικασία της κλασματικής κατάψυξης έως -160°C και η φύλαξη του μοσχεύματος επ' αόριστον χωρίς μεγάλη απώλεια αριθμού ή λειτουργικότητας των AAK στην αέρια φάση υγρού αζώτου. Κατά την μεταμόσχευση το μόσχευμα που περιέχει τα AAK αποψύχεται σε υδατόλουτρο 37°C και εγχύεται γρήγορα ενδοφλεβίως στον ασθενή τουλάχιστον ένα 24ωρο μετά την λήξη της μεγαθεραπείας (10).

Τα σχήματα προετοιμασίας (το είδος της μεγαθεραπείας) που χρησιμοποιούνται στην αυτόλογη μεταμόσχευση, σχεδιάζονται έτσι ώστε να επιτύχουν τη μέγιστη δυνατή συνολική δόση για κάθε φάρμακο, συνδυάζουν ουσίες με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης και μη διασταυρούμενη αντοχή, έτσι ώστε να αποφεύγεται η επιλογή ανθεκτικών κλώνων, συνδυάζουν φάρμακα με μη αλληλεπικαλυπτόμενη τοξικότητα από τα άλλα όργανα πλην της αιματολογικής, έτσι ώστε να είναι δυνατή η χορήγησης της πλήρους δόσεως κάθε φαρμάκου, και έχουν σκοπό την επίτευξη της μέγιστης αντινεοπλασματικής δράσης. Ταυτόχρονα, είναι μυελοκατασταλτικά, με αποτέλεσμα η επαναχορήγηση επαρκούς αριθμού λειτουργικών AAK να είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ασθενή (10).

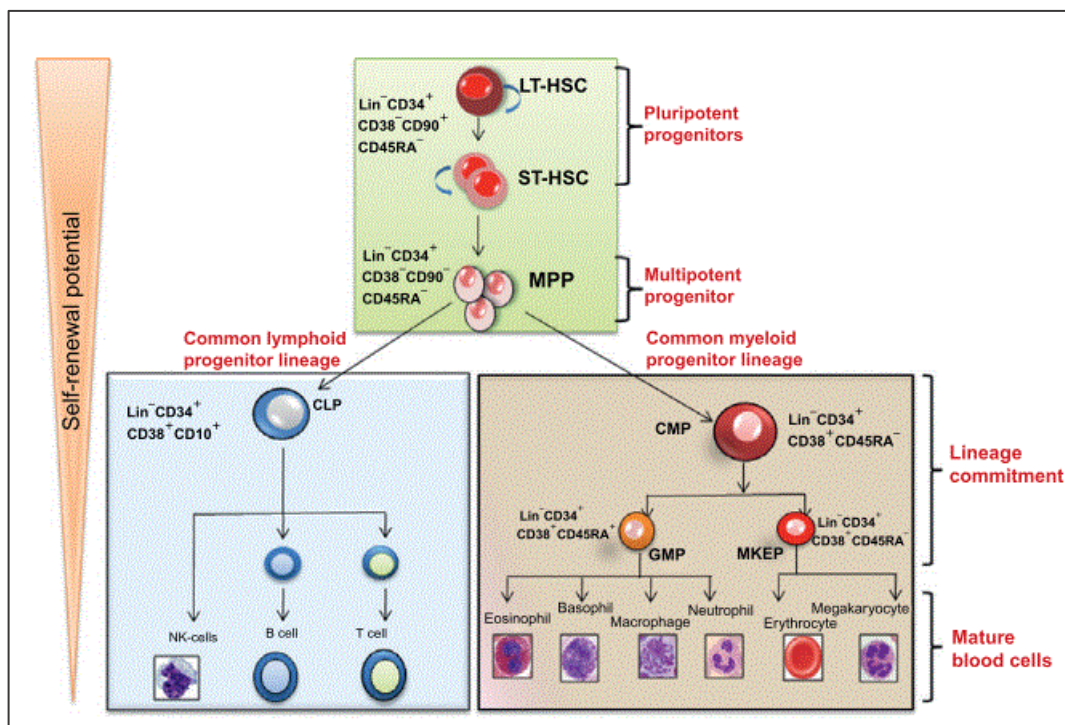
Στη μεταμόσχευση μυελού των οστών και τα προγονικά κύτταρα των κυτταρικών σειρών και τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα εγκατάστασης στο μυελό όμως, τα πρώτα συμβάλλουν στην κάλυψη της ανάγκης για άμεση αιμοποίηση και για μερικές (1-3) μόνο εβδομάδες (ST-HSC, short-term HSC), ενώ τα δεύτερα είναι εκείνα που υποστηρίζουν την μακροπρόθεσμη αιμοποίηση (LT-HSC, long-term HSC) (1, 18, 25). Σε αντίθεση με τα ST-HSCs που

πολλαπλασιάζονται ταχέως αλλά έχουν περιορισμένη δυνατότητα αυτοανανέωσης και άρα επιζούν για μικρότερο χρονικό διάστημα, τα LT-HSC, που χαρακτηρίζονται από δια βίου δυνατότητα αυτοανανέωσης, αρχικά διατηρούνται σε ηρεμία ή ως βραδέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ενώ τελικά ισορροπούν μεταξύ αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης προκειμένου να διατηρείται η δεξαμενή των AAK (1, 26). Φαίνεται επίσης πως μεταξύ των LT-HSC συνυπάρχουν δύο πληθυσμοί «διαφορετικών ταχυτήτων»: ο πληθυσμός που υπερισχύει αριθμητικά, βρίσκεται σε ηρεμία ενώ ο δεύτερος, που αποτελεί το ένα τέταρτο του συνολικού πληθυσμού των LT-HSC, βρίσκεται σε φάση πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Ουσιαστικά όμως η αποκατάσταση της αιμοποίησης μετά τη μεταμόσχευση εξαρτάται από την ύπαρξη του πληθυσμού σε ηρεμία (26).

Η αρχική φάση από την έγχυση του μοσχεύματος μέχρι την εγκατάσταση του μοσχεύματος (απλαστική φάση) χαρακτηρίζεται από ουδετεροπενία - μονοκυττοπενία και λεμφοπενία και διαρκεί κατά μέσο όρο 2 εβδομάδες μετά την έγχυση των AAK. Τα πρώτα κύτταρα που αποκαθίστανται είναι τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, εντός 15 ημερών. Στη συνέχεια ο πρώτος λεμφικός πληθυσμός που αποκαθίσταται είναι αυτός των κυττάρων φυσικοί φορείς (NK) εντός 1 μηνός. Η αποκατάσταση των B και T λεμφοκυττάρων καθυστερεί για μήνες έως και έτη μετά τη μεταμόσχευση. Έτσι τα B λεμφοκύτταρα επανέρχονται σε φυσιολογικό αριθμό 6-9 μήνες μετά, ενώ η ανοσοσφαιρίνη M στους 3-6 μήνες, η IgG στους 12-24 μήνες και η IgA στα 2 έτη. Ο συνολικός αριθμός των T λεμφοκυττάρων επανέρχεται στους 3 μήνες, αλλά ο απόλυτος αριθμός των CD4 βοηθητικών λεμφοκυττάρων παραμένει χαμηλός πέραν του έτους. Η περαιτέρω μελέτη των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων καταδεικνύει ότι τα CD4+CD45RA+ (παρθένα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα) παραμένουν μειωμένα πέραν του έτους, ενώ τα CD8+CD45RA+ (κατασταλτικά παρθένα λεμφοκύτταρα) επανέρχονται εντός 3μήνου. Ως επακόλουθο, οι λοιμώξεις συνεχίζουν να αποτελούν βασική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε αυτόλογη AAK. Το είδος των μικροοργανισμών και των λοιμώξεων εξαρτώνται από τη χρονική φάση της μεταμόσχευσης και από την ανοσολογική αποκατάσταση στην αντίστοιχη χρονική περίοδο.

Η ταχεία και ολοκληρωμένη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων αποτελεί το ορόσημο της επιτυχημένης αιματολογικής αποκατάστασης έπειτα από την αυτόλογη μεταμόσχευση κινητοποιημένων αιμοποιητικών κυττάρων (27). Ως ελάχιστος αριθμός των CD34+ κυττάρων από το αίμα που απαιτείται για την επαρκή αποκατάσταση της αιμοποίησης θεωρούνται τα 2×10^6 /kg ΒΣ. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός αυτός τόσο ταχύτερη είναι η αποκατάσταση της αιμοποίησης, ειδικά όσο αφορά τα αιμοπετάλια, μέχρι το όριο των 5×10^6 /kg ΒΣ. Πέραν του ορίου αυτού δεν υφίσταται περαιτέρω πλεονέκτημα.

Οι λόγοι που οδηγούν σε μεγαλύτερη, από την αναμενόμενη, μείωση της βιωσιμότητας, και σε απόπτωση των κρυοκατεψυγμένων κυττάρων δεν έχουν ευρέως μελετηθεί. Δεδομένης της κλινικής σημασίας της απώλειας της βιωσιμότητας των κυτταρικών προϊόντων που εγχύονται στην ΑΜΜΟ, η διερεύνησή τους είναι σημαντική.



Εικόνα 1.1 Ιεραρχία αιμοποιητικών κυττάρων στον άνθρωπο και βασικοί επιφανειακοί δείκτες. Τα LT-HSC (long-term HSCs) βρίσκονται στην κορυφή της ιεραρχίας και θεωρούνται τα πιο αρχέγονα κύτταρα, με ικανότητα δια βίου αυτοανανέωσης. Τα LT-HSC δίνουν γένεση στα ST-HSCs (short-term repopulating HSCs), τα οποία διαφοροποιούνται σε MPPs (multipotent progenitors). Η ικανότητα αυτοανανέωσης μειώνεται με τη διαδοχική διαφοροποίηση του κυττάρου. Τα MPPs δίνουν γένεση σε μονοδύναμα προγονικά κύτταρα, δεσμευμένα προς συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα επιφανειακά αντιγόνα χαρακτηρίζουν τα προγονικά κύτταρα διαφορετικής ιεραρχίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ – ΝΕΚΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

1.1. Γενικά

Η νέκρωση και η απόπτωση αποτελούν δυο διαφορετικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Αν και αποτελούν τους δύο ευρέως βασικούς αποδεκτούς μηχανισμούς, τα τελευταία χρόνια έχει τεκμηριωθεί επιστημονικά, πως ένα κύτταρο μπορεί να πεθάνει μέσω περισσότερων διαφορετικών διακριτών οδών, οι οποίες είτε υπόκεινται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς και είναι ενεργειακά εξαρτώμενες (π.χ. απόπτωση, πυρόπτωση και αυτοφαγία) είτε είναι ενεργειακά ανεξάρτητες (π.χ. νέκρωση), και μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους βάσει μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών (28, 29). Η νέκρωση - ο «ατυχηματικός» κυτταρικός θάνατος - είναι η παθολογική, παθητική διαδικασία στην οποία υποβάλλονται τα κύτταρα όταν εκτίθενται σε σοβαρές φυσικές ή χημικές επιθέσεις. Η απόπτωση αντίθετα - “φυσιολογικός” ή “προγραμματισμένος” κυτταρικός θάνατος - είναι η φυσιολογική, εκούσια διαδικασία με την οποία ανεπιθύμητα ή άχρηστα κύτταρα εξαλείφονται (30).

1.2. Νέκρωση

Ως νέκρωση χαρακτηρίζεται ο «ξαφνικός», μη αναστρέψιμος, και μη ελεγχόμενος θάνατος του κυττάρου, με τη μορφή της αδιάτακτης αποδόμησης της πλασματικής μεμβράνης και της διάχυσης του κυτταρικού περιεχομένου (29-32). Το κύτταρο αποτελεί παθητικό δέκτη μιας ενεργειακά ανεξάρτητης διαδικασίας κατά την οποία, έπειτα από έκθεσή του σε έντονα διαφοροποιημένες από τις φυσιολογικές συνθήκες, όπως η υποξία, η ακραία αυξημένη ή ελαττωμένη θερμοκρασία και η μηχανική καταπόνηση και εξαιτίας της αδυναμίας του να διατηρήσει την ομοιόσταση του και τη συνοχή της πλασματικής του μεμβράνης καταλήγει σε εισροή ύδατος και εξωκυτταρικών ιόντων (28, 33). Συνεπακόλουθα, το κύτταρο και τα ενδοκυτταρικά οργανίδια, κυρίως τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα, διογκώνονται και διαρρηγνύονται (κυτταρική λύση) και το κυτταρικό περιεχόμενο συμπεριλαμβανομένων και των λυσοσωμικών ενζύμων

απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον (28, 30, 33). Στις βασικές μορφολογικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τη νέκρωση συμπεριλαμβάνονται επίσης ο σχηματισμός κυτταροπλασματικών κενοδοσίων, η διόγκωση του ενδοπλασματικού δικτύου, η διαίρεση και αποκόλληση των ριβοσωμάτων, ενώ στο φάσμα των μορφολογικών αλλαγών, συγκαταλέγονται η πύκνωση και ο κατακερματισμός του πυρήνα, τα οποία δεν αποτελούν αποκλειστικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης (33). Το κύτταρο νεκρώνεται μέσω δύο βασικών μηχανισμών: έμμεσα από την εξάντληση της κυτταρικής ενέργειας, κατά την κατάλυση της επιδιόρθωσης των πολλαπλών βλαβών του DNA, που συμβαίνουν κατά τον κυτταρικό τραυματισμό, και άμεσα από τη δυσλειτουργία της πλασματικής μεμβράνης (28, 33). Η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου, αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της νέκρωσης, οφείλεται στην εισροή τους εντός του κυττάρου διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης και ενεργοποιεί πρωτεάσες αποδόμησης βασικών πρωτεϊνών. Το οξειδωτικό στρες, μη λυσοσωμικές πρωτεάσες εξαρτώμενες από το ασβέστιο (καλπαΐνες), και καθεψίνες μεσολαβούν επίσης στη νέκρωση του κυττάρου (28). In vivo, η απελευθέρωση του κυτταροπλασματικού περιεχομένου κατά την κυτταρική λύση στους περιβάλλοντες ιστούς, οδηγεί στην απελευθέρωση ενδοκυτταρικών μορίων γνωστών ως DAMPs (damage-associated molecular patterns) (28, 34, 35), τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία και ενεργοποιούν μέσω χημειοταξίας κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (33).

1.3. Απόπτωση

Η χαρακτηριστική μορφολογική εικόνα του αποπτωτικού κυττάρου οδήγησε τους Kerr, Wyllie και Currie, το 1972, να υποστηρίξουν την ιδέα μιας διακριτής μορφής κυτταρικού θανάτου, η οποία υφίσταται ως φυσιολογικός μηχανισμός απόρριψης των μη επιθυμητών πλέον κυττάρων, είτε κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη είτε κατά την ανακύκλωση των κυττάρων, τόσο σε υγιής αναπτυσσόμενους ιστούς όσο και σε παθολογικούς ιστούς (29, 31, 33). Ο όρος απόπτωση προτάθηκε από τους Kerr και συν. βρίσκοντας ευρεία αποδοχή έκτοτε (31, 35, 36).

Ως απόπτωση χαρακτηρίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η απόπτωση, παρόλο που αφορά μεμονωμένα κύτταρα, συνιστά για όλους τους

πολυκύτταρους οργανισμούς ένα φυσιολογικό μηχανισμό της ανάπτυξης των ιστών, τόσο βασικό για την ομαλή ανάπτυξη, λειτουργία και την ομοίωσταση τους, που αποτελεί μια γενετικά καθορισμένη και ενεργητική διαδικασία, εξελικτικά συντηρημένη (29, 34, 36, 37). Η απόπτωση συντελείται με την ενεργό συμμετοχή του ίδιου του κυττάρου στη επικείμενη «αυτοκτονία» του (30). Ως ομοιοστατικός μηχανισμός, καταλήγει σε εκτεταμένη απομάκρυνση κυττάρων, είτε με σκοπό τη διατήρηση του φυσιολογικού αριθμού του κυτταρικού πληθυσμού ενός ιστού, είτε με σκοπό την διατήρηση μόνο του υγιή κυτταρικού πληθυσμού, χωρίς να προκαλεί ιστική διαταραχή και, δίδοντας τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των κυτταρικών δομικών στοιχείων, συμβάλλει ταυτόχρονα στην κυτταρική οικονομία (36). Για παράδειγμα, ο ρυθμός της απόπτωσης στον μυελό των οστών του ανθρώπου είναι εντυπωσιακά υψηλός. Τα ουδετερόφιλα παράγονται διαρκώς σε μεγάλες ποσότητες αλλά η συντριπτική πλειοψηφία τους αποπίπτει στον μυελό των οστών μέσα σε λίγες μέρες. Αυτός ο φαινομενικά ανώφελος συνεχής κύκλος παραγωγής και απόπτωσης των ουδετερόφιλων εξυπηρετεί την διατήρηση ενός σταθερού πληθυσμού ουδετερόφιλων με μικρό χρόνο ζωής που μπορούν άμεσα να κινητοποιηθούν όταν χρειαστεί (38). Ουσιαστικά καμία φλεγμονώδης αντίδραση δε σχετίζεται με τη διαδικασία της απόπτωσης επειδή τα μεν αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το κυτταρικό τους περιεχόμενο στους περιβάλλοντες ενδιάμεσους ιστούς, διότι πριν καταλήξουν σε δευτερογενή νέκρωση φαγοκυτταρώνονται άμεσα από τα γειτονικά κύτταρα, τα δε γειτονικά αυτά κύτταρα δεν παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (29).

In vivo, τα αποπτωτικά σωματίδια αναγνωρίζονται γρήγορα και φαγοκυτταρώνονται, είτε από μακροφάγα είτε από γειτονικά παρεγχυματικά ή νεοπλασματικά κύτταρα, και αποδομούνται εντός φαγολυσσοσωμάτων (33). *In vitro* όμως, όπως και τα λοιπά κυτταρικά υπολείμματα, καταλήγουν να διογκώνονται και να λύνονται (30). Σε όλους τους ιστούς που έχουν μελετηθεί, η πλειοψηφία των αποπτωτικών σωματίων (βλ. παρακάτω) έχει βρεθεί στο κυτταρόπλασμα ανέπαφων κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει, πως φαγοκυτταρώνονται ταχύτατα από τα γειτονικά κύτταρα, πιθανόν εξαιτίας των αλλαγών στις ιδιότητες της πλασματικής μεμβράνης (31, 33, 36). Το φαινόμενο αυτό καθιστά δύσκολη και ελλιπή την παρακολούθηση των μορφολογικών αλλαγών που συμβαίνουν *in vivo*. Παρόλα

αυτά, οι αλλαγές που μπορούν να προκληθούν σε ένα κύτταρο από διάφορους παράγοντες *in vitro*, έχει αποδειχθεί πως αντικατοπτρίζουν τα γεγονότα που συμβαίνουν φυσιολογικά *in vivo*, και για το λόγο αυτό η έρευνα εστιάστηκε κατά κύριο λόγο στην *in vitro* μελέτη της απόπτωσης (31). Βέβαια υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες οι παρατηρήσεις μπορεί να διαφοροποιούνται από το σταθερό μοτίβο των αλλαγών που χαρακτηρίζουν την απόπτωση (31). Η απόπτωση μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί, είτε κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο, πολλές φορές με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών, είτε με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (31, 33).

Η αποπτωτική διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: μια «επαγωγική» φάση, η φύση της οποίας εξαρτάται από ειδικά σήματα, που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, μια «εκτελεστική» φάση, κατά τη οποία ενεργοποιούνται εσωτερικές διαδικασίες, που οδηγούν στη δέσμευση του κυττάρου προς τον θάνατο, και μια φάση «αποδόμησης», κατά την οποία το κύτταρο υφίσταται τις βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές της απόπτωσης (39). Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε πως οι μορφολογικές αλλαγές κατά την απόπτωση λαμβάνουν χώρα σε δύο διακριτές φάσεις: η πρώτη περιλαμβάνει τις αλλαγές μέχρι και το σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων και η δεύτερη τη φαγοκυττάρωση και την αποδόμηση αυτών από άλλα κύτταρα (36). Τα αποπτωτικά σώματα (apoptotic bodies) αποτελούν το ιστολογικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης. Είναι μικρά, περίπου σφαιρικά ή ωοειδή κυτταροπλασματικά τεμάχια, κάποια εκ των οποίων περιέχουν τμήματα συμπυκνωμένου πυρήνα (36). Κατά τα πρώτα στάδια της απόπτωσης παρατηρείται, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου, συρρίκνωση του κυττάρου (36). Το κύτταρο φαίνεται μικρότερο, το κυτταρόπλασμα είναι πυκνότερο και τα οργανίδια είναι στενά χωροθετημένα μεταξύ τους. Η πυκνωση του πυρήνα, προϊόν συμπύκνωσης της χρωματίνης και της συγκέντρωσής της σε πυκνές μάζες ακριβώς κάτω από τον πυρηνικό φάκελο, αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό γεγονός της απόπτωσης (33, 36). Έπειτα από την αποκόλληση του κυττάρου από τα υπόλοιπα κύτταρα του ιστού (33) και τον εκτεταμένο σχηματισμό χαρακτηριστικών προεκβολών της πλασματικής μεμβράνης (blebs), που ακολουθείται από τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA και του πυρήνα σε θραύσματα διαφορετικών μεγεθών, ολοκληρώνεται τελικά ο σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων (33, 36,

37). Τα αποπτωτικά σωμάτια είναι διαφόρων μεγεθών, ~1-5 μm (34) και συνίστανται από τμήμα του κυτταροπλάσματος με ακέραια οργανίδια στενά «πακεταρισμένα», με ή χωρίς τμήμα του πυρήνα, που περικλείονται από τμήμα της πλασματικής μεμβράνης (31, 33). Το περιεχόμενό τους εξαρτάται κάθε φορά από τα κυτταρικά στοιχεία, που “έτυχε” να βρίσκονται στην κυτταροπλασματική προεκβολή, που οδήγησε στο σχηματισμό τους: μικρά αποπτωτικά σωμάτια τυγχάνει να αποτελούνται αποκλειστικά από τμήμα συμπυκνωμένης χρωματίνης ενώ άλλα μόνο από κυτταροπλασματικά στοιχεία (36). Ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματίων πιστεύεται πως εξυπηρετεί τον ασφαλή τεμαχισμό του κυττάρου ώστε να μπορεί να φαγοκυτταρωθεί, εξασφαλίζοντας την απομάκρυνσή του χωρίς την απελευθέρωση του περιεχομένου του στους περιβάλλοντες ιστούς και την πυροδότηση φλεγμονώδους αντίδρασης. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί πως, ο σχηματισμός αποπτωτικών σωμάτων φαίνεται πως εξυπηρετεί την εγκόλπωση μεγαλύτερων κυττάρων καθώς αρκετοί κυτταρικοί τύποι, όπως τα θυμοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα, δε σχηματίζουν αποπτωτικά σωμάτια (34, 35). Αλλαγές στα οργανίδια κατά την απόπτωση έχουν περιγραφεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Είναι ευρέως αποδεκτό πως τα μιτοχόνδρια παραμένουν ακέραια, τουλάχιστον για αρκετό διάστημα, ενώ έχει περιγραφεί πως στα τελικά στάδια είτε συμπυκνώνονται είτε διογκώνονται, ενώ στις μεμβράνες τους δημιουργούνται οπές (διάυλοι-πόροι) (31, 33, 37). Ομοίως, τουλάχιστον στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, τα ενδοκυτταρικά μεμβρανικά συστήματα όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi, φαίνεται πως διατηρούν τη φυσιολογία τους, ενώ διάταξη του ενδοπλασματικού δικτύου έχει παρατηρηθεί επίσης στα τελικά στάδια της απόπτωσης. Σε μελέτες έχει περιγραφεί σχηματισμός κεντοπίων στο κυτταρόπλασμα και απώλεια μικρολαχνών της πλασματικής μεμβράνης (31, 33). Οι βιοχημικές αλλαγές στις οποίες υπόκεινται τα κύτταρα που αποπίπτουν είναι εξίσου χαρακτηριστικές με τις μορφολογικές, συμβαίνουν περίπου ταυτόχρονα και συμβάλλουν στην υλοποίηση των δεύτερων. Εξαρτώνται δε από την ενεργοποίηση ενός πρωτεολυτικού συστήματος, που περιλαμβάνει μια οικογένεια πρωτεασών, γνωστές ως κασπάσες, το οποίο πυροδοτείται σε απάντηση ενδογενών ή εξωγενών προαποπτωτικών σημάτων και καταλήγει στην κατάργηση της διακυτταρικής επικοινωνίας, στην αποδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, στην παρεμπόδιση

της αντιγραφής και επιδιόρθωσης του πυρηνικού DNA και στο θρυμματισμό του πυρηνικού DNA (29, 33, 37, 40). Ως υποστρώματα κασπάσων έχουν αναφερθεί αρκετά συστατικά των σημείων προσκόλλησης με τα οποία συνδέονται τα κύτταρα με την εξωκυττάρια ουσία, όπως επίσης και αρκετά συστατικά των συνδέσμων πρόσδεσης κυττάρου με κύτταρο (οι β- και γ-κατενίνες) και των δεσμοσωμάτων, που επίσης συνδέουν κύτταρα μεταξύ τους, η πρωτεόλυση των οποίων βοηθάει το αποπτωτικό κύτταρο να αποκολληθεί από τα γειτονικά του κύτταρα (35, 37, 38). Ενεργές κασπάσες πρωτεολύουν πολλά από τα βασικά στοιχεία του κυτταροσκελετού, στα οποία περιλαμβάνονται συστατικά των μικροϊνιδίων ακτίνης, όπως η ακτίνη, η μυσσίνη, η πηκτωλυματίνη, η φιλαμίνη, και η α-ακτίνη, αρκετές πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων, όπως η τομπουλίνη και οι πρωτεΐνες οι σχετιζόμενες με μικροσωληνίσκους (MAPs, microtubule-associated proteins), και πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, όπως οι κερατίνες, η βιμεντίνη και οι λαμίνες. Το αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού οδηγεί επίσης στην στρογγυλοποίηση του κυττάρου και την αποκόλλησή του από τον ιστό που ανήκει (35). Στην αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού βασίζεται και ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών προεκβολών της πλασματικής μεμβράνης (35). Υπόστρωμα των κασπάσων αποτελεί ο πυρηνικός αναστολέας του ειδικού νουκλεολυτικού ενζύμου της απόπτωσης, ICAD, η πρωτεολυτική θραύση του οποίου απελευθερώνει την πρωτεΐνη CAD, η οποία τελικά καταλύει το θρυμματισμό του πυρηνικού DNA (37, 38). Η πρωτεόλυση των πυρηνικών λαμινών οδηγεί στη διάλυση του πυρηνοπλασματικού ελάσματος, την κατάρρευση του πυρηνικού φακέλου και τελικά τον κατακερματισμό του πυρήνα (35, 37, 38).

Οι κασπάσες συνιστούν μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεϊνική οικογένεια πρωτεασών, που συντίθενται και ανιχνεύονται με τη μορφή πρόδρομων ανενεργών προ-ενζύμων στο κυτταρόπλασμα υγιών κυττάρων (37, 41). Η μετατροπή του προενζύμου σε καταλυτικά ενεργό κασπάση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα έναρξης της απόπτωσης. Η πρώτη ενεργοποιημένη κασπάση, η εναρκτήριος κασπάση (κασπάσες-2, -8, -9, -10), ενεργοποιεί διαμέσου διαδοχικών γεγονότων εκλεκτικής πρωτεόλυσης, διαφορετικές κασπάσες, τις κασπάσες τελεστές (κασπάσες-3, -6, -7) (33, 35, 37). Οι τελευταίες αναγνωρίζουν εκλεκτικά και πρωτεολύουν ένα μεγάλο αριθμό κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών.

Από τη στιγμή που θα ενεργοποιηθεί ο καταρράκτης των κασπασών η απόπτωση αποτελεί μη αντιστρεπτό γεγονός (38). Τα δυο πιο μελετημένα μονοπάτια ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών, που οδηγούν σε απόπτωση, είναι το εξωγενές και το ενδογενές (38), ενώ υπάρχει και ένα τρίτο μονοπάτι, το μονοπάτι granzyme B. Τα μονοπάτια μεταγωγής του αποπτωτικού σήματος στα φυσιολογικά κύτταρα είναι ανενεργά και ενεργοποιούνται μόνο από κάποιο σήμα βλάβης ή διαταραχής (42, 43).

Το εξωγενές μονοπάτι, που αναφέρεται συνήθως ως μονοπάτι υποδοχέων μεταγωγής σήματος αποπτωτικού θανάτου (death receptor-mediated apoptosis), πυροδοτείται όταν εξωκυττάρια σηματοδοτικές πρωτεΐνες (death ligands-συνδέτες), όλες μέλη της υπερικογένειας των TNF υποδοχέων, που βρίσκονται είτε αγκυροβολημένες στην πλασματική μεμβράνη γειτονικών κυττάρων είτε ως διαλυτές κυτοκίνες, συνδεθούν εκλεκτικά σε έναν από τους πολλούς υποδοχείς θανάτου (death receptors) της κυτταρικής επιφάνειας (38, 42, 43). Οι υποδοχείς θανάτου είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν μια εξωκυττάρια περιοχή σύνδεσης με δύο έως τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, μία διαμεμβρανική περιοχή, και μια συντηρημένη ενδοκυτταρική περιοχή από περίπου 80 αμινοξέα (death domain, DD), η οποία απαιτείται για την μεταβίβαση του αποπτωτικού σήματος από το εξωτερικό περιβάλλον στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Η εκλεκτική σύνδεση του συνδέτη (FASL, TNF- α , TRAIL and TWEAK) με τον υποδοχέα προκαλεί τον ολιγομερισμό του δεύτερου και την επιστράτευση ειδικών για κάθε υποδοχέα πρωτεϊνικών «προσαρμοστών» (adaptors: TRADD και FADD), οι οποίες με τη σειρά τους προσελκύουν εναρκτήριοις προκασπάσες (προκασπάση-8, προκασπάση-10) στο σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, του συμπλόκου DISC (death-inducing signaling complex), που καταλύει την θραύση και την ενεργοποίηση κασπασών τελεστών, που τελικά μπορούν να πρωτεολύσουν εκατοντάδες πρωτεϊνικά υποστρώματα οδηγώντας σε γρήγορο κυτταρικό θάνατο (37, 38, 42-44). Σε μερικά κύτταρα, η κασπάση-8 ενεργοποιεί απ' ευθείας των καταρράκτη των κασπασών ενεργοποιώντας τις κασπάσες τελεστές -3, -6, and -7. Σε άλλες περιπτώσεις δε, η ενεργοποιημένη κασπάση-8 πυροδοτεί το ενδογενές μονοπάτι (45). Αρκετά κύτταρα παράγουν πρωτεϊνικούς αναστολείς της απόπτωσης, που δρουν είτε στο

εξωκυττάριο είτε στο ενδοκυττάριο περιβάλλον με σκοπό να ανακόψουν το εξωγενές μονοπάτι. Κάποια κύτταρα επίσης παράγουν ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, που μοιάζουν με εναρκτήριοι προκασπάσες, αλλά στερούνται της πρωτεολυτικής περιοχής και παρεμποδίζουν ανεπιθύμητες ενεργοποιήσεις του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Σε μερικές περιπτώσεις επίσης, οι υποδοχείς θανάτου ενεργοποιούν άλλα μονοπάτια, που δεν οδηγούν σε απόπτωση αλλά αντίθετα προάγουν την κυτταρική επιβίωση και ενεργοποιούν γονίδια που σχετίζονται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις (38).

Εντολή για την απόπτωσή του μπορεί να δώσει και το ίδιο το κύτταρο, όταν ανιχνεύσει βλάβη, π.χ. βλάβη του DNA ή όταν υποβληθεί σε στρεσογόνες καταστάσεις, π.χ. έλλειψη οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών, αυξητικών παραγόντων ή όταν λάβει εξωκυττάρια σήματα επιβίωσης έπειτα από απώλεια επαφής με τα γειτονικά κύτταρα του ιστού ή έπειτα από έκθεση σε γλυκοκορτικοειδή, μέσω ενός ενδογενούς μονοπατιού (29, 38, 43).

Το ενδογενές μονοπάτι, γνωστό και ως μιτοχονδριακό μονοπάτι, εξαρτάται από παράγοντες, που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια, και μπορεί να εκκινήσει είτε μέσω αρνητικών σημάτων, που εγείρονται από την έλλειψη κυτοκινών, ορμονών και αυξητικών παραγόντων στο άμεσο περιβάλλον του κυττάρου είτε μέσω θετικών σημάτων στους οποίους περιλαμβάνονται η υποξία, τοξίνες, η ακτινοβολία, ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), ιοί και μια ποικιλία τοξικών παραγόντων (43, 44). Στο ενδογενές μονοπάτι η απόπτωση επάγεται με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p53. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο p53 βρίσκεται στο κυτοσόλιο σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αποκλειόμενος από τον πυρήνα. Υπό συνθήκες κυτταρικού στρες, ενεργοποιείται, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση είτε ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και ενεργοποιώντας προ-αποπτωτικές κασπάσες είτε επιδρώντας απευθείας στα μιτοχόνδρια συνδεδεμένος στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και πυροδοτώντας αλλαγές, το αποτέλεσμα των οποίων είναι το άνοιγμα των μιτοχονδριακών μεμβρανικών πόρων παροδικής διαπερατότητας (permeability transition pore, PTP) (45). Η παροδική διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial outer membrane permeability, MOMP)

αποτελεί ορόσημο του ενδογενούς μονοπατιού και θεωρείται το σημείο της μη επιστροφής, διότι η MOMP οδηγεί τυπικά σε κυτταρικό θάνατο, ακόμα και χωρίς την ενεργοποίηση των κασπασών, είτε λόγω δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων είτε λόγω απελευθέρωσης τοξικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (43, 44). Με το άνοιγμα των μιτοχονδριακών μεμβρανικών πόρων, προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων του κυτοχρώματος c, μπορούν να διαρρεύσουν από τον μεσομεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο, όπου υπάρχουν φυσιολογικά, εντός του κυτοσολίου, και να ενεργοποιήσουν την απόπτωση μέσω του καταρράκτη των κασπασών (29, 38, 45). Το κυτόχρωμα c είναι ένα υδατοδιαλυτό ένζυμο, που εντοπίζεται στη εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και αποτελεί συστατικό του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων (αναπνευστική αλυσίδα), αλλά με την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, ο ρόλος του μεταβάλλεται ολοκληρωτικά. Συνδεδεμένο ισχυρά με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1), προκαλεί τον ολιγομερισμό της, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη θέσεων πρόσδεσης με την προ-κασπάση-9. Το τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλεγμα κυτόχρωμα C/Araf-1/προ-κασπάση-9 συγκροτεί το «αποπτώσωμα» (apoptosome), το οποίο επάγει τη διαδοχική αυτοπρωτεόλυση της προ-κασπάσης-9 σε ενεργό κασπάση-9, η οποία στη συνέχεια πρωτεολύει εκλεκτικά την προ-κασπάση-3 σε ενεργό κασπάση-3, και η οποία τελικά αναγνωρίζει και πρωτεολύει τα ενδοκυτταρικά υποστρώματα στόχους, όπως η πρωτεΐνη PARP, ο αναστολέας ICAD, οι πυρηνικές λαμίνες και η πηκτωλυματίνη (37, 38). Το ενδογενές μονοπάτι υπόκειται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς που εξασφαλίζουν ότι το κύτταρο «αυτοκτονεί» μόνο όταν χρειάζεται. Μια μεγάλη ομάδα ενδοκυτταρικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών της απόπτωσης, εξελικτικά συντηρημένων, είναι η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl2, η οποία ελέγχει κατά κύριο λόγο την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων μεσομεμβρανικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Κάποιες από αυτές είναι προ-αποπτωτικές (Bax and Bak) και προάγουν την απόπτωση προωθώντας την απελευθέρωση, ενώ άλλες είναι αντι-αποπτωτικές (Bcl2 and Bcl-X1) και συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση καταστέλλοντας την απόπτωση εμποδίζοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Οι προ-αποπτωτικές και οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες μπορούν να ενώνονται με αρκετούς συνδυασμούς σχηματίζοντας ετεροδιμερή, καταστέλλοντας η μια τη

δράση της άλλης (37, 38). Η ισορροπία ανάμεσά τους καθορίζει αν ένα κύτταρο θα επιβιώσει ή θα πεθάνει μέσω απόπτωσης (43). Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού θανάτου αιμοποιητικών κυττάρων, που στερούνται αυξητικών παραγόντων ή/και κυτοκινών, η πρωτεΐνη Bad, προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl2, μετακινείται από το κυτοσόλιο στις μιτοχονδριακές μεμβράνες (βιολογία κυττάρου). Το ενδογενές και το εξωγενές μονοπάτι, συνεργάζονται για τη διασφάλιση της υγείας των πολυκύτταρων οργανισμών (29). Σε μερικά κύτταρα εξάλλου το εξωγενές μονοπάτι πυροδοτεί το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιώντας μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας Bcl2 (38).

Το τρίτο μονοπάτι, το μονοπάτι granzyme B, ενεργοποιείται κατά την ανοσοποιητική απάντηση σε ιούς, οπότε κυτταροτοξικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων και των φυσικών φονικών κυττάρων, αναγνωρίζουν προσβεβλημένα κύτταρα και απελευθερώνουν στο κυτοσόλιο των κυττάρων στόχων πρωτεάσες, γνωστές ως granzymes. Η Granzyme B πυροδοτεί την απόπτωση είτε επάγοντας παροδική διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είτε με απευθείας ενεργοποίηση κασπασών τελεστών (43).

1.4. Μεταβολές της κυτταρικής μεμβράνης κατά τον κυτταρικό θάνατο

Η πλασματική μεμβράνη αποτελεί βασικό λειτουργικό οργανίδιο του κυττάρου, με πρωτογενή λειτουργία τη διαμερισματοποίηση και με αρκετές δευτερογενείς λειτουργίες, όπως η εκλεκτική διαπερατότητα των μορίων, η ενδοκύτωση και η εξωκύτωση, η διάθεση θέσεων βιοχημικής δραστηριότητας, η αποδοχή εξωκυττάρων ερεθισμάτων, η διακυτταρική επικοινωνία, η κυτταρική σύνδεση και προσκόλληση. Καθώς είναι ο άμεσος φραγμός προς το εξωκυττάριο περιβάλλον αποτελεί κεντρικό ομοιοστατικό μηχανισμό. Η απώλεια της επομένως είναι καταστρεπτική για το κύτταρο (34, 37).

Η ρήξη ή η διατήρηση της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης θεωρούνται βασικά διακριτικά χαρακτηριστικά της νέκρωσης και της απόπτωσης, αντίστοιχα (34). Η ρήξη κατά τη νέκρωση είναι απότομη και ολοκληρωτική ενώ οι αλλαγές που συμβαίνουν στην πλασματική μεμβράνη κατά την απόπτωση αφορούν κατά κύριο λόγο βιοχημικές παρά μορφολογικές μεταβολές, που πιθανότατα είναι

σημαντικές για την φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων (33). Μια μορφολογική αλλαγή η οποία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό του κυτταρικού θανάτου, αποτελεί η απώλεια των μικρολαχνών, που σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (33). Στην απόπτωση, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού οδηγεί στο σχηματισμό χαρακτηριστικών προεκβολών της πλασματικής μεμβράνης (blebs) μέσω των οποίων αποκόπτονται τα αποπτωτικά σωματίδια (35, 46). Η κασπάση-3 έχει αποδειχθεί πως είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό αυτών των προεκβολών μέσω της ενεργοποίησης του ROCK1 (34). Η ενεργή μορφή του ROCK1 μπορεί να φωσφορυλιώσει ελαφριές αλυσίδες μυοσίνης, επάγοντας μια αύξηση της αλληλεπίδρασης ακτίνης-μυοσίνης και κατ' επέκταση μια αύξηση της συσταλτικότητας (46). Η απώλεια της αλληλεπίδρασης της πλασματικής μεμβράνης με το κυτταροσκελετό και η αύξηση της υδροστατικής πίεσης εξαιτίας της συρρίκνωσης του κυττάρου συνιστούν τη βιολογική βάση για το σχηματισμό των προεκβολών (34). Ενδιαφέρον είναι πως αποπτωτικά κύτταρα, που δεν έχουν σχηματίσει προεκβολές της πλασματικής μεμβράνης, φαγοκυτταρώνονται επίσης και ανεξάρτητα από αυτό (46). Ο σχηματισμός των προεκβολών της πλασματικής μεμβράνης φαίνεται πως δεν επηρεάζει την εξέλιξη της απόπτωσης και έχει αναφερθεί ως αναστρέψιμος (34).

Εξαιρετικά σημαντική αλλαγή στη πλασματική μεμβράνη των αποπτωτικών κυττάρων - ορόσημο της απόπτωσης - αποτελεί η μεταστροφή της αρνητικά φορτισμένης φωσφολιπιδικής φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική πλευρά της λιπιδικής διπλοστιβάδας της πλασματικής μεμβράνης, όπου εντοπίζεται αποκλειστικά υπό φυσιολογικές συνθήκες, προς την εξωτερική πλευρά (34, 38). Η μεταστροφή της φωσφατιδυλοσερίνης είναι ανεξάρτητη από τον ROCK1 αλλά υπερισχύει στις προεκβολές της πλασματικής μεμβράνης (34). Είναι επαγόμενη και λειτουργεί ως σινιάλο προς τα γειτονικά κύτταρα και τα μακροφάγα ώστε το αποπτωτικό κύτταρο να φαγοκυτταρωθεί (38, 47). Κατ' επέκταση εμποδίζει την φλεγμονώδη αντίδραση καθώς η εγκόλπωση του αποπτωτικού κυττάρου αναστέλλει την παραγωγή κυτοκινών από τα φαγοκύτταρα (38). Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης προηγείται της αύξησης της διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης και της συρρίκνωσης του κυττάρου και της πύκνωσης του πυρήνα, ενώ

έχει αναφερθεί πως λαμβάνει χώρα μετά την απελευθέρωση του κυτοχρώματος (47, 48).

1.5. Νέκρωση και απόπτωση κατά την κρυοκατάψυξη και απόψυξη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Η κρυοκατάψυξη των κυττάρων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο τόσο με τη μορφή της νέκρωσης όσο και με την μορφή της απόπτωσης (49). Ο κυτταρικός θάνατος κατά την κρυοκατάψυξη οφείλεται σε δύο παράγοντες: 1) στην αφυδάτωση, που οφείλεται σε αλλαγές στις ιδιότητες του διαλύτη, όπως η συγκέντρωση και 2) στον ενδοκυτταρικό σχηματισμό κρυστάλλων πάγου (50). Καθένας από αυτούς τους παράγοντες εξαρτάται από το ρυθμό ψύξης και τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών στο νερό (51).

Τα βασικά φυσικά φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την κατάψυξη του κυττάρου περιγράφονται από τον Mazur ως εξής: 1) Μέχρι τους -5°C τα κύτταρα και το μέσο στο οποίο είναι διαλυμένα παραμένουν μη κατεψυγμένα α) λόγω υπέρψυξης (διαδικασία μείωσης της θερμοκρασίας ενός υγρού ή ενός αερίου κάτω από το σημείο ψύξης του χωρίς να καθίσταται στερεό, γνωστή ως υποψύχωση) και β) εξαιτίας της μείωσης του σημείου πήξης παρουσία κρυοπροστατευτικού διαλύματος, 2) μεταξύ -5 και -15°C σχηματίζεται πάγος στο εξωκυτταρικό διάλυμα είτε αυθορμήτως (ομογενής πυρηνοποίηση) είτε ως αποτέλεσμα της πυρηνοποίησης ενός προϋπάρχοντος μικρού κομματιού πάγου ή ετερογενών στοιχείων π.χ. ιζημάτων (ετερογενής πυρηνοποίηση). Το κυτταρικό περιεχόμενο παραμένει υπερψυγμένο, μη κατεψυγμένο, πιθανότατα επειδή η πλασματική μεμβράνη εμποδίζει το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στο κυτόπλασμα. Το υπερψυγμένο νερό εντός του κυττάρου έχει εξ ορισμού υψηλότερο χημικό δυναμικό από το εν μέρει κατεψυγμένο νερό εκτός του κυττάρου, με αποτέλεσμα, νερό να μετακινείται έξω από το κύτταρο και να καταψύχεται εκεί (52). Η ταχύτητα ψύξης και η διαπερατότητα της μεμβράνης στο νερό επηρεάζει τα επακόλουθα φυσικοχημικά φαινόμενα εντός των κυττάρων, και κατά συνέπεια και τη βιωσιμότητά τους (51). Όταν τα κύτταρα ψύχονται με αργό ρυθμό ή/και η διαπερατότητα της μεμβράνης τους στο νερό είναι υψηλή, εκτίθενται για μεγάλο χρονικό διάστημα ή/και σε μεγαλύτερο βαθμό, αντίστοιχα, σε εξωκυτταρικά

διαλύματα των οποίων η συγκέντρωση συνεχώς αυξάνεται, καθώς το νερό μετατρέπεται σε πάγο. Εξισορροπώντας την μεταβολή αυτή με τη μετακίνηση του νερού από το αραιότερο εσωτερικό του κυττάρου προς το πυκνότερο εξωκυττάριο περιβάλλον, η βιωσιμότητά τους ελαττώνεται λόγω εκτεταμένης αφυδάτωσης (50, 51). Όσο αυξάνεται ο ρυθμός ψύξης αυξάνεται και η βιωσιμότητα καθώς μειώνεται ο χρόνος έκθεσης στον επιβλαβή παράγοντα. Όταν η ψύξη είναι «ιδανικά» αργή, δίδεται η δυνατότητα να εξέλθει νερό από το κύτταρο αρκετά γρήγορα ώστε να συμπυκνωθεί το ενδοκυτταρικό διάλυμα, περιορίζοντας την υπέρψυξη και διατηρώντας το χημικό δυναμικό του ενδοκυττάρου νερού σε ισορροπία με του εξωκυττάρου. Ως αποτέλεσμα το κύτταρο αφυδατώνεται τόσο ώστε να μην κρυσταλλωθεί ενδοκυτταρικά (52, 53). Όταν τα κύτταρα ψύχονται ακόμα ταχύτερα όμως ή εάν η διαπερατότητα της μεμβράνης τους στο νερό είναι χαμηλή, η πιθανότητα σχηματισμού κρυστάλλων πάγου ενδοκυτταρικά αυξάνεται, διότι δεν επαρκεί ο χρόνος ώστε το νερό να εξέλθει από το κύτταρο και να παγώσει εξωκυτταρικά αλλά το κύτταρο υπερψύχεται έως ότου αποκτηθεί η χημική ισορροπία με την ενδοκυτταρική κατάψυξη (50-54). Στην περίπτωση αυτή δε, το ποσοστό θνητότητας των κυττάρων εξαρτάται από το μέγεθος των ενδοκυτταρικών κρυστάλλων πάγου που είναι καταστρεπτικό για το κύτταρο (50). Το μέγεθος του σχηματιζόμενου κρυστάλλου είναι αντιστρόφως ανάλογο του ρυθμού ψύξης (53). Συνήθως η ταχεία ψύξη οδηγεί στο σχηματισμό μικρών κρυστάλλων, οι οποίοι έχοντας υψηλότερη επιφανειακή τάση (ενέργεια επιφανείας) από τους μεγάλους κρυστάλλους, μεγαλώνουν ή συσσωματώνονται κατά την αργή απόψυξη, γεγονός που μπορεί να αποβεί θανατηφόρο για το κύτταρο, όχι όμως και κατά την γρήγορη απόψυξη, όπου δεν υπάρχει αρκετός χρόνος για τη μεγέθυνση ενός κρυστάλλου ή τη συσσωμάτωση μικρών κρυστάλλων σε έναν μεγαλύτερο πριν επιτευχθεί το σημείο τήξης (51, 53). Η ταχεία απόψυξη επομένως επιτρέπει στα κύτταρα να επιβιώσουν ακόμα και έπειτα από υψηλότερους ρυθμούς ψύξης σε σχέση με την αργή απόψυξη (53). Η αργή ψύξη, προκαλεί το σχηματισμό μεγάλων κρυστάλλων, όμως στην περίπτωση αυτή, οι κρύσταλλοι σχηματίζονται εκτός του κυττάρου και άρα είναι ακίνδυνοι κατά την απόψυξη (53). Σύμφωνα με τον Farrant το μέγεθος της κυτταρικής βλάβης είναι συνάρτηση της συνολικής ποσότητας του πάγου που σχηματίζεται ανά κύτταρο παρά του μεγέθους των κρυστάλλων και λαμβάνει χώρα

κατά την απόψυξη οφειλόμενη σε οσμωτικά φαινόμενα (55). Επειδή κατά την κατάψυξη σχηματίζεται έστω και μια μικρή ποσότητα πάγου ενδοκυτταρικά, η απόψυξη πρέπει να είναι εξαιρετικά ταχεία για την ιδανική επιβίωση των κυττάρων (56). Τελικά, ανεξάρτητα από το αν κατά την κατάψυξη τα κύτταρα αφυδατωθούν ή σχηματίσουν παγοκρυστάλλους ενδοκυτταρικά, εκτίθενται σε απώλεια νερού και σε αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά (51). Η διαφορετική διαπερατότητα στο νερό, που παρουσιάζουν τα διαφορετικά είδη κυττάρων επηρεάζει και την αριθμητική τιμή του ιδανικού ρυθμού ψύξης τους, εκείνου δηλαδή πέρα από τον οποίο το κύτταρο δε μπορεί να χάσει νερό αρκετά γρήγορα ώστε να αποφύγει το σχηματισμό ενδοκυτταρικού πάγου. Αντίστοιχα, η διαφορετική ευαισθησία στην πυκνότητα του διαλύτη που παρουσιάζουν τα διαφορετικά είδη κυττάρων επηρεάζει την αριθμητική τιμή του ρυθμού ψύξης τους κάτω από τον οποίο το κύτταρο καταστρέφεται από την παρατεταμένη έκθεσή του στην αυξανόμενη συγκέντρωση του διαλύτη (50). Με βάση τα πειράματά του ο Leibο και συν. πρότειναν ότι ο ιδανικός ρυθμός ψύξης είναι εκείνος που είναι τόσο ταχύς ώστε να ελαχιστοποιείται ο χρόνος έκθεσης του κυττάρου στις μεταβολές του διαλύτη και ταυτόχρονα τόσο αργός ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα σχηματισμού ενδοκυτταρικού πάγου (50, 51). Φυσικά, οι όροι «αργή» και «ταχεία» ψύξη είναι σχετικοί. Η «αργή» ψύξη αντιστοιχεί σε ρυθμό ψύξης χαμηλότερο από τον «ιδανικό» ή σε ρυθμό αρκετά αργό ώστε να προκαλέσει βλάβη από αλλαγές στις ιδιότητες του διαλύτη, και αντίστοιχα, η «ταχεία» ψύξη αντιστοιχεί σε ρυθμό υψηλότερο από τον «ιδανικό» ή σε ρυθμό υψηλό αρκετά για να επιτρέψει το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό του κυττάρου (50). Η απόλυτη αριθμητική τιμή του αργού, του ιδανικού και του ταχύ ρυθμού ψύξης ανά περίπτωση εξαρτάται αποκλειστικά από το είδος του κυττάρου και το μέσο στο οποίο είναι διαλυμένο (45, 50).

Τα κύτταρα των θηλαστικών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις αλλαγές της συγκέντρωσης των διαλυμάτων και γενικώς επιβιώνουν της κατάψυξης μόνο παρουσία κρυοπροστατευτικού διαλύματος. Σύμφωνα με τον Mazur, ένα διάλυμα για να είναι κρυοπροστατευτικό πρέπει να έχει χαμηλό μοριακό βάρος και την ιδιότητα να διαπερνάει το κύτταρο (50, 51). Σύμφωνα με τον Lovelock τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα, δρουν ως ρυθμιστικά διαλύματα άλατος,

μειώνοντας τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών μέσα και έξω από το κύτταρο (50, 51). Τα περισσότερα κρυοπροστατευτικά διαλύματα, κατά την ταχεία ψύξη δεν έχουν κρυοπροστατευτική δράση, ενώ κατά την αργή ψύξη δεν προστατεύουν το κύτταρο από το σχηματισμό ενδοκυτταρικών κρυστάλλων πάγου παρά μόνο από το σχηματισμό εξωκυτταρικών κρυστάλλων (51, 53, 56). Πιθανότερα, η κρυοπροστατευτική τους ιδιότητα βασίζεται στο ότι με την παρουσία τους σχηματίζεται λιγότερη ποσότητα πάγου ανεξαρτήτου θερμοκρασίας (56). Αυτό έχει δυο συνέπειες: α) τα κύτταρα εκτίθενται σε λιγότερο ακραίες διαφορές συγκεντρώσεων μεταξύ των εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών διαλυμάτων και β) τα κύτταρα συρρικνώνονται λιγότερο, διότι ένα μέρος του αδιαπέραστου εξωκυττάρου υγρού έχει αντικατασταθεί με διαπερατό πρόσθετο (56). Εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα προκύπτουν όταν η κατάψυξη παρουσία κρυοπροστατευτικού διαλύματος είναι ταχεία. Όχι μόνο αυτά τα χαμηλού μοριακού βάρους κρυοπροστατευτικά δεν προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες αλλά αντίθετα υπάρχει ένα μεγάλο εύρος υψηλών ρυθμών ψύξης κοντά στον ιδανικό, όπου η ενσωμάτωση του κρυοπροστατευτικού μπορεί να μειώσει την κυτταρική βιωσιμότητα, διότι παρουσία διαπερατών πρόσθετων θα επιτρέπεται λιγότερη συρρίκνωση από αφυδάτωση και άρα σχηματισμός μεγαλύτερης ποσότητας πάγου ενδοκυτταρικά (56). Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα επομένως είναι «προστατευτικά» κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες κατάψυξης, ενώ σε διαφορετικές συνθήκες μετατρέπονται σε βλαπτικά για το κύτταρο (56). Από μελέτες της κρυοπροστατευτικής ιδιότητας διαφόρων διαλυμάτων, προκύπτει πως η συγκέντρωση των παραγόντων στα διαλύματα παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Από τη μία πλευρά, οι καμπύλες βιωσιμότητας έχουν παρόμοια μορφή για τα περισσότερα διαλύματα, με τη βιωσιμότητα να αυξάνεται με την αύξηση του ρυθμού ψύξης και έπειτα να μειώνεται με την περαιτέρω αύξησή του, όμως η μέγιστη βιωσιμότητα σε κάθε περίπτωση αντιστοιχεί σε συγκεκριμένους ρυθμούς ψύξης οι οποίοι εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους (50). Από την άλλη πλευρά, τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα δύναται να προκαλέσουν τα ίδια μη αναστρέψιμες βλάβες στα κύτταρα, τόσο κατά την ψύξη όσο και κατά την απόψυξη, ανάλογα με την τελική συγκέντρωσή τους στο διαλύτη, το χρόνο και τη θερμοκρασία έκθεσης των κυττάρων σε αυτά (56), κυρίως

προκαλώντας διόγκωση μέσω όσμωσης. Μπορούν να προκαλέσουν επίσης και αναστρέψιμες δομικές αλλαγές στα κύτταρα, όπως αλλαγές στη λιπιδική στιβάδα ή άλλα δομικά στοιχεία των μεμβρανών (56).

Η συμπεριφορά ενός κυττάρου κατά την ψύξη και την απόψυξη εξαρτάται σημαντικά από τις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης. Η δομή της εξωτερικής μεμβράνης επιτρέπει την υπέρψυξη του εσωτερικού του κυττάρου και καθορίζει τη θερμοκρασία πυρηνοποίησης, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου εντός του κυττάρου σε θερμοκρασίες μεταξύ των -10° και -15°C . Η διαπερατότητά της καθορίζει το κατά πόσο ένα κύτταρο προκειμένου να εξισορροπήσει τα χημικά δυναμικά εκατέρωθεν, θα αφυδατωθεί ή θα παγώσει ενδοκυτταρικά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (51, 52). Αντίστροφα, βλάβες στις οποίες υπόκεινται τα κύτταρα κατά την ψύξη, είτε είναι αργή είτε είναι ταχεία, αφορούν κυρίως βλάβες στην εξωτερική και στις εσωτερικές τους μεμβράνες (51, 52). Σύμφωνα με τον Lovelock, οι υψηλές ηλεκτρολυτικές συγκεντρώσεις που δημιουργούνται κατά την ψύξη και η αφυδάτωση επηρεάζουν τη λιπιδική σύσταση των μεμβρανών και τις μετατρέπουν σε περισσότερο διαπερατές, με αποτέλεσμα, κατά την απόψυξη, το κύτταρο να υπερπληρεί σε κατιόντα και να υφίσταται οσμωτικό σοκ εξαιτίας της εισροής νερού εντός του και συνεπακόλουθα διόγκωση και ρήξη (51). Επιπλέον, η διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης παίζει σημαντικό ρόλο και στην επίδραση των κρυστοπροστατευτικών διαλυμάτων. Από τη μια πλευρά, το ιδανικό κρυστοπροστατευτικό διάλυμα πρέπει να έχει τόσο χαμηλό μοριακό βάρος ώστε να διαπερνάει τη μεμβράνη κατά την ψύξη. Από την άλλη πλευρά, εάν τη διαπερνάει, η παρουσία του μπορεί να προκαλέσει επιβλαβή ωσμωτικά φαινόμενα κατά την απόψυξη αλλά και κατά τη μετέπειτα απομακρυνσή του (52). Οι Armitage και Mazur, έχουν προτείνει πως αυτά τα ωσμωτικά φαινόμενα, που προκαλούνται ακόμα και από μετρίως υπεροσμωτικά διαλύματα, είτε με τη χρήση διαπερατών είτε μη διαπερατών διαλυμάτων, είναι περισσότερο επιβλαβή για τις μεμβράνες των ενδοκυτταρικών οργανιδίων και άρα έμμεσα για ολόκληρο το κύτταρο παρά για την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη (52).

Μεταξύ κατάψυξης και απόψυξης μεσολαβεί ένα σύντομο ή μακρύ διάστημα κρυσοσυντήρησης, κατά το οποίο το κύτταρο περιβαλλόμενο από ένα λεπτό στρώμα

υαλοποιημένου κρυοπροστατευτικού διαλύματος διατηρείται σε μια υαλώδη μορφή εγκλωβισμένο σε μια μάζα πάγου. Η συνθήκη αυτή είναι σταθερή και μη επιβλαβής για το ήδη κατεψυγμένο κύτταρο εφόσον η θερμοκρασία συντήρησης διατηρείται. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, μπορεί να υπερβεί τη θερμοκρασία πέρα από την οποία επιτρέπεται η σταδιακή και αναστρέψιμη μετάβαση από την σκληρή και σχετικά εύθραυστη υαλώδη κατάσταση σε μία ιώδη ή ελαστική κατάσταση (υαλώδης μετάβαση) (57). Το νερό δεν υπάρχει σε υγρή μορφή σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των -130°C , παρά μόνο σε κρυσταλλική μορφή (52). Πολλά κρυοκατεψυγμένα κύτταρα όμως που φυλάσσονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των -80°C δεν είναι «σταθερά» διότι υπολείμματα μη κατεψυγμένου διαλύματος συνεχίζουν να υπάρχουν (52). Οι μεγάλες μεταβολές της θερμοκρασίας κοντά στο όριο των -120°C , κατά την φύλαξη, μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολές του μεγέθους των κρυστάλλων, οι οποίες κατά την απόψυξη θα μειώσουν την βιωσιμότητα των κυττάρων (52).

Βασική συνέπεια του χρόνου, που απαιτείται για τον χειρισμό των κυττάρων από τη στιγμή της προσθήκης του κρυοπροστατευτικού διαλύματος έως την έναρξη της κατάψυξης, αποτελεί το γεγονός πως, το κρυοπροστατευτικό διάλυμα εισέρχεται στο κύτταρο κατά την αργή ψύξη και πιθανόν κατά την ταχεία απόψυξη ο χρόνος να μην είναι αρκετός ώστε η επιπλέον ποσότητα, που έχει εισέλθει στο κύτταρο, να διαχυθεί πάλι στο εξωκυττάριο περιβάλλον, οπότε τα κύτταρα διογκώνονται μέσω όσμωσης κατά την απότομη αραίωση του εξωκυττάριου διαλύματος με την τήξη του πάγου αλλά και με τη διάλυσή τους σε φυσιολογικό διάλυμα και τελικά λύνονται. Η αργή απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού διαλύματος σε ιδανική θερμοκρασία έπειτα από την απόψυξη ίσως οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων (52).

Συμπερασματικά, κατά την ψύξη ενός κυττάρου, οι φυσικές αλλαγές αφορούν είτε αφυδάτωση λόγω όσμωσης είτε ενδοκυτταρικό σχηματισμό πάγου, οι δε βιολογικές βλάβες, με βασικό δέκτη τις μεμβράνες, κυμαίνονται από αβλαβείς έως μη αναστρέψιμες, και είναι ανάλογες με τον τύπο του κυττάρου, την ταχύτητα ψύξης και απόψυξης, την ελάχιστη θερμοκρασία ψύξης και το είδος και τη συγκέντρωση του κρυοπροστατευτικού διαλύματος (51). Μέχρι σήμερα έχουν σημειωθεί αρκετές προσπάθειες για την εξακρίβωση της επιρροής των διαφόρων

σταδίων, όπως η προετοιμασία των διαλυμάτων, η ψύξη και η απόψυξη, στην κυτταρική βιωσιμότητα, όμως τα δεδομένα για τους παράγοντες και τους μηχανισμούς που τελικά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο κατά την κρυοκατάψυξη είναι λιγοστά και αποσπασματικά (49). Η βλάβη του κυττάρου κατά την ψύξη δεν αποτελεί μεμονωμένο φαινόμενο. Στο διάστημα από την έναρξη της κατάψυξης μέχρι την επαναφορά στη φυσιολογική κατάσταση, το κύτταρο υπόκειται σε μια αλληλουχία φυσικοχημικών φαινομένων, καθένα από τα οποία είναι δυνητικά θανατηφόρα και, για την επιβίωση του κυττάρου θα πρέπει καθένα από αυτά να αποφεύγεται ή να μετριάζεται (52). Διάφοροι μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένων του οξειδωτικού και οσμωτικού στρες, της μηχανικής τριβής από τους κρυστάλλους πάγου, της διαφοροποίησης των φυσικών ιδιοτήτων των κυτταρικών δομών, και της διατάραξης της ομοιόστασης των ιόντων, είναι υπεύθυνα για την κυτταρική βλάβη κατά τις διαδικασίες της κρυοκατάψυξης και απόψυξης (49, 58). Τη μεγαλύτερη δοκιμασία δε διατήρησης της βιωσιμότητας το κύτταρο την περνάει σε μια ενδιάμεση ζώνη θερμοκρασιών μεταξύ των -15 και -60°C, από την οποία πρέπει να περάσει δύο φορές, μία κατά την ψύξη και μία κατά την απόψυξη (52).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η κρυοκατάψυξη, εκτός από τη νέκρωση, επάγει και την απόπτωση με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (45, 58-60). Η διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης των κυττάρων συνδέεται με την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, και η απόπτωση ως φαινόμενο λαμβάνει χώρα σε σημαντικό βαθμό, κυρίως κατά την απόψυξη. Φαίνεται επίσης πως είναι μια ταχύτατη διαδικασία, με μορφολογικές μεταβολές που παρατηρούνται εντός ωρών μετά την απόψυξη (40, 58, 59). Απόδειξη του ότι η απόψυξη πυροδοτεί ένα αποπτωτικό μηχανισμό, αποτέλεσε πείραμα των Heng και συν. οι οποίοι έδειξαν πως με την συντήρηση των αποψυγμένων κυττάρων σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C), στην οποία αναμένεται πως αναστέλλεται η δράση των ενδοκυτταρικών ενζύμων και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον καταρράκτη των κασπασών, μειώνεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, αντίθετα με ότι συμβαίνει όταν τα ίδια αποψυγμένα κύτταρα συντηρούνται στους 37°C (60). Αντίθετα, οι Xu και συν. έδειξαν πως η μείωση της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των κυττάρων προκαλείται κυρίως κατά την διαδικασία της κατάψυξης, με τη συνέργεια της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου, της ενεργοποίησης του ROCK, των αλλαγών

στην ισορροπία μεταξύ της G-ακτίνης και της F-ακτίνης και της ενεργοποίησης του p53, ως αποτέλεσμα του ψυκτικού και ωσμωτικού στρες (45). Κάθε μια από τις οφειλόμενες στην κρυοκατάψυξη αλλαγές στο κύτταρο, είτε είναι βιοχημικές αλλαγές είτε μορφολογικές, μπορούν να πυροδοτήσουν και ένα διαφορετικό αποπτωτικό μηχανισμό (49). Τα αποτελέσματα της μελέτης των Stroh και συν. υπέδειξαν το μιτοχονδριακό μονοπάτι ως τον βασικό αποπτωτικό μονοπάτι και την κασπάση-3, ως την βασική κασπάση, που ενεργοποιείται μετά από βλάβες του κυττάρου κατά την κρυοκατάψυξη ή απόψυξη (58). Αντίθετα, σύμφωνα με τους Xu και συν., η αναστολή των κασπασών-8 και -9 μέσω του αναστολέα ROCK δείχνει ότι η επαγωγή της απόπτωσης ακολουθεί τόσο το ενδογενές όσο και το εξωγενές μονοπάτι (45). Η χρήση αναστολέων της απόπτωσης στα κρυοπροστατευτικά διαλύματα για τον περιορισμό της μείωσης της βιωσιμότητας των κυττάρων, έχει αποτελέσει πεδίο μελέτης αρκετών ερευνητών. Βάσει των αποτελεσμάτων τους οι Stroh και συν. υποστήριξαν πως η αναστολή της ενεργοποίησης των κασπασών μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ανάκτηση των κρυοκατεψυγμένων αιμοποιητικών και άλλων κυττάρων, και επομένως ότι παράλληλη χρήση αναστολέων των κασπασών σε συνδυασμό με τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην μακροχρόνια κρυοσυντήρηση ζωντανών κυττάρων και στην επιτυχή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (58). Από την άλλη, υποστηρίζεται πως η χρήση αναστολέων των κασπασών μπορεί να οδηγήσει τελικά σε νεκρόπτωση (49). Σύμφωνα με τους Xu και συν, η αναστολή του ROCK, έχει αποδειχθεί πως προστατεύει ιδιαίτερα τα κύτταρα κατά την κατάψυξη (45). Οι Sarkar και συν. έδειξαν πως η χρήση συνδυασμού των κυτοκινών IL-2, IL-4, και IL-7 οδηγεί σε σημαντική μείωση του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης των κρυοκατεψυγμένων κυττάρων (59). Η χρήση αντιοξειδωτικών παραγόντων κατά την κρυοκατάψυξη ή απόψυξη θεωρείται πως μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (49).

1.6. Το «σημείο χωρίς επιστροφή»

Το «σημείο χωρίς επιστροφή» ταυτίζεται με εκείνη την αλλαγή με την οποία το κύτταρο χάνει τουλάχιστον μια στοιχειώδη λειτουργική ιδιότητα με μη αναστρέψιμο τρόπο, με αποτέλεσμα την απώλεια είτε της βιωσιμότητας είτε της

κλωνογενικότητας (39). Πιθανότατα διαφέρει ανάλογα με το είδος του κυττάρου και τις συνθήκες που προκάλεσαν την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης (61). Η απόπτωση θεωρείται μη αναστρέψιμη διαδικασία, μετά το στάδιο της ενεργοποίησης των κασπασών, της MOMP και του κατακερματισμού του DNA (61). Αρκετές πρόσφατες μελέτες παρέχουν αποδείξεις ότι τα κύτταρα δύναται να επιβιώσουν ακόμα και αν έχουν εισέλθει σε ένα αποπτωτικό μονοπάτι (44, 62).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών αντιτίθεται στην υπόθεση πως το «σημείο χωρίς επιστροφή» συνδέεται αποκλειστικά με την ενεργοποίηση των κασπασών. Παρόλο που η αναστολή της δράσης των κασπασών σχεδόν πάντοτε οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης, σε αρκετές περιπτώσεις τα κύτταρα δε σώζονται, και πεθαίνουν, ίσως πιο αργά και χωρίς τα μορφολογικά και βιοχημικά της απόπτωσης, με χαρακτηριστικά παραδείγματα μεταξύ των οποίων το κυτταρικό θάνατο των αιμοποιητικών κυττάρων απουσία αυξητικού παράγοντα (39). Από την άλλη πλευρά, η επιβίωση αποπτωτικών κυττάρων, στα οποία έχει διακριβωθεί η ενεργοποίηση των κασπασών, έχει εκτενώς αναφερθεί για πολλά είδη κυττάρων και ιστών όπως τα μυϊκά κύτταρα, ανοσοκύτταρα, κερατινοκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και προγονικά κύτταρα. Σε μερικές δε περιπτώσεις η ενεργοποίηση των κασπασών όχι μόνο αποδείχθηκε μη θανατηφόρα αλλά αντίθετα θεωρήθηκε αναγκαία για την κυτταρική διαφοροποίηση. Σε άλλες περιπτώσεις εξάλλου διαπιστώθηκε, πως κύτταρα είναι ικανά να υπόκεινται στη δράση των ενεργών κασπασών, χωρίς να πεθαίνουν, για αρκετό διάστημα ημερών έως ότου αυτή αποσιωπηθεί. Δεδομένου ότι η δράση των κασπασών είναι αυστηρά ελεγχόμενη, πιθανότατα τα κύτταρα, που επιβιώνουν μετά από την ενεργοποίηση των κασπασών, να μην προορίζονταν να πεθάνουν εξ αρχής ή πιθανόν η ενεργοποίηση των κασπασών να μην αποτελεί «το σημείο χωρίς επιστροφή», όπως πιστεύεται (44). Αρκετά δεδομένα δείχνουν επίσης πως και η αυξημένη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης δεν αποτελεί «σημείο χωρίς επιστροφή». In vitro μελέτες αποδεικνύουν, ότι είναι αρκετά πιθανό κάποια μιτοχόνδρια του κυττάρου να παραμένουν ακέραια και αποτελώντας το κλειδί για την ανασύσταση του μιτοχονδριακού πληθυσμού, να επιτρέπουν τελικά την κυτταρική ανάκαμψη (44). Σύμφωνα με τους Tang και συν., τα κύτταρα δύναται να επιβιώσουν της απόπτωσης ακόμα και αφού έχει επέλθει τεμαχισμός του DNA, μέσω μηχανισμών επιδιόρθωσης της βλάβης· όχι όμως πάντα

χωρίς χρωμοσωμικές και γονιδιακές αλλαγές, που τελικά οδηγούν σε φαινοτυπική διαφοροποίηση του κυττάρου ή ακόμα και σε καρκινογένεση (61). Αν και η ίδια η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης θεωρείται από κάποιους αναστρέψιμη, αφού ως φαινόμενο μπορεί να προκληθεί και να αναστραφεί μέσω μηχανισμών που δε σχετίζονται με άλλα χαρακτηριστικά της απόπτωσης γεγονός αλλά είναι Ca^{2+} -εξαρτώμενοι, φαίνεται πως σηματοδοτεί μια μη αναστρέψιμη αποπτωτική διαδικασία (47, 49).

1.7. Είναι αντιστρεπτή η απόπτωση;

Οι Tang και συν. το 2012 ανακοίνωσαν, πως είναι δυνατή μια ενδογενώς υποκινούμενη αναστροφή τη διαδικασίας της απόπτωσης. Μελετήθηκαν αρκετοί διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι και διαπιστώθηκε πως, ακόμα και αν βρίσκονταν σε προχωρημένο στάδιο απόπτωσης, όπου πλέον ανιχνεύονταν όλοι οι μορφολογικοί και βιοχημικοί δείκτες της απόπτωσης, στην πλειοψηφία τους (το 90%) ανέκαμψαν στην πρότερη κατάσταση και πολλαπλασιάστηκαν, όταν απλώς απομακρύνθηκε ο εξωτερικός παράγοντας, που προκάλεσε την πυροδότηση της απόπτωσης. Σε απόδειξη του ευρήματος, τα ίδια κύτταρα, που υπό την επίδραση του αποπτωτικού παράγοντα είχαν εμφανίσει χαρακτηριστικές της απόπτωσης μορφολογικές αλλαγές, επανέκτησαν φυσιολογική μορφολογία με την απομάκρυνση του παράγοντα και όχι απλώς εκείνα, που εξαρχής δεν είχαν επηρεαστεί. Ομοίως η αύξηση των επιπέδων ενεργοποιημένων κασπασών, που διαπιστώθηκε με την επίδραση του αποπτωτικού παράγοντα ανεστράφη με την απομάκρυνσή του (61). Ανάλογη μελέτη των Sun και συν., κατά την οποία πυροδοτήθηκε ο ενδογενής αποπτωτικός μηχανισμός, οδηγώντας στη συρρίκνωση του κυττάρου και στη δημιουργία των χαρακτηριστικών προεκβολών της κυτταρικής μεμβράνης έδειξε πως, είναι δυνατή η αναστροφή της αποπτωτικής διαδικασίας και η κυτταρική επιβίωση με την απομάκρυνση του παράγοντα, που προκάλεσε την απόπτωση. Στη συγκεκριμένη μελέτη το 70% περίπου του κυτταρικού πληθυσμού επανέκαμψε από τη συρρίκνωση, επανακαλλιεργήθηκε και πολλαπλασιάστηκε, παρόλο που είχε διαπιστωθεί η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 στο ~75% των κυττάρων (62).

Το αποπτωτικό κύτταρο πιθανότατα προετοιμάζεται για την επανάκαμψη του ήδη παρουσία του αποπτωτικού παράγοντα (44). Βασικός μηχανισμός για την ανάκαμψη των κυττάρων αποδείχθηκε η *de novo* μεταγραφή του DNA σε RNA (44). Στη μελέτη των Sun και συν. περιγράφονται δύο διακριτές φάσεις ανάκαμψης στις οποίες υπερεκφράζονται και διαφορετικές ομάδες γονιδίων. Στην πρώτη φάση (εντός 4 ωρών από την απομάκρυνση του αποπτωτικού παράγοντα) τα κύτταρα επανεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο, και υπερεκφράζονται τα γονίδια που σχετίζονται με τη μεταγραφή, τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου, και την απόκριση του κυττάρου στο στρες, ενώ στη δεύτερη φάση (εντός 4 με 12 ώρες), παύει ο πολλαπλασιασμός και αυξάνεται η μεταναστευτικότητα των κυττάρων, ενώ παρατηρείται υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταμεταγραφή, όπως την επεξεργασία μη κωδικοποιητικών μεταγράφων RNA και τη βιογένεση ριβοσωμάτων, όπως επίσης την εστιακή προσκόλληση και τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού (44, 62). Τα δεδομένα υποδεικνύουν πως η ανάκαμψη από την απόπτωση ίσως αποτελεί «φυσιολογικό» μηχανισμό, που εξυπηρετεί μια μορφή «μεταλλακτικότητας» του κυττάρου υπό συνθήκες στρες με στόχο την επιβίωση. Ή απλώς αποτελεί μηχανισμό διατήρησης τραυματισμένων κυττάρων, που είναι δύσκολο να αντικατασταθούν, όπως οι ώριμοι νευρώνες και τα κύτταρα της καρδιάς. Ή ακόμα, θα μπορούσε να αποτελεί το μηχανισμό, μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα αρχικά επιβιώνουν της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας και αποκτούν ανθεκτικότητα με την απόκτηση μεταλλάξεων, οι οποίες τα διαφοροποιούν σε πιο επιθετικές και μεταστατικές μορφές (61).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της κρυοσυντήρησης στη βιωσιμότητα και την απόπτωση των CD34+ κυττάρων και της επίδρασης της ελάττωσης των βιώσιμων και των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg, που τελικά εγχύονται στην AMMO, στην κινητική της μετέπειτα αιματολογικής αποκατάστασης. Συμπληρωματικός σκοπός της μελέτης είναι η διάκριση της ασφαλέστερης μεθόδου προσδιορισμού της βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μεταξύ των δυο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων, της μεθόδου με χρώση Trypan Blue (TB) και της καταμέτρησης με κυτταρομετρία ροής (FACS). Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι ο προσδιορισμός μιας ελάχιστης δόσης βιώσιμων και βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων με στόχο την ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ασθενείς και δείγματα

Μελετήθηκαν αναδρομικά 61 ασθενείς, όλοι πάσχοντες από αιματολογικές κακοήθειες και συγκεκριμένα από Πολλαπλούν Μυέλωμα (MM), Λέμφωμα Hodgkin (HL) και Μη-Hodgkin Λεμφώματα (NHL) - λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα (DLBCL), οζώδες λέμφωμα (FL), λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα (MCL), λεμφαδενικά Τ-περιφερικά λεμφώματα (T-NHL) - οι οποίοι υπεβλήθησαν σε Αυτόλογη Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών (AMMO) την περίοδο 2017-2019, στη Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών της Αιματολογικής Κλινικής του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Η συλλογή των κινητοποιημένων ΑΑΚ από το περιφερικό έλαβε χώρα στο τμήμα Κυτταραφαίρεσης της Μονάδας και η κρυοσυντήρηση τους στο Εργαστήριο Κρυοκατάψυξης της Μονάδας.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν για το σκοπό της μελέτης προέρχονται από τα δορυφόρα σωληνάρια των κρυοκατεψυγμένων ασκών, τα οποία μετά την AMMO φυλάσσονται στις ίδιες συνθήκες, ώστε να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια του περιοδικού ελέγχου ποιότητας του εργαστηρίου κρυοκατάψυξης. Η επιλογή των ασθενών ήταν τυχαία ως προς τα χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως το φύλο, την ηλικία, το νόσημα, την κατάσταση νόσου κατά την AMMO, το είδος της μεταθεραπείας, τη δόση ΑΑΚ και την έκβαση της AMMO, περιορίστηκε δε σε δείγματα ασθενών, οι οποίοι είχαν ήδη υποβληθεί σε AMMO, και σε δείγματα με διάρκεια κρυοσυντήρησης που δεν υπερέβαινε τα 2,5 έτη.

2.1.1. Κινητοποίηση ΑΑΚ περιφερικού αίματος

Για το σκοπό της συλλογής αυτόλογου μοσχεύματος ΑΑΚ από το περιφερικό αίμα οι ασθενείς κινητοποιήθηκαν είτε με χημειοθεραπεία και αυξητικό παράγοντα G-CSF είτε μόνο με G-CSF. Τα σχήματα και οι ημέρες χορήγησης φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα. Plerixafor χορηγήθηκε στους πτωχούς κινητοποιητές με λεμφώματα, με στόχο τη συλλογή $\geq 3 \times 10^6$ /Kg ΒΣ σε μια συνεδρία και, στους πτωχούς κινητοποιητές με μυέλωμα, με στόχο τη συλλογή $\geq 6 \times 10^6$ /Kg ΒΣ, είτε

«προγραμματισμένα» (6-10 ώρες πριν τη συλλογή) είτε «κατ' επίκληση» (3-4 ώρες πριν τη συλλογή), αναλόγως των τιμών των CD34+/μl και WBC/μl.

Πίνακας 2.1 Σχήματα προετοιμασίας που χρησιμοποιούνται στην ΑΜΜΟ για κινητοποίηση ΑΑΚ στο περιφερικό αίμα ανάλογα με το νόσημα

Σχήμα κινητοποίησης	Νόσημα	Ημέρες χορήγησης σχήματος	Ημέρα έναρξης χορήγησης G-CSF*	Ημέρα προγραμματισμένης συλλογής ΑΑΚ	Ημέρα 1 ^{ης} καταμέτρησης CD34+/μl περιφερικού αίματος
GCSF, 10mg/Kg	MM/HL/NHL	D0-D5	D0	D5	D4
Cy, 2g/m ²	MM/HL/NHL	D1	D2	D10	D9
(R)ESHAP	HL/NHL	D1-5	D6	D15	D14
(R)DHAP	HL/NHL	D1-4	D5	D15	D14
IGEV	HL	D1-4	D5	D12	D11

*χορηγείται καθημερινά μέχρι την ολοκλήρωση των συλλογών

2.1.2. Μέτρηση CD34+/μl στο περιφερικό αίμα πριν τη συλλογή

Οι μετρήσεις του αριθμού των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας ροής του τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Λαϊκού Νοσοκομείου. Για τη μέτρηση απαιτείται ολικό αίμα περιφερικού αίματος σε φιαλίδιο με EDTA. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στον κυτταρομετρητή BD FACSCanto™II με πρότυπο πρωτόκολλο βάσει των κριτηρίων της ISHAGE (63). Η μέθοδος χρησιμοποιεί το BD™ Stem Cell Enumeration Kit (BD, Catalog No. 344563). Τα βήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν α) αραίωση του δείγματος με PBS+0,5%BSA επί αριθμού WBC>40×10³/μl· ο συντελεστής αραίωσης συνυπολογίζεται στο τελικό αποτέλεσμα, β) ανάμιξη 20μl αντιδραστηρίου CD45/CD34 (CD45 FITC, clone 2D1 / CD34 PE, clone 8G12), 20μl χρωστικής 7-ADD, 100μl δείγματος σε ένα Trucount tube (με σημασμένα σφαιρίδια, beads), ήπια ανάδευση σε vortex και επώαση για 20min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, γ) προσθήκη 2ml διαλύματος λύσης (διάλυμα ammonium chloride αραιωμένο 1:9 με αποσταγμένο νερό) και ήπια ανάδευση, δ) επώαση για 10min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, ε) άμεση μέτρηση στον κυτταρομετρητή ροής. Οι προεπιλεγμένοι στόχοι μέτρησης είναι α) τουλάχιστον 75000 βιώσιμα CD45+ κύτταρα (CD45 viable events), β) τουλάχιστον 125 ελάχιστα βιώσιμα CD34 κύτταρα (CD34 viable events), γ) 900sec μέγιστος χρόνος μέτρησης και δ) τουλάχιστον 1000 σφαιρίδια BD Trucount. Κατά την ανάλυση οριοθετούνται

οι πληθυσμοί στα στικτογράμματα έτσι ώστε να τηρούνται τα κριτήρια της ISHAGE για την αναγνώριση και απομόνωση των ζωντανών CD34+ Κυττάρων (SSC low, FSC med, CD45dim, CD34+, 7-ADD-). Ο απόλυτος αριθμός των CD34+ κυττάρων υπολογίζεται αυτόματα από το λογισμικό του κυτταρομετρητή με τον τύπο $CD34/\mu l = (\text{viable CD34 events} \times B \times DF) / (\text{αριθμός beads} \times V)$, όπου V είναι ο όγκος δείγματος (100μl), B είναι η συγκέντρωση των Trucount beads και DF είναι ο συντελεστής αραιώσης (Dilution factor). Στην εκτύπωση του αποτελέσματος αναφέρονται η συγκέντρωση των CD34+ και των CD45+ κυττάρων, το ποσοστό των CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων και η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων (εικ. 2.3).

2.1.3 Συλλογή ΑΑΚ

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε συλλογή ΑΑΚ όταν τα $WBC > 8000/\mu l$ και ο απόλυτος αριθμός των CD34+ ήταν $\geq 20/\mu l$. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε μέσω κυτταροδιαχωριστή συνεχούς ροής, τον Spectra Optia Apheresis System (Terumo-BCT) με την εκτέλεση του προγράμματος συνεχόμενης συλλογής μονοπύρηνων κυττάρων (CMNC). Κατά τη συλλογή, επεξεργάζεται ο συνολικός όγκος αίματος του σώματος (TBV, Total Blood Volume) μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα διπλού αυλού τύπου αιμοκάθαρσης, 1,5 έως 3,5 φορές, με ροή 60-85 ml/min, ενώ συλλέγονται τελικά 60-240 περίπου ml προϊόντος συλλογής (ρυθμός συλλογής 1ml/min), αναλόγως του αριθμού των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και του τελικού στόχου συλλογής CD34+/Kg βάρους σώματος του ασθενούς/δέκτη.

2.1.4 Μέτρηση CD34+/Kg στο προϊόν συλλογής

Οι μετρήσεις του αριθμού των CD34+ κυττάρων στα προϊόντα της συλλογής πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας ροής του τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Λαϊκού Νοσοκομείου, είτε την ίδια είτε την επόμενη ημέρα από τη συλλογή, έπειτα από συντήρηση του προϊόντος στους 4°C. Το πρωτόκολλο της μέτρησης είναι το ίδιο με αυτό της μέτρησης των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Στην εκτύπωση του αποτελέσματος αναφέρονται η συγκέντρωση των CD34+ και των CD45+ κυττάρων, το ποσοστό των CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων και η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων (εικ. 2.4). Προκειμένου να εκτιμηθεί ο αριθμός των CD34+/Kg βάρους σώματος, η

συγκέντρωση των CD34+ κυττάρων, πολλαπλασιάζεται με τον όγκο του προϊόντος από τον οποίο εξήχθη το δείγμα, και το γινόμενο αυτών διαιρείται με το σωματικό βάρος του ασθενή (Kg).

2.1.5 Κρυοσυντήρηση προϊόντος συλλογής

Η κρυοσυντήρηση του προϊόντος ακολουθεί πάντοτε της μέτρησης των CD34+/Kg. Πραγματοποιείται εντός 24 ωρών από τη λήξη της συλλογής, μετά από συντήρηση του προϊόντος στους 4°C. Η διαδικασία βαθμιαίας κρυοκατάψυξης, βάσει του πρωτοκόλλου που ακολουθείται στο Εργαστήριο Κρυοκατάψυξης της ΜΜΟ της Αιματολογικής Κλινικής, περιλαμβάνει: α) αραιώση του μοσχεύματος με αυτόλογο πλάσμα ή/και διάλυμα 5% ανθρώπινης αλβουμίνης ώστε η συγκέντρωση των WBC να είναι $80-300 \times 10^3/\mu\text{l}$, β) διανομή του μοσχεύματος σε 1-8 ειδικούς για κρυοσυντήρηση AAK ασκούς, ονομαστικού όγκου 650ml και χωρητικότητας μοσχεύματος 60-180ml (PS650, Biomed Device), γ) παρασκευή κρυοπροστατευτικού διαλύματος τελικής συγκέντρωσης DMSO 20%, με την ανάμειξη >99,9% DMSO, USP Grade (CryoSure-DMSO, WAK-Chemie) σε διάλυμα 5% Human Albumin (20% Human Albumin σε διάλυμα N/S) ή/και αυτόλογου πλάσματος, δ) σταθεροποίηση του κρυοπροστατευτικού διαλύματος για μία ώρα στον πάγο, ε) ανάμειξη κρυοπροστατευτικού διαλύματος και κυτταρικού προϊόντος στον ασκό κρυοκατάψυξης σε ίσους όγκους, ώστε η τελική συγκέντρωση του DMSO να ισούται με 10%, στ) παρακράτηση 0,5-0,8 ml από τον ασκό σε κρυοφιαλίδιο (CryoPure Tube 1,6ml, STARSTEDT), ζ) σφράγιση του ασκού κρυοκατάψυξης με το δορυφόρο κρυοφιαλίδιο σε εξωτερικό προστατευτικό ασκό, η) έναρξη της βαθμιαίας κρυοκατάψυξης. Κάθε ασκός στον οποίο προστίθεται κρυοπροστατευτικό διάλυμα τοποθετείται εντός του βαθμιαίου κρυοκαταψύκτη (KRYO10 Series II, του οίκου PLANER) μέσα σε ειδική μεταλλική κασέτα, και παραμένει σε θερμοκρασία 4°C μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας για όλους τους ασκούς, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 20min (2-3min για κάθε ασκό). Το πρόγραμμα βαθμιαίας κρυοκατάψυξης διαρκεί περίπου 1h και 10min και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) παραμονή στους 4°C για 4min,
- 2) βαθμιαία ελάττωση της θερμοκρασίας κατά 2°C/min έως τους -5°C,
- 2) βαθμιαία ελάττωση της θερμοκρασίας κατά 1°C/min έως τους -40°C,

3) βαθμιαία ελάττωση της θερμοκρασίας κατά 5°C/min έως τους -160°C.

Με τη λήξη της βαθμιαίας κρυοκατάψυξης οι ασκοί μεταφέρονται αμέσως σε δεξαμενές υγρού αζώτου, είτε στην υγρή είτε στην αέρια φάση σε θερμοκρασίες μεταξύ -140°C και -196°C και φυλάσσονται εκεί σε σταθερή θερμοκρασία έως την απόψυξη για έγχυση.

2.1.6 Μεγαθεραπεία

Τα σχήματα της μεγαθεραπείας στην οποία υπεβλήθησαν οι ασθενείς της μελέτης φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα.

Πίνακας 2.2 Μεγαθεραπευτικά σχήματα προετοιμασίας που χρησιμοποιούνται στην AMMO

Σχήμα μεγαθεραπείας	Νόσημα	Ημέρες χορήγησης σχήματος πριν την έγχυση (D0)	Ημέρα έναρξης χορήγησης G-CSF μετά την έγχυση των AAK
Melphalan 200mg/m ²	MM	D-2	D+5
Melphalan 140mg/m ²	MM	D-2	D+5
BEAM ¹	HL/NHL	D-7 έως D-2	D+1
BEAC ²	HL/NHL	D-7 έως D-2	D+1
Triple Alkylator ³	NHL (με συμμετοχή ΚΝΣ)	D-9- έως D-2	D+1

¹BCNU/Cytarabine/Etoposide/Melphalan, ²: ³ BCNU/Cyclophosphamide/Thiotepa, ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα, D: ημέρα

2.1.7 Απόψυξη και έγχυση CD34+ κυττάρων

Την ημέρα της επανέγχυσης των κυττάρων το δορυφόρο φιαλίδιο από κάθε ασκό αποκόπτεται από τον ασκό κρυοκατάψυξης και φυλάσσεται σε ειδικά κουτιά στην αέρια φάση των δεξαμενών υγρού αζώτου.

Η απόψυξη των ασκών προς έγχυση λαμβάνει χώρα ξεχωριστά για κάθε ασκό και έπειτα από την ολοκλήρωση της έγχυσης του προηγούμενου ασκού. Η διαδικασία της απόψυξης περιλαμβάνει: α) βύθιση του ασκού σε υδατόλουτρο 38,3°C εντός προστατευτικού ασκού και απόψυξη υπό συνεχή ανάδευση για 2-3 min έως την διατήρηση ενός μικρού τεμαχίου πάγου, β) έξοδο του ασκού από το υδατόλουτρο και ανάδευση έως την απόψυξη και του τελευταίου τεμαχίου πάγου, γ) προσαρμογή στον ασκό μιας συσκευής έγχυσης ορού χωρίς φίλτρο (Infuset) με άσηπτη τεχνική δ) κρονιδών έγχυση του αποψυγμένου προϊόντος. Η διαδικασία από

την απόψυξη έως την ολοκλήρωση της έγχυσης πρέπει να ολοκληρώνεται εντός 15 min.

2.2 Μέθοδοι

Όλα τα στάδια, από την απόψυξη έως και την ανάλυση των δειγμάτων, έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Λαϊκού Νοσοκομείου. Το πειραματικό πρωτόκολλο, κυρίως ως προς τις ποσότητες αντισωμάτων, δειγμάτων και αντιδραστηρίων, και τους χρόνους και τις θερμοκρασίες επώασης, οριστικοποιήθηκε έπειτα από μια σειρά δοκιμαστικών πειραματικών μετρήσεων, τουλάχιστον 100 επιπλέον δειγμάτων, που περιελάμβαναν έλεγχο ακρίβειας και επαναληψιμότητας. Οι μετρήσεις όλων των δειγμάτων έπειτα πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Η διαδικασία απόψυξης - αραίωσης - μέτρησης βιωσιμότητας με Trypan blue - μέτρησης βιωσιμότητας και απόπτωσης με FACS πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε δείγμα. Το πλάνο εργασίας περιγράφεται σχηματικά στην εικόνα 2.1.

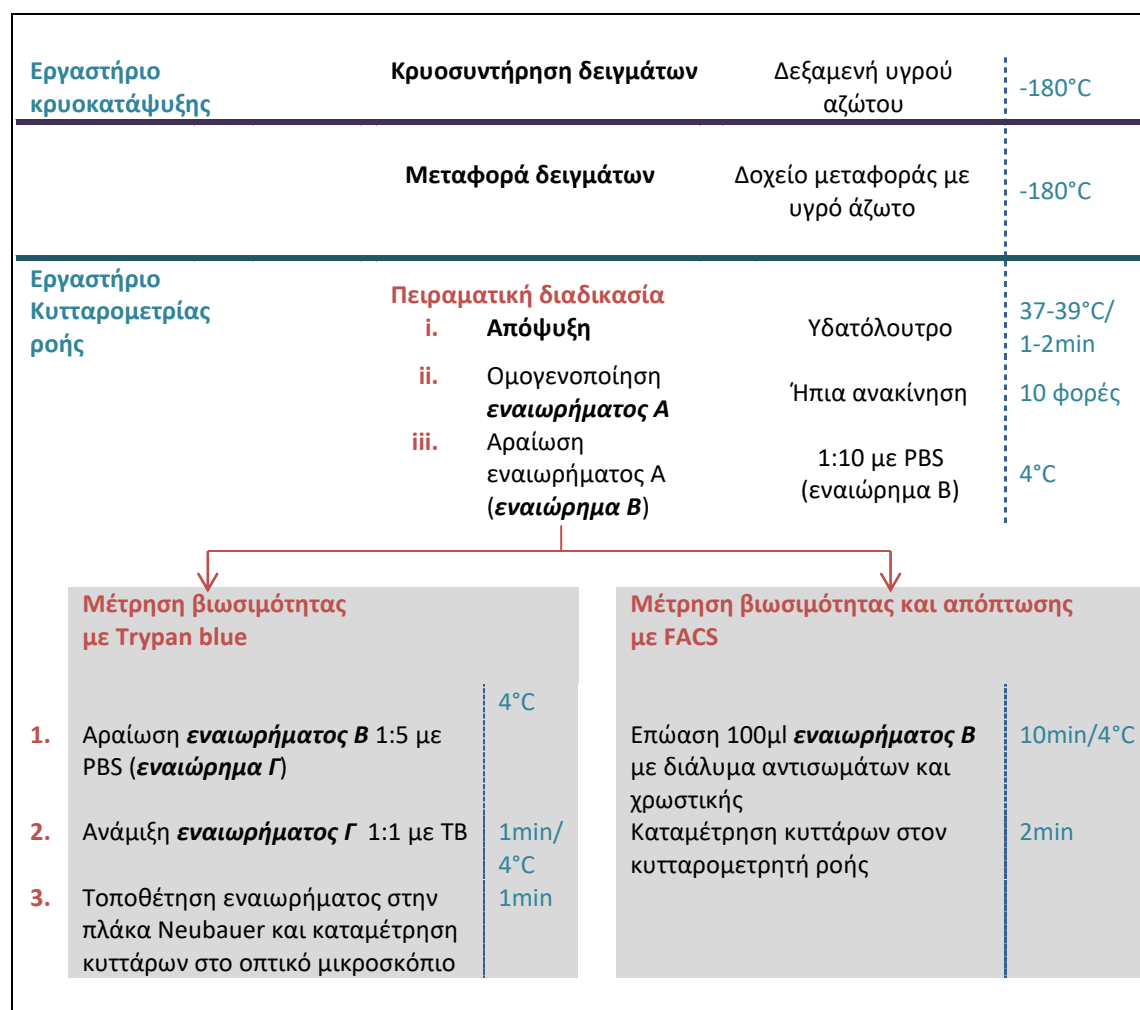
2.2.1 Απόψυξη δειγμάτων

Για την απόψυξη των δειγμάτων απαιτείται υδατόλουτρο 37°C, στο οποίο τα δείγματα βυθίζονται αμέσως μετά την έξοδό τους από το υγρό άζωτο. Η απόψυξη πρέπει να είναι γρήγορη (~1min για κρυοφιαλίδιο με περιεχόμενο όγκου 0,5-1ml) καθώς η αργή απόψυξη οδηγεί στο σχηματισμό μεγαλύτερων ενδοκυτταρικών κρυστάλλων πάγου και διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης, και η παρατεταμένη θέρμανση των κυττάρων προκαλεί ελάττωση της βιωσιμότητας. Για την αποφυγή των παραπάνω απαιτείται θερμοκρασία 37-39°C, συνεχής ανάδευση του κρυοφιαλιδίου, και εξαγωγή του από το υδατόλουτρο όσο διατηρείται ένα πολύ μικρό τεμάχιο πάγου. Η ομογενοποίηση, και αραίωση του αποψυγμένου κυτταρικού εναιωρήματος πρέπει να γίνεται επίσης ταχύτατα, διότι καθώς παρακάμπτεται το στάδιο της πλύσης των κυττάρων από το DMSO, πρέπει να εξασφαλίζεται η μη παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων στην υπεροσμωτικότητα, που προκαλεί το DMSO κατά την προσπάθεια επανεκκίνησης του φυσιολογικού μεταβολισμού τους, η οποία οδηγεί σε διόγκωση, διάρρηξη και κυτταρικό θάνατο. Για τον λόγο αυτό, όλα τα βήματα μετά την απόψυξη και ομογενοποίηση

πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C (βύθιση όλων των σωληναρίων σε νερό 4°C) και εντός 15min.

Βήματα διαδικασίας:

1. Βύθιση του φιαλιδίου στο υδατόλουτρο 37°C και απόψυξη υπό ήπια συνεχή ανάδευση μέχρι τη διατήρηση ενός μικρού τμήματος πάγου (~1min).
2. Έξοδος του φιαλιδίου από το υδατόλουτρο και ομογενοποίηση του εναιωρήματος με ήπια ανακίνηση του φιαλιδίου 10 φορές μέχρι την πλήρη απόψυξη (εναιώρημα A).
3. Άμεση αραίωση του εναιωρήματος A 1:10 με PBS 4°C με μεταφορά 100μl του εναιωρήματος σε 900μl PBS και ανάδευση σε vortex (εναιώρημα B).
4. Διατήρηση του εναιωρήματος B σε μπάνιο 4°C καθ' όλη τη διάρκεια των επόμενων βημάτων.



Εικόνα 2.1 Πλάνο εργασίας για την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας.

2.2.2 Μέτρηση βιωσιμότητας (viability) και απόπτωσης κυτταρικών πληθυσμών

Μέτρηση βιωσιμότητας με τη μέθοδο Trypan blue

Κατά τη μέτρηση της βιωσιμότητας με χρώση με Trypan blue, τα ζώντα κύτταρα, σε αντίθεση με τα νεκρά, διατηρούν άθικτη την κυτταρική μεμβράνη τους, η οποία απομακρύνει τη χρωστική και, κατά συνέπεια, διατηρούν «καθαρό» το κυτταρόπλασμά τους, και φαίνονται διαφανή κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο. Αντίθετα, τα νεκρά κύτταρα απορροφούν τη χρωστική και βάφονται μπλε. Για τη μέτρηση, απαιτείται αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και φακός x10. Μετά από την ανάμειξη του κυτταρικού εναιωρήματος με τη χρωστική, ποσότητα δείγματος τοποθετείται στο αιμοκυτταρόμετρο, και καταμετράται ο αριθμός των κυττάρων με «καθαρό», διαφανές κυτταρόπλασμα (ζώντα κύτταρα) και ο αριθμός των βαμμένων μπλε κυττάρων (νεκρά κύτταρα) (εικ. 2.2β). Το ποσοστό των ζώντων κυττάρων επί του συνολικού αριθμού τους (ζώντα και νεκρά) αποτελεί το ποσοστό βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού (64).

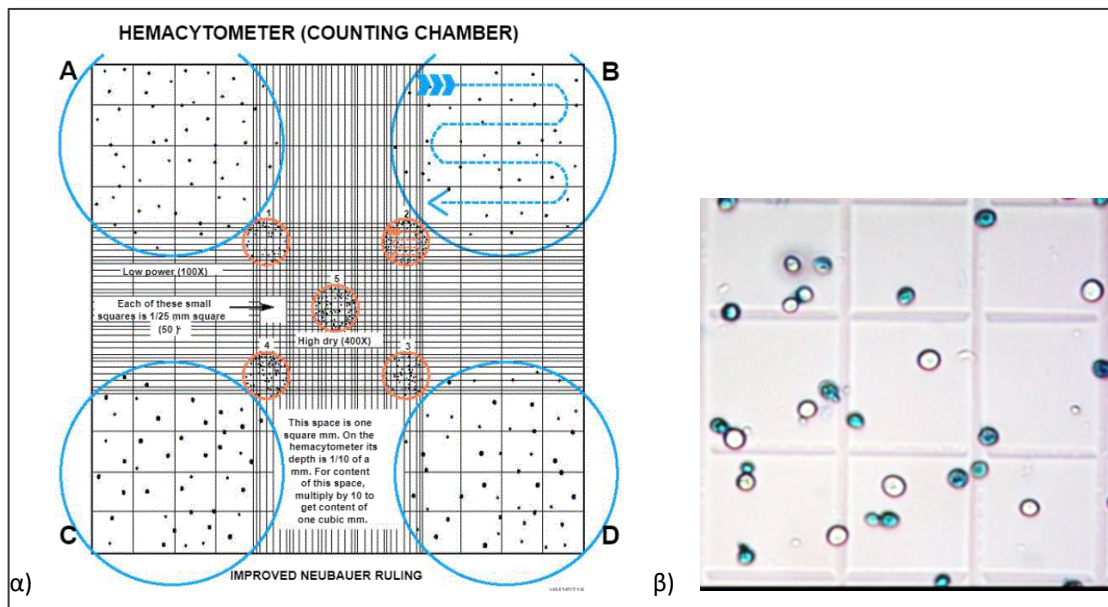
Για την ορθή εκτέλεση της μεθόδου απαιτείται κατάλληλη συγκέντρωση κυττάρων (1000-3500/μl) ώστε να μην επικαλύπτονται μεταξύ τους και να επιτρέπεται η γρήγορη ανάγνωση και η καταμέτρηση τουλάχιστον 100 κυττάρων σε όλα τα τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου (εικ. 2.2α). Η καταμέτρηση πρέπει να αρχίζει 1min μετά την ανάμειξη και να ολοκληρώνεται γρήγορα, εντός 2min το πολύ, διότι η αύξηση του χρόνου ανάγνωσης οδηγεί σε ψευδώς αυξημένο αριθμό νεκρών κυττάρων εξαιτίας της τοξικότητας της χρωστικής. Για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων, επίσης πρέπει το μέσο αραίωσης των κυττάρων να στερείται πρωτεϊνών ορού. Η πλάκα και η καλυπτρίδα πρέπει να είναι απόλυτα καθαρές και η χρωστική να είναι απαλλαγμένη από ιζήματα. Ο φακός x10 επιτρέπει γρήγορη ανάγνωση και ταυτόχρονα διάκριση των λευκοκυττάρων από τα αιμοπετάλια, τα οποία έχουν σαφώς μικρότερο μέγεθος (εικ. 2.2β).

Βήματα εκτέλεσης μεθόδου:

1. Αραίωση του εναιωρήματος B 1:5 με PBS 4°C με μεταφορά 100μl από το εναιώρημα B σε 400μl PBS και ανάδευση σε vortex (εναιώρημα Γ).

2. Ανάμειξη 10μl εναιωρήματος Γ με 10μl χρωστικής Trypan Blue, 0,4% (εναιώρημα Δ), ανάμειξη 10 φορές με την πιπέττα και μεταφορά 10μl εναιωρήματος Δ σε κάθε έναν από τις δυο θαλάμους της πλάκας Neubauer.
3. Έναρξη καταμέτρησης 1min μετά την ανάμειξη κυτταρικού εναιωρήματος και χρωστικής και ολοκλήρωση εντός 2min με την καταμέτρηση τουλάχιστον 100 κυττάρων σε όσο το δυνατόν περισσότερα πεδία της πλάκας.
4. Υπολογισμός ποσοστού ζωντανών κυττάρων (% βιωσιμότητα) με τον τύπο:

$$\% \text{βιωσιμότητα} = (\text{ζωντανά κύτταρα} / \text{ζωντανά και νεκρά κύτταρα}) \times 100$$



Εικόνα 2.2 Μέτρηση βιωσιμότητας με τη μέθοδο Trypan blue: α) Η καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται και στις 4 με μπλε κυκλωμένες περιοχές της πλάκας και με φορά ανάγνωσης όπως δείχνει το μπλε βέλος. Τα κύτταρα που βρίσκονται επάνω στις διαχωριστικές γραμμές μετρώνται μόνο μια φορά, βάση του κανόνα ότι σε κάθε τετράγωνο συμπεριλαμβάνονται μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται στην επάνω και δεξιά πλευρά του. β) τα ζώντα λευκά κύτταρα διατηρούν άθικτη την κυτταρική μεμβράνη τους, η οποία απομακρύνει τη χρωστική trypan Blue και, κατά συνέπεια, διατηρούν «καθαρό» το κυτταρόπλασμά τους, και φαίνονται διαφανή κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο. Αντίθετα, τα νεκρά κύτταρα απορροφούν τη χρωστική και βάζονται μπλε. Τα πολύ μικρότερα διαφανή κύτταρα είναι αμποπετάλια.

Μέτρηση βιωσιμότητας και απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

Με κυτταρομετρία ροής, είναι δυνατή η αδρή εκτίμηση των μορφολογικών αλλαγών που προκύπτουν στα αποπτωτικά και τα νεκρά κύτταρα, με τη μελέτη των σκεδαστικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, δηλαδή του πρόσθιου σκεδασμού (FSC, Forward Scatter), που είναι συνάρτηση του μεγέθους και του πλάγιου σκεδασμού (SSC, Side Scatter), που είναι συνάρτηση της πολυπλοκότητας του κυτταροπλάσματος (π.χ. κοκκίωση) (65). Τα αποπτωτικά και τα νεκρά κύτταρα, έχουν μικρότερο μέγεθος και άρα μικρότερο FSC και μεγαλύτερη πολυπλοκότητα κυτταροπλάσματος και άρα υψηλότερο SSC, συγκριτικά με τα βιώσιμα κύτταρα, γεγονός που απεικονίζεται στο στικτόγραμμα FSC/SSC (εικ. 2.5).

Με την προσθήκη της χρωστικής 7-AAD (7-amino actinomycin D) στο εναιώρημα των κυττάρων ταυτόχρονα με τα αντι-CD34PE και αντι-CD45FITC μονοκλωνικά αντισώματα, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των βιώσιμων και των νεκρών CD34+ και CD45+ κυττάρων (66, 67) (εικ. 2.5). Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η χρωστική 7-AAD διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων ή των αποπτωτικών κυττάρων τελικού σταδίου - αλλά όχι των ζωντανών κυττάρων που διατηρούν άθικτη την κυτταροπλασματική μεμβράνη τους - και συνδέεται με το πυρηνικό DNA (63).

Τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα δε συνδέονται με τη χρωστική 7-AAD. Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση της Annexin-V και της χρωστικής 7-AAD δίνει τη δυνατότητα σαφέστερης διάκρισης μεταξύ των βιώσιμων (7-AAD-/Annexin-V-), των πρώιμων αποπτωτικών (7-AAD-/ Annexin-V+) και των νεκρών (7-AAD+/Annexin-V+) κυττάρων (εικ. 2.5) .

Η μέθοδος διάκρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων με την Annexin-V βασίζεται στο ότι α) ενώ οι μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων παρουσιάζουν φωσφολιπιδική ασυμμετρία, με τη φωσφατιδυλοχολίνη και την σφιγγομυελίνη να επικρατούν στην εξωκυτταρική μεμβρανική επιφάνεια και τη φωσφατιδυλεθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλοσερίνη να επικρατούν στην ενδοκυτταρική μεμβρανική επιφάνεια, κατά την αποπτωτική διαδικασία η φωσφολιπιδική ασυμμετρία χάνεται, με βασικό χαρακτηριστικό την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης, β) η Annexin-V

συνδέεται εκλεκτικά σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλοσερίνη (68, 69).

Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης αποτελεί χαρακτηριστικό των αποπτωτικών κυττάρων αλλά λαμβάνει χώρα και κατά τη νέκρωση. Επιπροσθέτως, στα νεκρωτικά κύτταρα, η Annexin-V μπορεί, λόγω της διάρρηξης της μεμβράνης, να προσδεθεί στην φωσφατιδυλοσερίνη και της ενδοκυτταρικής επιφάνειας. Σε κάθε περίπτωση, όμως, υπάρχει διάρρηξη της μεμβράνης και άρα η σαφής διάκριση των νεκρωτικών και αποπτωτικών κυττάρων είναι δυνατή με την ταυτόχρονη χρήση των δυο χρωστικών, της 7-ADD και της Annexin-V (48, 68, 70).

Βήματα εκτέλεσης μεθόδου:

1. Ανάδευση εναιωρήματος B στο vortex.
2. Μεταφορά 100μl εναιωρήματος B στο σωληνάριο
3. Προσθήκη 20μl αντι-CD34PE, 20μl αντι-CD45FITC, 20μl 7-AAD, 5μl Annexin-V-APC και 100μl Annexin Binding Buffer και ανάδευση στο vortex.
4. Επώαση για 10min σε σκοτεινό μέρος στους 4°C.
5. Προσθήκη 300μl Annexin Binding Buffer.
6. Μέτρηση στον κυτταρομετρητή τουλάχιστον 100.000 NC events (αριθμό εμπύρηνων κυττάρων).
7. Ανάλυση του αποτελέσματος με οριοθέτηση των υπό μελέτη πληθυσμών (gating).
8. Το λογισμικό του κυτταρομετρητή υπολογίζει το ποσοστό του κάθε υποπληθυσμού στο σύνολο των CD34+ και CD45+ κυττάρων.

Η ανάλυση γίνεται με τη διαδοχική οριοθέτηση (gating) των υπό μελέτη πληθυσμών ως εξής:

- στο στικτόγραμμα FSC/SSC επιλέγονται όλα τα εμπύρηννα κύτταρα (nucleated cells, NC),
- στο στικτόγραμμα CD45/SSC επιλέγονται όλα τα CD45+ κύτταρα (λευκοκύτταρα),
- στο στικτόγραμμα CD34/SSC επιλέγονται όλα τα CD34+ κύτταρα,

- στο στικτόγραμμα 7-AAD/Annexin-V διαχωρίζονται τα νεκρά (7-AAD+/Annexin-V+: Dead CD34+), τα πρώιμα αποπτωτικά (7-AAD-/Annexin-V+: Apoptotic CD34+) και τα βιώσιμα (7-AAD-/Annexin-V-: Live CD34+) κύτταρα.

Η τοποθέτηση των περιοχών που οριοθετούν τα βιώσιμα, τα πρώιμα αποπτωτικά και τα νεκρά κύτταρα έγινε με τη χρησιμοποίηση control. Ο συνδυασμός της παρατήρησης των στικτογραμμάτων Annexin-V/7-ADD, SSC/7-ADD και FSC/SSC μπορεί να βοηθήσει αρκετά στην ασφαλέστερη οριοθέτηση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρών πληθυσμών.

Προκαταρκτικά πειράματα

A. Έλεγχος αντισωμάτων

Για τον έλεγχο της λειτουργίας του αντισώματος Annexin-V APC πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραματικών μετρήσεων με:

- α) ένα δοκιμαστικό σωληνάριο με το κυτταρικό ελαιώρημα, αντι-CD34 PE, αντι-CD45 FITC, Annexin-V APC και 7-AAD (βασικό σωληνάριο),
- β) ένα δοκιμαστικό σωληνάριο με το κυτταρικό ελαιώρημα, αντι-CD34 PE, αντι-CD45 FITC και 7-AAD χωρίς Annexin-V APC (control 1),
- γ) ένα δοκιμαστικό σωληνάριο με το κυτταρικό ελαιώρημα, αντι-CD34 PE, αντι-CD45 FITC, Annexin-V APC, χωρίς 7-AAD (control 2), και
- δ) ένα δοκιμαστικό σωληνάριο με το κυτταρικό ελαιώρημα, με αντι-CD34 PE, αντι-CD45 FITC, χωρίς Annexin-V APC και χωρίς 7-AAD (control 3).

B. Οριοθέτηση πληθυσμών

Η απόπτωση αποτελεί ένα φαινόμενο δυναμικό, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στο στικτόγραμμα Annexin-V/7-AAD, με τη χαρακτηριστική εικόνα της «συνέχειας» των ζωντανών μη αποπτωτικών κυττάρων και των ζωντανών πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη δυσκολία ακριβούς οριοθέτησής τους. Με τη σύγκριση των στικτογραμμάτων που προέκυψαν από τις αναλύσεις δειγμάτων και των αντίστοιχων controls, έγινε εφικτή η οριοθέτηση των μη αποπτωτικών, των πρώιμα αποπτωτικών και των νεκρών κυττάρων (εικ. 2.5).

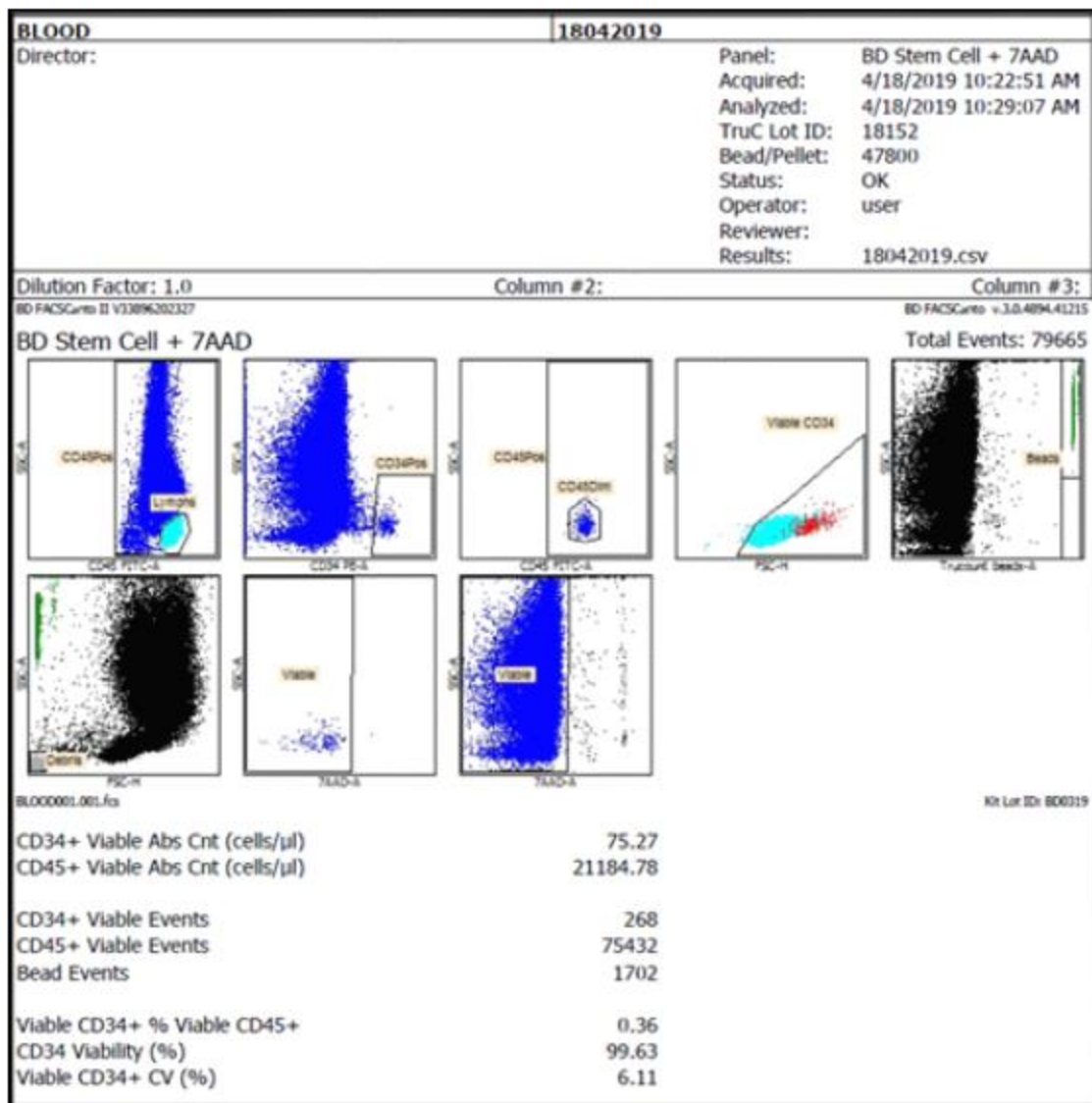
Γ. Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών

Σε συνέχεια προκαταρκτικών πειραμάτων, υιοθετήσαμε τροποποιήσεις ώστε να ελαχιστοποιήσουμε τους τεχνικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα και την απόπτωση μετά την απόψυξη:

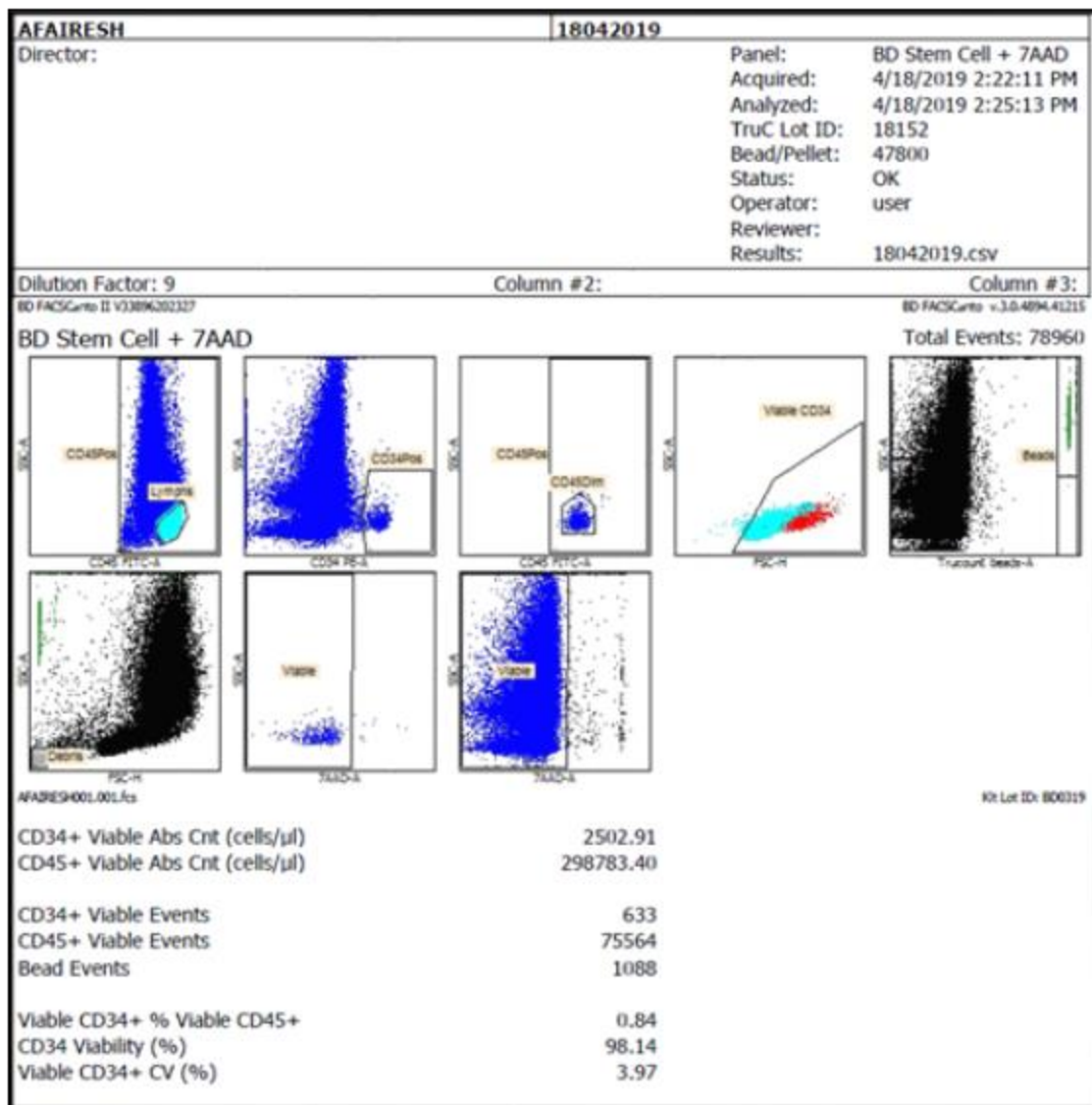
- Η πλύση του προϊόντος από το DMSO εγκαταλείφθηκε, εφόσον, και εμείς όπως και άλλοι, δεν παρατηρήσαμε καμία διαφοροποίηση στα ποσοστά βιωσιμότητας και απόπτωσης, ως αποτέλεσμα της κυτταροτοξικότητας του DMSO, όταν τα προϊόντα αραιώνονταν αμέσως μετά την απόψυξη και παρέμεναν στους 4°C σε όλα τα μετέπειτα βήματα (71-74).
- Ο χρόνος επώασης των αντισωμάτων μειώθηκε από 20min σε 10min ώστε να μειωθεί η διάρκεια έκθεσης των κυττάρων στο DMSO, εφόσον και εμείς όπως και άλλοι δεν παρατηρήσαμε διαφοροποίηση του τελικού αποτελέσματος από την ελάττωση του χρόνου επώασης (72).
- Το στάδιο λύσης εγκαταλείφθηκε επίσης, καθώς έχει δειχθεί πως κατά τη λύση των ερυθρών ενδεχομένως απελευθερώνονται μόρια, τα οποία να προκαλούν εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων, γεγονός που τελικά θα οδηγούσε σε ψευδή αριθμό αποπτωτικών κυττάρων (72, 75, 76).

2.2.3 Στατιστική μέθοδος

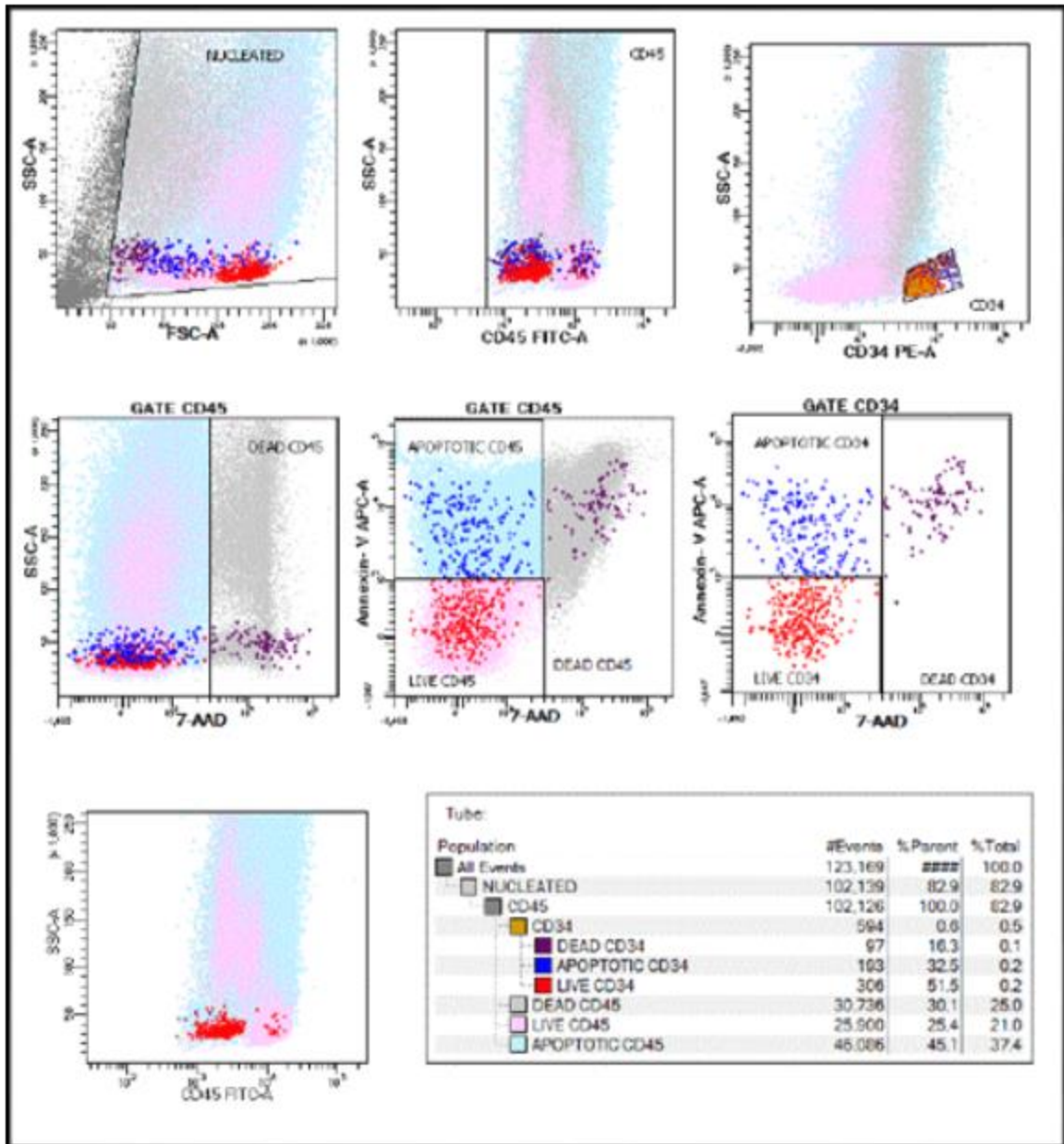
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS version 25. Το διαδικτυακό πρόγραμμα χρήσης του SPSS, Laerd statistics (Tutorial for SPSS Statistics), χρησιμοποιήθηκε α) για την επιλογή των κατάλληλων στατιστικών τεστ και β) ως οδηγός για την ορθή εκτέλεσή τους (77).



Εικόνα 2.3 Εκτύπωση αποτελέσματος μέτρησης CD34+/μl με κυτταρομετρία ροής σε δείγμα περιφερικού αίματος πριν τη συλλογή. Κατά την ανάλυση οριοθετούνται οι πληθυσμοί στα σκιστογράμματα έτσι ώστε να τηρούνται τα κριτήρια της ISHAGE για την αναγνώριση και απομόνωση των ζωντανών CD34+ Κυττάρων (SSC low, FSC med, CD45dim, CD34+, 7-ADD-). Στην εκτύπωση του αποτελέσματος αναφέρονται η συγκέντρωση των CD34+ και των CD45+ κυττάρων, το ποσοστό των CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων και η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων.



Εικόνα 2.4 Εκτύπωση αποτελέσματος μέτρησης CD34+/μl με κυτταρομετρία ροής σε δείγμα φρέσκου προϊόντος συλλογής AAK. Κατά την ανάλυση οριοθετούνται οι πληθυσμοί στα στικτογράμματα έτσι ώστε να τηρούνται τα κριτήρια της ISHAGE για την αναγνώριση και απομόνωση των ζωντανών CD34+ Κυττάρων (SSC low, FSC med, CD45dim, CD34+, 7-ADD-). Στην εκτύπωση του αποτελέσματος αναφέρονται η συγκέντρωση των CD34+ και των CD45+ κυττάρων, το ποσοστό των CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων και η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων.



Εικόνα 2.5 Εκτύπωση αποτελέσματος μέτρησης βιωσιμότητας και απόπτωσης CD45+ και CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής σε δείγμα κρυοκατεψυγμένου προϊόντος συλλογής ΑΑΚ μετά από απόψυξη: α) Η διαδοχική οριοθέτηση (gating) των υπό μελέτη πληθυσμών γίνεται ως εξής: στο σικτιόγραμμα FSC/SSC επιλέγονται όλα τα εμπύρνα κύτταρα (nucleated cells, NC) → στο σικτιόγραμμα CD45/SSC επιλέγονται όλα τα CD45+ κύτταρα (λευκοκύτταρα) → στο σικτιόγραμμα CD34/SSC επιλέγονται όλα τα CD34+ κύτταρα → στο σικτιόγραμμα 7-AAD/Annexin-V διαχωρίζονται τα νεκρά (7-AAD+/Annexin-V+: Dead CD34+), τα πρώιμα αποπτωτικά (7-AAD-/Annexin-V+: Aποπτοτικό CD34+) και τα βιώσιμα (7-AAD-/Annexin-V-: Live CD34+) κύτταρα. β) Σικτιόγραμμα FSC/SSC: Αδρή διάκριση αποπτωτικών (μπλε) και νεκρών (μωβ) κυττάρων από τα βιώσιμα (κόκκινα) κύτταρα: τα αποπτωτικά και νεκρά κύτταρα έχουν μικρότερο μέγεθος και άρα μικρότερο FSC και μεγαλύτερη πολυπλοκότητα κυτταροπλάσματος και άρα υψηλότερο SSC, συγκριτικά με τα βιώσιμα κύτταρα. γ) Σικτιόγραμμα 7-ADD/SSC: Διάκριση βιώσιμων (7-AAD -, όχι μωβ) και νεκρών (7-AAD +, μωβ) CD34+ κυττάρων. δ) Σικτιόγραμμα 7-ADD/Annexin-V: Σαφέστερη διάκριση μεταξύ των βιώσιμων (κόκκινα), των πρώιμων αποπτωτικών (μπλε) και των νεκρών (μωβ) CD34+ κυττάρων. ε) Σικτιόγραμμα Annexin-V/7-AAD: η χαρακτηριστική εικόνα της «συνέχειας» των ζωντανών μη αποπτωτικών κυττάρων και των ζωντανών πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων δικαιολογείται από τη φύση της απόπτωσης ως δυναμικό φαινόμενο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενικά

3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών

Μελετήθηκαν 61 ασθενείς ηλικίας 17-71 ετών με διάμεση ηλικία τα 53 έτη, 42 άρρενες και 19 θήλεα και διάμεση ηλικία τα 53 και 55 έτη αντίστοιχα. Οι 22 ασθενείς (36,1%, 16 άρρενες/6 θήλεα) έπασχαν από μη-Hodgkin λεμφώματα (NHL), οι 19 (31,1%, 13 άρρενες/6 θήλεα) από Hodgkin λέμφωμα (HL) και οι 20 (32,8%, 13 άρρενες/7 θήλεα) από πολλαπλούν μυέλωμα (MM) (Πίνακας 3.1). Οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών (AMMO) έπειτα από συλλογή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK) περιφερικού αίματος στη Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών της Αιματολογικής Κλινικής του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

3.2 Συλλογή και κρυσυντήρηση AAK

3.2.1 Κινητοποίηση AAK περιφερικού αίματος

Για το σκοπό της συλλογής αυτόλογου μοσχεύματος AAK από το περιφερικό αίμα οι ασθενείς κινητοποιήθηκαν είτε με χημειοθεραπεία και αυξητικό παράγοντα G-CSF (N=57, 93,5%) είτε μόνο με G-CSF (N=4, 6,5%). Για τους 3 από τους 4 ασθενείς που κινητοποιήθηκαν μόνο με G-CSF, 1 με NHL και 2 με MM, κρίθηκε απαραίτητη η χορήγηση Plerixafor. Ομοίως, για 10 από τους 57 ασθενείς, που κινητοποιήθηκαν με χημειοθεραπεία και G-CSF και συγκεκριμένα για 8 με NHL και 2 με HL (Πίνακας 3.1). Συνολικά, για 13 ασθενείς (21,3%) απαιτήθηκε Plerixafor ενώ 48 ασθενείς (78,7%) κινητοποιήθηκαν επαρκώς χωρίς τη χρήση Plerixafor. Το κριτήριο χορήγησης του παράγοντα ήταν η συλλογή άνω των 3×10^6 /Kg ΒΣ σε μια συνεδρία για τα λεμφώματα και άνω των 6×10^6 /Kg ΒΣ για τα πολλαπλά μυελώματα.

Η ικανότητα επαρκούς κινητοποίησης σε σχέση με το χορηγημένο σχήμα και τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 3.2. Στο σύνολο

των 61 ασθενών, το 13,1% (8 ασθενείς) θα κινητοποιούταν ανεπαρκώς για τη συλλογή τουλάχιστον $2,5 \times 10^6 \text{CD34+}/\text{Kg}$ ΒΣ χωρίς τη χορήγηση του Plerixafor (κακοί κινητοποιητές), το 39,3% (24 ασθενείς) κινητοποιήθηκε επαρκώς με δυνατότητα συλλογής έως και $8 \times 10^6 \text{CD34+}/\text{Kg}$ ΒΣ (καλοί κινητοποιητές), ενώ το 47,5% (29 ασθενείς) κινητοποιήθηκε επαρκώς με δυνατότητα συλλογής πλέον των $8 \times 10^6 \text{CD34+}/\text{Kg}$ ΒΣ (πολύ καλοί κινητοποιητές). Μεταξύ των ασθενών που κινητοποιήθηκαν μόνο με G-CSF, μόνο 1 στους 4 κινητοποιήθηκε επαρκώς, σε αντίθεση με τους ασθενείς, που κινητοποιήθηκαν με χημειοθεραπεία και G-CSF, μεταξύ των οποίων μόλις το 11,5% (οι 7 στους 57) κινητοποιήθηκε ανεπαρκώς. Πτωχότεροι κινητοποιητές αναδείχθηκαν οι ασθενείς με NHL, καλοί κινητοποιητές οι ασθενείς με MM και πολλοί καλοί οι ασθενείς με HL. Οι περισσότεροι εκ των ασθενών ηλικίας μικρότερης των 53 ετών συγκαταλέχτηκαν στους πολύ καλούς κινητοποιητές ενώ οι περισσότεροι εκ των ασθενών μεγαλύτερων των 53 ετών συγκαταλέχτηκαν στους καλούς κινητοποιητές.

Οι τιμές του απόλυτου αριθμού των CD34+ κυττάρων, η αναλογία τους σε σχέση με τα CD45+ κύτταρα και το ποσοστό βιωσιμότητάς τους στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής αναλύονται στον πίνακα 3.2. Στους ασθενείς που έλαβαν Plerixafor, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3-6 ώρες μετά τη χορήγηση του. Στο σύνολο των ασθενών, η διάμεση τιμή των CD34+ κυττάρων ήταν 88,4/μl με μεγάλο εύρος τιμών (25-780/μl). Οι νεότεροι των 53 ετών είχαν διάμεση τιμή CD34+/μl αισθητά υψηλότερη σε σχέση με τους μεγαλύτερους των 53 ετών (127,5/μl έναντι των 81,3/μl). Οι ασθενείς με HL κινηποίησαν μεγαλύτερο αριθμό CD34+ κυττάρων, με διάμεση τιμή τα 176,9/μl και εύρος 40-780/μl, αντίστοιχα, σε σχέση με τους ασθενείς με MM (96,7/μl, 54-345/μl) και NHL (68,6/μl, 25-531/μl). Ομοίως μεγαλύτερο αριθμό CD34+ κινηποίησαν οι ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με G-CSF (97,6/μl, 25-780) σε αντίθεση με εκείνους που έλαβαν μόνο G-CSF (52,6/μl, 40-113/μl). Η διάμεση τιμή του ποσοστού των CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα του συνόλου των ασθενών ήταν 0,46% με εύρος 0,07-2,94%, ενώ οι ασθενείς με ηλικία μικρότερη των 53 ετών, οι ασθενείς με HL, και οι ασθενείς που έλαβαν και χημειοθεραπεία, κινηποίησαν μεγαλύτερο αριθμό CD34+ κυττάρων αναλογικά με την αύξηση των CD45+ κυττάρων σε σχέση με τις αντίστοιχες λοιπές ομάδες ασθενών. Υψηλότερο ποσοστό CD34+ κυττάρων σε

σχέση με το ποσοστό των CD45+ κυττάρων και υψηλότερη διάμεση τιμή CD34+/μL είχαν και οι ασθενείς, που δεν βρίσκονταν σε πλήρη ύφεση κατά την κινητοποίηση, σε σχέση με εκείνους σε πλήρη ύφεση. Η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα κυμάνθηκε μεταξύ του 88,6% και του 100% με διάμεση τιμή το 98,6%. Οι ασθενείς με NHL και οι ασθενείς που κινητοποιήθηκαν μόνο με αυξητικό παράγοντα, εμφάνισαν χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας (97,6% και 96,6%, αντίστοιχα). Εκείνοι που έλαβαν Plerixafor είχαν διάμεση τιμή βιωσιμότητας υψηλότερη κατά μία μονάδα σε σχέση με όσους δεν έλαβαν.

Πίνακας 3.1 Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών

Χαρακτηριστικά	Διάμεση τιμή (εύρος)			N (%)	
	Ηλικία	Νόσημα		Σύνολο	
	Έτη	NHL	HL		MM
Φύλο					
Άρρεν	53 (21-71)	16 (26.2%)	13 (21.3%)	13 (21,3%)	42 (68,9%)
Θήλυ	55 (17-68)	6 (9.8%)	6 (9.8%)	7 (11,5%)	19 (31,1%)
Ηλικία					
≤53 ετών	40 (17-53)	11 (18%)	16 (26.2%)	4 (6,6%)	31 (50,8%)
>53 ετών	61.5 (55-71)	11 (18%)	3 (4.9%)	16 (26,2%)	30 (49,2%)
Σχήμα κινητοποίησης					
GCS-F	42 (-)	0 (0%)	1 (1.6%)	0 (0%)	1 (1,6%)
GCS-F + Plerixafor	60 (55-60)	1 (1.6%)	0 (0%)	2 (3,3%)	3 (4,9%)
Chemo + GCS-F	53 (17-71)	13 (21.3%)	16 (26.2%)	18 (29,5%)	47 (77,1%)
Chemo + GCS-F+ Plerixafor	52.5 (62-63)	8 (13.1%)	2 (3.3%)	0 (0%)	10 (16,4%)
Κατάσταση νόσου στη συλλογή					
Πλήρης ύφεση (CR)	53 (21-66)	14 (23%)	9 (14.8%)	6 (9,8%)	29 (47,5%)
Πολύ καλή μερική ύφεση (VGPR)	57 (41-71)	0 (0%)	0 (0%)	11 (18%)	11 (18%)
Μερική ύφεση (PR)	55 (25-66)	6 (9.8%)	6 (9.8%)	3 (4,9%)	15 (24,6%)
Με νόσο (D)	40.5 (17-47)	2 (3.3%)	4 (6.6%)	0 (0%)	6 (9,8%)
Κατάσταση νόσου στην AMMO					
Πλήρης ύφεση (CR)	53 (21-66)	15 (24.6%)	10 (16.4%)	6 (9,8%)	31 (50,8%)
Πολύ καλή μερική ύφεση (VGPR)	57 (41-71)	0 (0%)	0 (0%)	11 (19%)	11 (18%)
Μερική ύφεση (PR)	51 (25-66)	6 (9.8%)	5 (8.2%)	3 (4,9%)	14 (23%)
Με νόσο (D)	37 (17-71)	1 (1.6%)	4 (6.6%)	0 (0%)	5 (8,2)
Σχήμα μεγαθεραπείας					
Triple Alkylator	55 (32-55)	3 (4.9%)	0 (0%)	-	3 (4,9%)
BEAM	44 (17-66)	18 (29.5%)	18 (29.5%)	-	36 (59%)
BEAC	47.5 (33-62)	1 (1.6%)	1 (1.6%)	-	2 (3,3)
Melphalan	58.5 (41-71)	-	-	20 (32,8%)	20 (32,8)
Σύνολο	53 (17-71)	22 (36.1%)	19 (31.1%)	20 (32.8%)	61 (100%)

Πίνακας 3.2 Χαρακτηριστικά ασθενών σε σχέση με την κινητοποίηση των ΑΑΚ στο περιφερικό αίμα

	Επίπεδα περιφερικού αίματος, Διάμεση τιμή (Εύρος)			Κινητοποιητές, N (%)		
	CD34+/μl	% CD34+	% βιωσιμότητα	Πτωχοί	Καλοί	Πολύ καλοί
Φύλο						
Άρρεν	99.8 (32-780)	0.45 (0.07-2.94)	98.6 (88.6-99.6)	6 (9.8%)	17 (27.9%)	19 (31.1%)
Θήλυ	83.4 (25-507)	0.52 (0.14-1.17)	99.1 (92.5-100)	2 (3.3%)	7 (11.5%)	10 (16.4%)
	<i>p=0,398</i>	<i>p=0,697</i>	<i>p=0,191</i>			
Ηλικία						
≤54 έτη	127.5 (32-780)	0.74 (0.07-2.94)	98.9 (95.3-99.8)	4 (6.6%)	8 (13.1%)	19 (31.1%)
>54 έτη	81.3 (25-531)	0.36 (0.09-1.17)	98.3 (88.6-100)	4 (6.6%)	16 (26.2%)	10 (16.4%)
	<i>p=0,137</i>	<i>p=0,007</i>	<i>p=0,160</i>			
Νόσημα						
NHL	68.6 (25-531)	0.33 (0.07-1.58)	97.6 (88.6-100)	7 (11.5%)	7 (11.5%)	8 (13.1%)
HL	176.9 (40-780)	1.07 (0.11-2.94)	98.9 (95.3-99.8)	1 (1.6%)	6 (9.8%)	12 (19.7%)
MM	96.7 (54-345)	0.45 (0.17-1.17)	98.6 (96.3-100)	0 (0%)	11 (18%)	9 (14.8%)
	<i>p=0,019¹</i>	<i>p=0,004²</i>	<i>p=0,070³</i>			
Κατάσταση νόσου						
CR	83.4 (25-659)	0.36 (0.07-2.94)	98.6 (88.6-99.6)	4 (6.6%)	13 (21.3%)	12 (19.7%)
≠ CR	104.4 (33-780)	0.47 (0.09-2.34)	98.9 (93.5-100)	4 (6.6%)	11 (18%)	17 (27.9%)
	<i>p=0,573</i>	<i>p=0,292</i>	<i>p=0,309</i>			
Σχήμα κινητοποίησης						
(-) Chemo	52.6 (40-113)	0.14 (0.11-0.28)	96.6 (88.6-99.3)	1 (1.6%)	3 (4.9%)	0 (0%)
(+) Chemo	97.6 (25-780)	0.48 (0.07-2.94)	98.7 (91.5-100)	7 (11.5%)	21 (34.4%)	29 (47.5%)
	<i>p=0,101</i>	<i>p=0,007</i>	<i>p=0,122</i>			
(+) Plerixafor	122.6 (25-780)	0.64 (0.11-2.94)	98.8 (91.5-100)	-	19 (31.1%)	29 (47.5%)
(-) Plerixafor	51.1 (32-113)	0.17 (0.07-0.46)	97.8 (88.6-100)	8 (13.1%)	5 (8.2%)	-
	<i>p=0,001</i>	<i>p=0,000</i>	<i>p=0,098</i>			
Σύνολο	88.4 (25-780)	0.46 (0.07-2.94)	98.6 (88.6-100)	8 (13.1%)	24 (39.3%)	29 (47.5%)

¹ NHL vs HL, *p=0,016*, ² NHL vs HL, *p=0,003*,

³ % βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού: NHL: 97,6% (88,6-100) έναντι MM+HL: 98,8% (95,3-100), *p=0,027*

3.2.2 Συλλογή AAK περιφερικού αίματος

Η επιλογή της καταλληλότερης ημέρας για συλλογή των AAK έγινε α) με βάση τις συγκεντρώσεις των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα β) με βάση την προβλεπόμενη ημέρα μέγιστης κινητοποίησης των AAK στο περιφερικό αίμα, και γ) σε συνάρτηση με τον αριθμητικό στόχο των CD34+ κυττάρων/Kg (τουλάχιστον 3×10^6 /kg ΒΣ για τα NHL και τα HL και 6×10^6 /kg ΒΣ για τα MM) (Πίνακας 3.3). Την προηγούμενη από την προγραμματισμένη για τη συλλογή των AAK ημέρα (D-1) όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν αρχικά σε γενική εξέταση αίματος. Οι ασθενείς με $WBC < 2000$ /μl συνέχισαν τη λήψη G-CSF και επανέλαβαν τη μέτρηση την επόμενη ημέρα, ενώ στους ασθενείς με $WBC \geq 2000$ /μl μετρήθηκε ο απόλυτος αριθμός των AAK με κυτταρομετρία ροής. Για 11 ασθενείς (18% των ασθενών) η συλλογή των AAK έλαβε χώρα μια μέρα νωρίτερα από την προγραμματισμένη (D-1), ενώ 36 ασθενείς (59% των ασθενών) υπεβλήθησαν σε συλλογή AAK την επόμενη ημέρα (D0). Οι υπόλοιποι ασθενείς συνέχισαν τη λήψη του G-CSF και, έπειτα από καθημερινή επανάληψη των μετρήσεων, πραγματοποίησαν τη συλλογή όταν τα WBC ήταν > 8000 /μl και τα CD34+ ήταν > 20 /μl, οι 12 (19,7%) την επόμενη από την προγραμματισμένη ημέρα (D+1) και οι 2 (3,6%) δύο ή τρεις ημέρες μετά (D++). Η χορήγηση του Plerixafor πραγματοποιήθηκε είτε 6-10 ώρες πριν τη συλλογή, «προγραμματισμένα», με βάση τις τιμές των CD34+/μl και WBC/μl της προηγούμενης ημέρας, είτε 3-4 πριν τη συλλογή, «κατ'επίκληση», με βάση τις τιμές των CD34+/μl και WBC/μl της ίδιας ημέρας. Από τους 13 ασθενείς που έλαβαν Plerixafor οι 7 (53,8%) ανήκαν στη πρώτη ομάδα (4 NHL, 1 HL και 2 MM), ενώ οι 6 (46,2%) στη δεύτερη (5 NHL και 1 HL). Ο μεγαλύτερος αριθμός συλλογών έλαβε χώρα την προγραμματισμένη ημέρα (για τα 15 εκ των 22 NHL, τα 9 εκ των 19 HL και τα 12 εκ των 20 MM). Μεγαλύτερος αριθμός ασθενών με HL και MM σε σχέση με τους ασθενείς με NHL κινητοποιήθηκαν και συλλέχθηκαν μια ημέρα νωρίτερα, ενώ κανένας ασθενής με LH δεν καθυστέρησε περισσότερο της μιας ημέρας, σε αντίθεση με 2 με NHL και 1 με MM. Συνολικά το 67,2% των ασθενών (N=41) συλλέχθηκε την ημέρα της μέγιστης κινητοποίησης των AAK στο περιφερικό αίμα, το 26,2% (N=16) ενώ ο αριθμός των AAK βρισκόταν σε άνοδο και το 6,6% (N=4) ενώ βρισκόταν σε πτώση.

Πίνακας 3.3 Χαρακτηριστικά ασθενών την ημέρα συλλογής ΑΑΚ

Χαρακτηριστικά	N (%)			
	Σύνολο ασθενών	NHL	HL	MM
Χορήγηση Plerixafor				
Ασθενείς που έλαβαν Plerixafor	13 (21,3%)	9 (69,2%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)
• 6-10 ώρες προ συλλογής	7 (53,8%)	4 (30,8%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)
• 3-4 ώρες προ συλλογής	6 (46,2%)	5 (38,5%)	1 (7,7%)	0 (0%)
Ημέρα συλλογής				
D0	36 (59%)	15 (24,6%)	9 (14,8%)	12 (19,7%)
D-1	11 (18%)	2 (3,3%)	6 (9,8%)	3 (4,9%)
D+1	12 (19,7%)	4 (6,6%)	3 (4,9%)	5 (8,2%)
D++	2 (3,6%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)	0 (0%)
Τάση αύξησης CD34+				
Μέγιστη τιμή (pic)	41 (67,2)	14 (23%)	11 (18%)	16 (26,2)
Ανοδική	16 (26,2%)	6 (9,8%)	8 (13,1%)	2 (3,3%)
Πτωτική	4 (6,6%)	2 (3,3%)	0 (0%)	2 (3,3%)
Διάμεση τιμή (εύρος)				
CD34+/μl προ Plerixafor	20,25 (7-35)	18,5 (7-35)	24,9 (21-29)	19,8 (19-21)
CD34+/μl	88,4 (25-780)	68,6 (25-531)	176,9 (40-780)	96,7 (54-345)
CD45+/μl	23767 (6146-75373)	24067 (6146-75373)	24861 (8693-49771)	27465 (14190-44623)
% CD34+ επί των CD45+	0,46 (0,07-2,94)	0,33 (0,07-1,58)	1,07 (0,11-2,94)	0,45 (0,17-1,17)
% CD34 βιωσιμότητα	98,6 (88,6-100)	97,6 (88,6-100)	98,9 (95,3-99,8)	98,6 (96,3-100)

3.2.3 Καταμέτρηση AAK στο προϊόν της συλλογής

Δείγματα από τα τελικά προϊόντα της συλλογής AAK εστάλησαν στο τμήμα κυτταρομετρίας ροής του εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών για τον καθορισμό του απόλυτου αριθμού των CD34+ κυττάρων. Η ανάλυση των δειγμάτων 38 ασθενών (60,3%) πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά τη συλλογή. Τα 8 από τα 38 προϊόντα (13,1%) καταψύχθηκαν σε <2 ώρες μετά τη συλλογή, ενώ τα υπόλοιπα 30 (49,2%) μέσα σε 20-24 ώρες από τη λήξη της συλλογής, έπειτα από συντήρηση στους 4-8°C. Τα προϊόντα συλλογής 23 ασθενών (37,7%) συντηρήθηκαν στους 4-8°C προκειμένου να υποβληθούν τόσο σε καταμέτρηση των CD34+ κυττάρων όσο και σε βαθμιαία κρουκατάψυξη την επόμενη της συλλογής ημέρα (20-24 ώρες από τη λήξη της συλλογής). Το μεγαλύτερο ποσοστό των προϊόντων συλλογής καταψύχθηκαν την επόμενη της συλλογής ημέρα (86,9%) (Πίνακας 3.4).

Όλοι οι ασθενείς συνέλεξαν επιτυχώς τον απαραίτητο για την αυτόλογη μεταμόσχευση αριθμό AAK σε μια συνεδρία (διάμεση τιμή: $8,9 \times 10^6/\text{Kg}$, εύρος: $3,5-33,0 \times 10^6/\text{Kg}$) (Πίνακας 3.4). Οι ασθενείς με NHL και HL συνέλεξαν $3,5-19,1 \times 10^6/\text{Kg}$ με διάμεση τιμή τα $7,6 \times 10^6/\text{Kg}$ και $4,4-33 \times 10^6/\text{Kg}$ με διάμεση τιμή τα $14,9 \times 10^6/\text{Kg}$, αντίστοιχα, ενώ οι ασθενείς με MM συνέλεξαν $5,7-23,5 \times 10^6/\text{Kg}$ με διάμεση τιμή τα $8,7 \times 10^6/\text{Kg}$. Διαφορές στην ποσοστιαία αναλογία των CD34+ κυττάρων σε σχέση με τα CD45+ κύτταρα παρατηρήθηκαν μεταξύ των προϊόντων ασθενών με HL και των ασθενών με NHL και MM (1,87% έναντι 0,68% και 1,00%, αντίστοιχα) όπως και μεταξύ των προϊόντων των πολύ καλών κινητοποιητών και των κακών και καλών κινητοποιητών (1,87% έναντι 0,41 και 0,73%, αντίστοιχα) σε αντιστοιχία με τις διαφορές, που υπήρχαν και στο περιφερικό αίμα. Το ποσοστό βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής κυμάνθηκε μεταξύ 87,9-99,7% με διάμεση τιμή 98,7%, χωρίς διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, που μετρήθηκαν την ίδια και την επόμενη ημέρα. Συγκριτικά χαμηλότερη βιωσιμότητα μετρήθηκε στα προϊόντα συλλογής AAK από τους ασθενείς με NHL (98,3%) σε σχέση με τα HL και τα MM (98,9%), στους ασθενείς που κινητοποιήθηκαν μόνο με αυξητικό παράγοντα (97,3%) σε σχέση με εκείνους που έλαβαν και χημειοθεραπεία (98,7%), στους πτωχούς κινητοποιητές (98%) σε σχέση με τους καλούς κινητοποιητές (98,8%). Στα

προϊόντα των ασθενών που έλαβαν Plerixafor η βιωσιμότητα των AAK ήταν υψηλότερη (98,8%) έναντι των υπολοίπων (98,1%).

Πίνακας 3.4		Χαρακτηριστικά προϊόντος συλλογής AAK			
		CD34+(x10 ⁶)/Kg	CD34+ (x10 ⁶)	%CD34+	% Βιωσιμότητα
Ηλικία	≤53 έτη	11,7 (3,5-33)	781,7 (269,8-4395,4)	1,51 (0,24-9,19)	98,7 (95,4-99,5)
	>53 έτη	7,8 (3,5-20,1)	614,9 (277,5-1758,4)	0,82 (0,21-3,29)	98,7 (87,7-99,7)
Φύλο	Άρρεν	9,4 (3,5-33)	787,7 (269,8-4395,4)	0,99 (0,21-9,19)	98,6 (88,4-99,7)
	Θήλυ	8,9 (4,4-29,3)	675,8 (277,5-1639,3)	1,02 (0,38-4,0)	98,7 (87,9-99,6)
Νόσημα	NHL	7,6 (3,5-19,1)	557,3 (269,8-1605,2)	0,68 (0,21-3,79)	98,3 (87,9-99,6)
	HL	12,5 (4,4-33)	818,7 (355,7-4395,4)	1,87 (0,24-9,19)	98,9 (96,7-99,5)
	MM	8,7 (5,7-23,5)	796,2 (360,2-2048,3)	1,00 (0,50-3,29)	98,9 (93,3-99,7)
Σχήμα κινητοποίησης					
	(-) Chemo	6,9 (4,6-14,6)	573,9 (408,5-1034,8)	0,71 (0,24-1,17)	97,3 (94,5-99,3)
	(+) Chemo	9,6 (3,5-33)	724,3 (269,8-4395,4)	1,02 (0,21-9,19)	98,7 (87,9-99,7)
	(+) Plerixafor	10,6 (4,4-33)	835,3 (277,5-4395,4)	1,41 (0,24-9,19)	98,8 (87,9-99,7)
	(-) Plerixafor	6,6 (6,5-14,6)	495,4 (269,8-1034,8)	0,42 (0,21-1,17)	98,1 (94,8-99,4)
Κινητοποίηση					
	Πτωχή	6,3 (3,5-9,9)	484,8 (269,8-818,8)	0,41 (0,21-0,80)	98,0 (94,8-99,4)
	Καλή	7,2 (3,5-14,6)	570,4 (277,5-1034,8)	0,73 (0,24-1,33)	98,8 (93,3-99,7)
	Πολύ καλή	13,9 (7,6-33)	992,0 (465,8-4395,4)	1,87 (0,80-9,19)	98,7 (87,9-99,5)
Κατάσταση νόσου στη συλλογή					
	CR	8,5 (3,5-23,5)	691,3 (269,8-2048,3)	0,97 (0,24-4,73)	98,7 (87,9-99,6)
	VGPR	8,9 (5,7-20,2)	724,3 (475,7-1758,4)	0,99 (0,50-3,29)	98,9 (97,7-98,0)
	PR	8,7 (3,5-33,0)	756,6 (298-4395,4)	0,84 (0,21-9,19)	98,4 (93,3-99,5)
	D	15,9 (6,3-18,9)	836,2 (487,9-2180,4)	1,94 (0,53-2,79)	98,1 (97,2-98,7)
	≠CR	9,7 (3,5-33,0)	769,2 (298-4395,4)	1,17 (0,21-9,19)	98,7 (87,9-99,7)
Διάμεση τιμή (εύρος)		8,9 (3,5-33,0)	720,5 (269,8-4395,4)	1,02 (0,21-9,19)	98,7 (87,9-99,7)
		Αριθμός ασθενών N (%)		% Βιωσιμότητα	
Ημέρα καταμέτρησης και κατάψυξης					
	Καταμέτρηση/κατάψυξη σε <2h	8 (13,1%)		98,6 (96,7-99,5)	
	Καταμέτρηση σε <2h/κατάψυξη σε 20-24h	30 (49,2%)		98,7 (87,9-99,7)	
	Καταμέτρηση/κατάψυξη σε 20-24h	23 (37,7%)		98,7 (93,3-99,6)	

3.2.4 Κρυοκατάψυξη προϊόντος συλλογής

Η βαθμιαία κρυοκατάψυξη των AAK μετά τη συλλογή έλαβε χώρα στο εργαστήριο κρυοκατάψυξης της Αιματολογικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών. Ανάλογα με τον απαιτούμενο αριθμό μεταμοσχεύσεων βάση νοσήματος και ηλικίας κάθε ασθενή και τον αριθμό των CD34+/Kg ΒΣ, που συνέλεξε ο κάθε ασθενής, τα προϊόντα μοιράστηκαν σε 1-6 ασκούς κρυοκατάψυξης και καταψύχθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο βαθμιαίας κρυοκατάψυξης του εργαστηρίου. Οι διάμεσες τιμές των συγκεντρώσεων των CD34+ και CD45+ κυττάρων, των πολυμορφοπύρηνων (PMN) και των αιμοπεταλίων (PLT) καθώς και του τελικού όγκου του περιεχομένου προϊόντος στον ασκό κρυοκατάψυξης φαίνονται στον πίνακα 3.5. Η συγκέντρωση και ο απόλυτος αριθμός των CD34+ κυττάρων στον ασκό κρυοκατάψυξης ήταν 302-11879/μl και $53,7 \times 10^6$ - 1426×10^6 , αντίστοιχα, με διάμεσες τιμές τα 1354/μl και 215,1x10⁶/μl αντίστοιχα. Η διάμεση τιμή των CD45+ κυττάρων ήταν $132,4 \times 10^3$ /μl (εύρος $96,1 \times 10^3$ - $170,2 \times 10^3$) με ποσοστό PMN 26,7% (εύρος 1,0-68,4%), και των PLT 268x10³/μl (εύρος 56×10^3 - 1016×10^3 /μl). Εκτός από τη συγκέντρωση των CD45+ κυττάρων, η οποία βάση του πρωτοκόλλου βαθμιαίας κρυοκατάψυξης ρυθμίζεται μεταξύ των ορίων 40×10^3 - 200×10^3 /μl με συνηθέστερη συγκέντρωση τα 140×10^3 /μl (τελική αραιώση μετά την προσθήκη του κρυοπροστατευτικού διαλύματος), η συγκέντρωση των CD34+ κυττάρων, των PLT και των PMN ήταν σε συνάρτηση με τον απόλυτο αριθμό τους στο περιφερικό αίμα πριν τη συλλογή, την επιλογή της στιβάδας MNC (Mononuclear cells) κατά τη συλλογή και την τελική αραιώση του μοσχεύματος κατά την κρυοκατάψυξη. Ο τελικός όγκος του μοσχεύματος με το κρυοπροστατευτικό διάλυμα σε κάθε ασκό κυμάνθηκε μεταξύ 120 και 190ml με διάμεση τιμή τα 160ml. Τα δορυφόρα φιαλίδια περιείχαν εναιώρημα κυττάρων συγκεντρώσεων ίδιων με τον ασκό στον οποίο αντιστοιχούσαν, ο δε όγκος του περιεχομένου τους ήταν περίπου 1,2ml.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της βαθμιαίας κρυοκατάψυξης οι ασκοί φυλάχθηκαν στις ειδικές δεξαμενές υγρού αζώτου του εργαστηρίου, υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας στους -140°C έως -196°C, στην αέρια ή την υγρή φάση (κρυοσυντήρηση). Το συνολικό χρονικό διάστημα φύλαξης μεταξύ συλλογής και αυτόλογης μεταμόσχευσης διέφερε για κάθε ασθενή. Ο διάμεσος χρόνος

κρυοσυντήρησης ήταν 106 ημέρες (περίπου 3,5 μήνες από τη λήξη της συλλογής) σε εύρος χρόνου 16 έως 247 ημέρες, δηλαδή 0,5 με 8,2 μήνες (Πίνακας 3.6).

Την ημέρα της επανέγχυσης των ΑΑΚ σε κάθε ασθενή, τα δορυφόρα δειγματοληπτικά φιαλίδια των ασκών, που θα αποψύχονταν προς έγχυση, διαχωρίστηκαν από τους ασκούς και φυλάχθηκαν στην αέρια φάση των ειδικών δεξαμενών μέχρι τη χρησιμοποίησή τους για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των ΑΑΚ στα πλαίσια του περιοδικού ποιοτικού ελέγχου του εργαστηρίου.

Πίνακας 3.5 Χαρακτηριστικά κρυοκατεψυγμένου προϊόντος		
	Διάμεση τιμή	Εύρος
Συγκέντρωση CD34+/μl	1354	302-11879
Απόλυτος αριθμός CD34+ κυττάρων (x10 ⁶)	215,1	53,7-1426
Συγκέντρωση CD45+/μl (x10 ³)	132,4	96,1-170,2
Συγκέντρωση PLT/μl (x10 ³)	265	56-1016
% PMN	26,7	1,0-68,4
Συγκέντρωση PMN/μl (x10 ³)	35,5	1,2-94,9
Όγκος περιεχομένου ασκού (ml)	160	120-190
Όγκος περιεχομένου φιαλιδίου (ml)	1,2	1-1,8

3.3 Αυτόλογη μεταμόσχευση ΑΑΚ

3.3.1 Γενικά

Πίνακας 3.6 Χαρακτηριστικά ΑΑΚ στην ΑΜΜΟ				
N (%)				
	NHL	LH	MM	Σύνολο
Αριθμός ασθενών που έλαβαν:				
• $3 \times 10^6 / \text{Kg}$	0	0	2 (3,3%)	2 (3,3%)
• 3×10^6 - $6 \times 10^6 / \text{Kg}$	9 (14,8%)	4 (6,6%)	10 (6,4%)	23 (37,7%)
• $>6 \times 10^6 / \text{Kg}$	13 (21,3%)	15 (24,6%)	8 (13,1%)	36 (59%)
Διάμεση τιμή (εύρος)				
	NHL	LH	MM	Σύνολο
Συνολικός αριθμός CD34+ ($\times 10^6 / \text{Kg}$)	6,5 (3,1-9,8)	7,9 (4,3-12,5)	4,9 (2,7-10,6)	6,6 (2,7-12,5)
Συνολικός αριθμός CD34 ($\times 10^6$)	462,4 (269-1010)	631,2 (343-1426)	441,7 (155-921)	478,6 (155-1426)
Ασκοί που αποψύχθηκαν, N	3 (1-6)	2 (1-6)	2 (1-4)	2 (1-6)
CD34+ ($\times 10^6$) / Kg ανά ασκό	2,1 (0,6-8,4)	4,4 (0,8-12,5)	2,3 (1,3-5,3)	2,5 (0,6-12,5)
Όγκος προϊόντος που εγχύθηκε (ml)	510 (120-1080)	190 (120-1020)	320 (180-680)	320 (120-1080)
Διάστημα κρυοσυντήρησης (ημέρες)	109 (35-245)	107 (16-247)	80 (45-216)	106 (16-247)

Οι αυτόλογες μεταμοσχεύσεις των 61 υπό μελέτη ασθενών έλαβαν χώρα το διάστημα 14/7/2017 έως 30/10/2019. Οι ασθενείς με MM υποβλήθηκαν σε ΑΜΜΟ στις 80 ημέρες από τη συλλογή των ΑΑΚ (45-216 ημέρες), οι ασθενείς με LH στις 107 ημέρες (16-247) και οι ασθενείς με NHL στις 109 ημέρες (35-245) (Πίνακας 3.6).

Από τους 61 ασθενείς οι 31 (50,8%) προσήλθαν για αυτόλογη μεταμόσχευση σε κατάσταση πλήρους ύφεσης (CR), οι 11 (18%) σε κατάσταση πολύ καλής μερικής ύφεσης (VGPR) και οι 14 (23%) σε κατάσταση μερικής ύφεσης (PR). Πέντε ασθενείς (8,2%), 1 NHL και 4 HL, είχαν είτε σταθερή νόσο είτε πρόοδο νόσου (SD ή PD). Οι 20 ασθενείς με MM έλαβαν Melphalan σε υψηλές δόσεις. Από τους 41 ασθενείς με λεμφώματα, BEAC έλαβαν οι 2 ασθενείς (1 με NHL και 1 με HL), BEAM έλαβαν οι 36 ασθενείς (18 με NHL και 18 με HL) ενώ 3 NHL έλαβαν Triple Alkylator (Πίνακας 3.1).

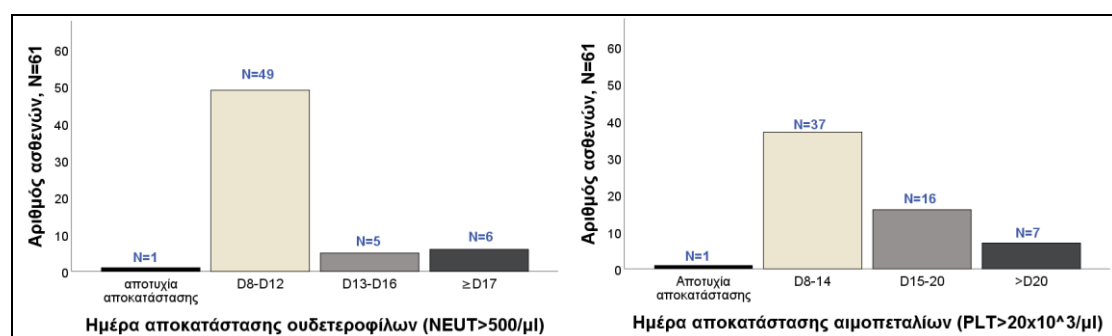
Η διάμεση τιμή των CD34+/Kg, που επανεγχύθηκαν στους ασθενείς, ήταν τα $6,6 \times 10^6 / \text{Kg}$, με ελάχιστη δόση τα $2,7 \times 10^6 / \text{Kg}$ και μέγιστη τα $12,5 \times 10^6 / \text{Kg}$. Από τα λεμφώματα κανένας ασθενής δεν έλαβε λιγότερα από $3 \times 10^6 / \text{Kg}$ σε αντίθεση με 2 MM που έλαβαν $2,7 \times 10^6$ - $2,9 \times 10^6 / \text{Kg}$ (3,3% του συνόλου των ασθενών). Δόση 3×10^6 -

6x10⁶/Kg έλαβε το 37,7% των ασθενών (9 NHL, 4 LH, 10 MM) ενώ δόση >6x10⁶/Kg (6,1x10⁶-12,5x10⁶/Kg) έλαβε το 59% των ασθενών (13 NHL, 15 LH, 8 MM). Η επανέγχυση των AAK πραγματοποιήθηκε σε μια ημέρα, με τη διαδοχική απόψυξη 1-6 ασκών (διάμεση τιμή: 2 ασκοί), συνολικού όγκου 120-1080ml (διάμεση τιμή: 320 ml) και περιεκτικότητας CD34+/Kg ανά ασκό 0,6x10⁶-8,4x10⁶ (διάμεση τιμή: 2,1x10⁶) (Πίνακας 3.6).

3.3.2 Αποκατάσταση Αιμοποίησης - Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων

Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων (NEUT) μετά την ημέρα επανέγχυσης των AAK (ημέρα 0, D0), δηλαδή η πρώτη ημέρα όπου ο αριθμός τους στο περιφερικό αίμα ήταν άνω των 500/μl, στο σύνολο των ασθενών, ήταν η ημέρα 10 (D10, εύρος 8-27 ημέρες) (πίνακας 3.7). Οι 49 από τους 61 ασθενείς (80,3%) εξήλθαν από την ουδετεροπενία σε 8-12 ημέρες, οι 5 (8,2%) σε 13-16 ημέρες, οι 6 (9,8%) σε 17-27 ημέρες ενώ ένας (1,6%) δεν εξήλθε ποτέ (εικόνα 3.1α)

Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων, δηλαδή η πρώτη ημέρα από τρεις συνεχόμενες όπου ο αριθμός τους στο περιφερικό αίμα ήταν άνω των 20x10³/μl, στο σύνολο των ασθενών, ήταν η ημέρα 14 (D14, εύρος 8-50 ημέρες) (πίνακας 3.7). Οι 37 από τους 61 ασθενείς (60,6%) εξήλθαν από την θρομβοπενία σε 8-14 ημέρες, οι 16 (26,2%) σε 16-20 ημέρες, οι 6 (9,8%) σε 21-29 ημέρες, 1 (1,6%) την ημέρα 50 και 1 (1,6%) δεν εξήλθε ποτέ (εικόνα 3.1β).

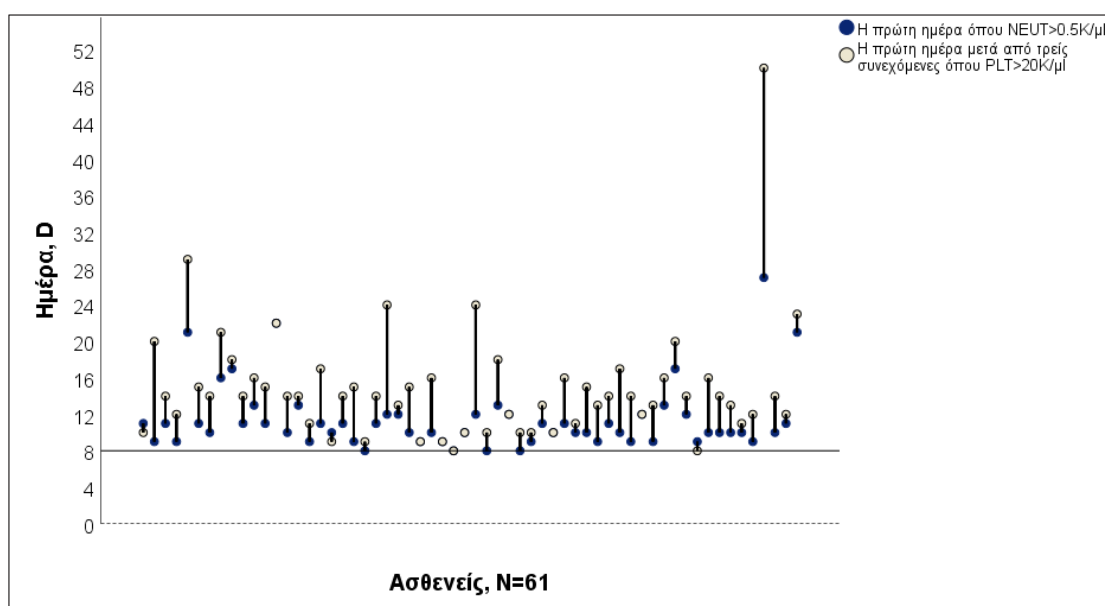


Εικόνα 3.1 Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων στην AMMO

Έντεκα ασθενείς (18%) είχαν ήδη αποκαταστήσει τον αριθμό τόσο των ουδετερόφιλων όσο και των αιμοπεταλίων τους την D10, ενώ 37 ασθενείς (60,7%)

έως την D14. Βέλτιστη αποκατάσταση βραχυπρόθεσμης αιμοποίησης, δηλαδή ταυτόχρονη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων άνω των 500/μl μέχρι την D10 και του αριθμού των αιμοπεταλίων άνω των $20 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι την D14, πέτυχαν 24 ασθενείς (39,3% των ασθενών) (πίνακας 3.8).

Υπήρξε μια στατιστικά σημαντική μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ της αποκατάστασης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων ($r_{(s)}=0,661$, $p<0,0005$). Η αποκατάσταση των αιμοπεταλίων ακολούθησε την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, στην πλειοψηφία των ασθενών, με μέση διαφορά 3 ημερών ± 4 ημέρες (εύρος διαφοράς 1-12 ημέρες· σε μία περίπτωση η διαφορά ήταν 23 ημέρες). Σε τρεις ασθενείς η αποκατάσταση των αιμοπεταλίων προηγήθηκε της αποκατάστασης των ουδετερόφιλων κατά μία ημέρα, ενώ σε 8 ασθενείς οι ημέρες αποκατάστασης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων συνέπεσαν (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Συσχέτιση ημέρας αποκατάστασης ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων ανά ασθενή στην AMMO

Πίνακας 3.7 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση αιμοποίησης μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση (N=61)

Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων	Σύνολο ασθενών	NEUT \geq 500/ μ l			
		έως D10*	έως D12*	έως D16*	έως D30*
Ημέρα (D)*, διάμεση τιμή (εύρος)	10 (8-27)				
Αριθμός ασθενών, N (%)	60 (98,4%)	31 (50,8%)	49 (80,3%)	54 (88,5%)	60 (98,4)
Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση αιμοπεταλίων	Σύνολο ασθενών	PLT \geq 20x10 ³ / μ l			
		έως D10*	έως D14**	έως D20**	έως D30**
Ημέρα (D)**, διάμεση τιμή (εύρος)	14 (8-50)				
Αριθμός ασθενών, N (%)	60 (98,4%)	12 (19,7%)	37 (60,7%)	53 (86,9%)	59 (96,7%)
Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων	Αριθμός ασθενών, N (%)	NEUT \geq 1500/ μ l		NEUT \geq 2000/ μ l	
		έως D30	έως D60	έως D90	έως D180
		53 (86,9%)	58 (95,1%)	59 (96,7%)	59 (96,7%)
Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων	Αριθμός ασθενών, N (%)	PLT \geq 50x10 ³ / μ l	PLT \geq 100x10 ³ / μ l	PLT \geq 140x10 ³ / μ l	
		έως D30	έως D60	έως D90	έως D180
		55 (90,2%)	53 (86,9%)	48 (78,7%)	48 (78,7%)

*η πρώτη μέρα όπου NEUT>500/ μ l, **η πρώτη μέρα μετά από τρείς συνεχόμενες όπου PLT>20/ μ l

Πίνακας 3.8 Συγκεντρικό χρονοδιάγραμμα αποκατάστασης ουδετεροπενίας και θρομβοπενίας μετά την AMMO (N=61)

		Αριθμός ασθενών, N (%) με PLT>20x10 ³ /μl έως							Σύνολο
		D8	D10	D12	D14	D16	D20	D30	
Αριθμός ασθενών, N (%) με NEUT>500/μl έως	D8	1 (1,6%)	4 (6,6%)						4 (6,6%)
	D10	2 (3,3%)	11 (18%)	16 (26,2%)	24 (39,3%)	29 (47,5%)	31 (50,8%)		31 (50,8%)
	D12		12 (19,7%)	20 (32,8%)	36 (59%)	44 (72,1%)	47 (77%)	49 (80,3%)	49 (80,3%)
	D14				37 (60,7%)	47 (77%)	51 (83,6%)	53 (86,9)	53 (86,9%)
	D16					47 (77%)	51 (83,6%)	54 (88,5%)	54 (88,5%)
	D20						53 (86,9%)	56 (91,8%)	56 (91,8%)
	D30							59 (96,7%)	60 (98,4%)
	Σύνολο	2 (3,3%)	12 (19,7%)	20 (32,8%)	37 (60,7%)	47 (77%)	53 (86,9%)	59 (96,7%)	

3.3.3 Αποκατάσταση Αιμοποίησης - Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση

ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων

Το 86,9% των ασθενών (N=53) είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl μέχρι την ημέρα 30 (D30) μετά την έγχυση των AAK (πίνακας 3.7, εικόνα 3.3α). Οι ασθενείς αυτοί, είχαν ουδετερόφιλα >500/μl την D10 (διάμεση τιμή, εύρος 8-14 ημέρες, 5 ασθενείς χρειάστηκαν 16-22 ημέρες). Αντίθετα, οι ασθενείς με αιματολογική αποκατάσταση που όμως δεν είχαν αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl έως την D30 (N=7, 11,5%), είχαν >500/μl την D12 (D9-D27), μια διαφορά μη στατιστικά σημαντική (p=0,113) (εικόνα 3.3β).

Το 95,1% των ασθενών (N=58) είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl μέχρι την ημέρα 60 (D60) (πίνακας 3.7, εικόνα 3.3α). Οι ασθενείς αυτοί, είχαν ουδετερόφιλα >500/μl την D10 (διάμεση τιμή, εύρος 8-22 ημέρες). Αντίθετα, οι ασθενείς με αιματολογική αποκατάσταση που όμως δεν είχαν αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl έως την D60 (N=2, 3,3%), είχαν >500/μl την D18 (D10-D27), μια διαφορά μη στατιστικά σημαντική (p=0,386) (εικόνα 3.3γ). Οι 5 ασθενείς που χρειάστηκαν 30-60 ημέρες για αύξηση των ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl, είχαν >500/μl την D12 (διάμεση τιμή, εύρος D9-D21).

Το 96,7% των ασθενών (N=59) είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl μέχρι την ημέρα 90 (D90) (πίνακας 3.7). Μεταξύ αυτών, ο ένας ασθενής που χρειάστηκε 60-90 ημέρες για αύξηση των ουδετερόφιλων >1500/μl, είχε >500/μl την D10, ενώ ο ένας ασθενής που δεν είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl έως την D90, >500/μl την D27.

Το 96,7% των ασθενών (N=59) είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 2000/μl μέχρι την ημέρα 180 (D180) (πίνακας 3.7). Ένας ασθενής χρειάστηκε 90-180 ημέρες για απόκτηση αριθμού ουδετερόφιλων >2000/μl. Η βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων αυτού του ασθενή μετά την AMMO έγινε τη D27. Ένας ασθενής με >500/μl ουδετερόφιλα την D12 και άνω των 1500/μl έως την D60, δεν απέκτησε ουδετερόφιλα >2000/μl έως την D180. Σε έναν ασθενή (N=1, 1,6%) δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων.

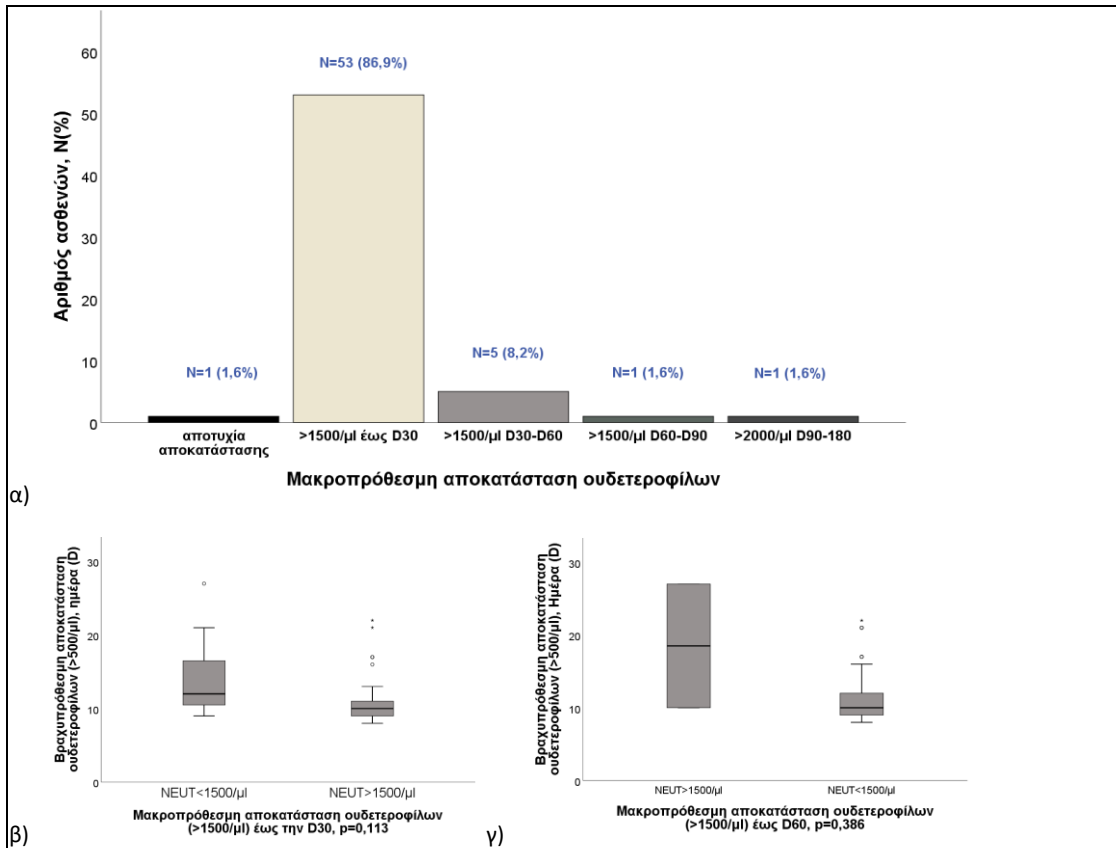
Το 90,2% των ασθενών (N=55) είχε αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 50×10^3 /μl μέχρι την ημέρα 30 (D30) (πίνακας 3.7). Οι ασθενείς αυτοί, είχαν αιμοπετάλια >20/μl την D14 (διάμεση τιμή, εύρος 8-16 ημέρες, 3 ασθενείς χρειάστηκαν 22-24 ημέρες).

Αντίθετα, οι ασθενείς που δεν είχαν αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 50/μl έως την D30 (N=5, 8,2%), είχαν >20/μl την D24 (διάμεση τιμή, εύρος D17-D50), μια διαφορά στατιστικά σημαντική ($p<0,0005$) (εικόνα 3.4α).

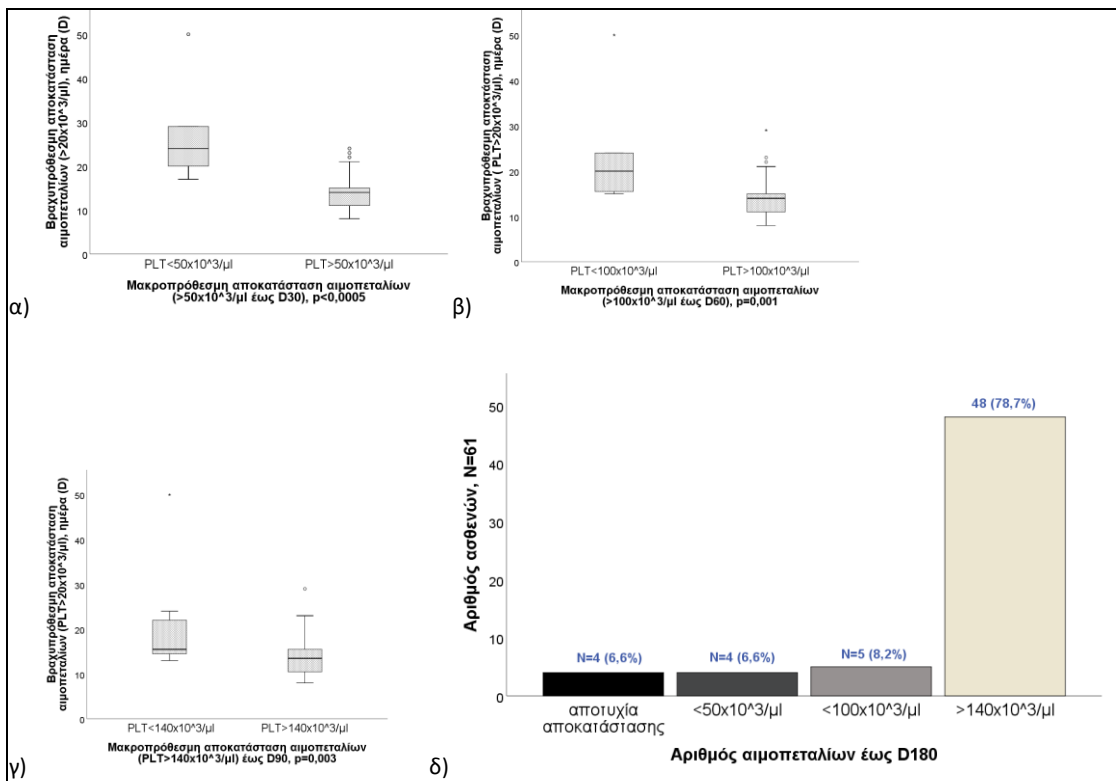
Το 86,9% των ασθενών (N=53) είχε αριθμό αιμοπεταλίων άνω των $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι την ημέρα 60 (D60) (πίνακας 3.7). Οι ασθενείς αυτοί, είχαν αιμοπετάλια >20/μl την D14 (διάμεση τιμή, εύρος 8-22 ημέρες, 2 ασθενείς χρειάστηκαν 23-29 ημέρες). Αντίθετα, οι ασθενείς που δεν είχαν αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 100/μl έως την D60 (N=7, 8,2%), είχαν >20/μl την D20 (διάμεση τιμή, εύρος D15-D24, ένας ασθενής χρειάστηκε 50 ημέρες), μια διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0,001$) (εικόνα 3.4β).

Το 78,7% των ασθενών (N=48) είχε αριθμό αιμοπεταλίων άνω των $140 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι την ημέρα 90 (D90) και μέχρι την ημέρα 180 (D180) (πίνακας 3.7, εικόνα 3.4δ). Οι ασθενείς αυτοί, είχαν αιμοπετάλια >20/μl την D14 (διάμεση τιμή, 8-29 ημέρες). Αντίθετα, οι ασθενείς που δεν είχαν αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 140/μl έως την D90 ή την D180 (N=12, 19,7%), είχαν >20/μl την D16 (διάμεση τιμή, εύρος D13-D24), μια διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0,003$) (εικόνα 3.4γ).

Έως την D180 5 ασθενείς (8,2%) δεν είχαν περισσότερα από $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια, 4 ασθενείς (6,6%) δεν είχαν περισσότερα από $50 \times 10^3/\mu\text{l}$, ενώ σε 4 ασθενείς (6,6%) δεν αποκαταστάθηκε ο αριθμός των αιμοπεταλίων άνω των $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ (εικόνα 3.4δ).



Εικόνα 3.3 Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων στην AMMO



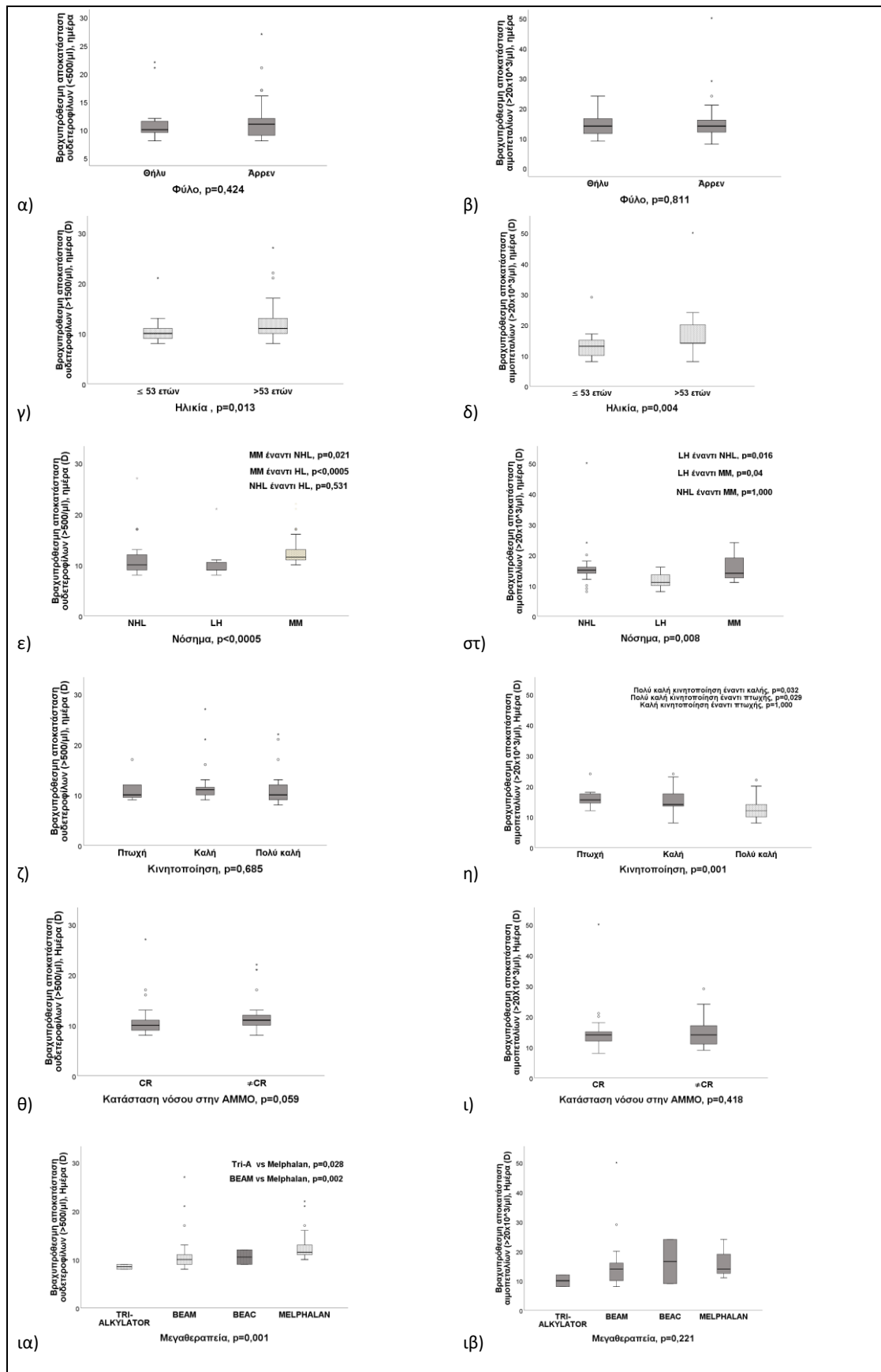
Εικόνα 3.4 Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση αιμοπεταλίων

3.3.4 Αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών στην ΑΜΜΟ

- Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων είτε στη βραχυπρόθεσμη είτε στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση (Πίνακας 3.9, εικόνα 3.5α,β).
- Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μέτρια θετική συσχέτιση της ηλικίας με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων ($r=0,442$, $p<0,0005$) και των αιμοπεταλίων ($r=0,473$, $p<0,0005$). Οι ασθενείς ηλικίας ≤ 53 ετών αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων μια ημέρα νωρίτερα από τους ασθενείς ηλικίας >53 ετών, μια διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0,013$ και $p=0,004$, αντίστοιχα). Δεν υπάρχει συσχέτιση της ηλικίας με την μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων. Αντίθετα, όσο αφορά τα αιμοπετάλια υπάρχει μια στατιστικά σημαντική μικρή, αρνητική συσχέτιση με την αποκατάστασή τους έως τη D90 ή/και την D180. Μόλις το 66,7% των ασθενών άνω των 53 ετών είχε αριθμό $PLT>140 \times 10^3/\mu l$ έως την D90 και D180, έναντι των νεότερων, μεταξύ των οποίων το 90,3% είχε αποκαταστήσει τον αριθμό των PLT, μια διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0,015$) (Πίνακας 3.9, εικόνα 3.5γ,δ).
- Η ημέρα αποκατάστασης τόσο των ουδετερόφιλων όσο και των αιμοπεταλίων διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών με διαφορετικά νοσήματα ($p<0,0005$ και $p=0,008$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με LH είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $>500/\mu l$ τη D9 (εύρος: 8-21 ημέρες), δυο ημέρες νωρίτερα από τους ασθενείς με MM (D11, 10-22 ημέρες), μια διαφορά στατιστικά σημαντική ($p<0,0005$). Οι ασθενείς με NHL είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu l$ τη D10 (εύρος: 8-27 ημέρες), μια ημέρα νωρίτερα από τους ασθενείς με MM, διαφορά επίσης στατιστικά σημαντική ($p=0,021$). Η μεταξύ των ασθενών με LH και NHL διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,531$). Οι ασθενείς με LH είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu l$ τη D11 (εύρος: 8-29 ημέρες), τρεις ημέρες νωρίτερα από τους ασθενείς με MM (D14, 11-24 ημέρες) και 4 ημέρες νωρίτερα από τους ασθενείς με NHL (D15, εύρος: 8-27 ημέρες), διαφορές στατιστικά σημαντικές

($p < 0,0005$ και $p = 0,0008$, αντίστοιχα). Η μεταξύ των ασθενών με MM και NHL διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 1,000$) (Πίνακας 3.9, εικόνα 3.5ε,στ). Δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στη μακροπρόθεσμη αιμοποιητική αποκατάσταση σε σχέση με το νόσημα.

- Μεταξύ των πτωχών, των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων. Όσο αφορά στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων αντίθετα, οι πολύ καλοί κινητοποιητές είχαν $PLT > 20 \times 10^3/\mu l$ δύο ημέρες νωρίτερα από τους καλούς κινητοποιητές (D12 έναντι D14, $p = 0,032$) και τρεις ημέρες νωρίτερα από τους πτωχούς κινητοποιητές (D12 έναντι D15, $p = 0,029$). Η μεταξύ των πτωχών και των καλών κινητοποιητών διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 1,000$). Οι πολύ καλοί κινητοποιητές είχαν στο σύνολό τους $> 100 \times 10^3/\mu l$ αιμοπετάλια μέχρι την D60, σε αντίθεση με τους καλούς και τους πτωχούς κινητοποιητές, μεταξύ των οποίων είχαν αιμοπετάλια $> 100 \times 10^3/\mu l$ το 79,2% και το 62,5%, αντίστοιχα ($p = 0,007$). Με επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0,005$), το 96,6% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε αιμοπετάλια $> 140 \times 10^3/\mu l$ μέχρι τις D90 και D180 σε αντίθεση με το μόλις 62,5% των καλών και πτωχών κινητοποιητών (Πίνακας 3.9, εικόνα 3.5ζ,η).
- Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν ή δε βρίσκονταν σε ύφεση πριν την AMMO, ούτε στη βραχυπρόθεσμη ούτε στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση (Πίνακας 3.9, εικόνα 3.5θ,ι).
- Με στατιστικά σημαντική διαφορά οι ασθενείς που έλαβαν ως χημειοθεραπεία Tri-Alkylator και BEAM αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους τρεις και μια ημέρα νωρίτερα, αντίστοιχα, από τους ασθενείς που έλαβαν Melphalan ($p = 0,028$ και $p = 0,002$, αντίστοιχα). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους στην ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων ($p = 0,221$). Με στατιστικά σημαντική διαφορά μικρότερο ποσοστό μεταξύ των ασθενών που έλαβαν Tri-Alkylator είχαν $\geq 1500/\mu l$ έως την D90 και $\geq 2000/\mu l$ σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς ($p = 0,025$ και $p = 0,018$, αντίστοιχα) (Πίνακας 3.9, εικόνα 3.5ια.ιβ).



Εικόνα 3.5 Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων στην AMMO σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών

Πίνακας 3.9 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών												
		Ημέρες (εύρος) έως		Έως D30 N (%) με		Έως D60 N (%) με		Έως D90 N (%) με		Έως D180 N (%) με		
		NEUT \geq 500/ μ l	PLT \geq 20x10 ³ / μ l	NEUT \geq 1500/ μ l	PLT \geq 50K/ μ l	NEUT \geq 1500/ μ l	PLT \geq 100K/ μ l	NEUT \geq 1500/ μ l	PLT \geq 140K/ μ l	NEUT \geq 2000/ μ l	PLT \geq 140K/ μ l	
Φύλο	Άρρεν	11 (8-27)	14 (8-50)	36 (85,7%)	39 (92,9%)	39 (92,9%)	36 (85,7%)	40 (95,2%)	33 (78,6%)	41 (97,6%)	33 (78,6%)	
	Θήλυ	10 (8-22)	14 (9-24)	17 (89,5%)	16 (84,2%)	19 (100%)	17 (89,5%)	19 (100%)	15 (78,9%)	18 (94,7%)	15 (78,9%)	
		<i>p=0,424</i>	<i>p=0,811</i>	<i>p=0,519</i>	<i>p=0,270</i>	<i>p=0,319</i>	<i>p=0,519</i>	<i>p=0,470</i>	<i>p=0,628</i>	<i>p=0,530</i>	<i>p=0,628</i>	
Ηλικία, r		0,442, <i>p</i> <0,0005	0,473, <i>p</i> <0,0005	-0,068, <i>p</i> =0,605	-0,202, <i>p</i> =0,119	-0,090, <i>p</i> =0,488	-0,199, <i>p</i> =0,125	-0,133, <i>p</i> =0,305	-0,262, <i>p</i> =0,042	-,152, <i>p</i> =0,243	-0,262, <i>p</i> =0,042	
	≤53 ετών	10 (8-21)	13 (8-29)	27 (87,1%)	30 (96,8%)	30 (96,8%)	29 (93,5%)	31 (100%)	28 (90,3%)	31 (100%)	28 (90,3%)	
	>53 ετών	11 (8-27)	14 (8-50)	26 (86,7%)	25 (83,3%)	28 (93,3%)	24 (80,0%)	28 (93,3%)	20 (66,7%)	28 (93,3%)	20 (66,7%)	
		<i>p=0,013</i>	<i>p=0,004</i>	<i>p=0,628</i>	<i>p=0,090</i>	<i>p=0,487</i>	<i>p=0,117</i>	<i>p=0,238</i>	<i>p=0,025</i>	<i>p=0,238</i>	<i>p=0,025</i>	
Νόσημα	NHL	10 (8-27)	15 (8-50)	17 (77,3%)	18 (81,8%)	19 (86,4%)	16 (72,7%)	20 (90,9%)	14 (63,6%)	21 (95,5%)	14 (63,6%)	
	HL	9 (8-21)	11 (8-29)	18 (98,4%)	18 (94,7)	19 (100%)	18 (94,7%)	19 (100%)	17 (89,5%)	19 (100%)	17 (89,5)	
	MM	11 (10-22)	14 (11-24)	18 (90%)	19 (95%)	20 (100%)	19 (95%)	20 (100%)	17 (85%)	20 (100%)	17 (85%)	
		<i>p</i> <0,0005	<i>p</i> =0,008	<i>p</i> =0,225	<i>p</i> =0,259	<i>p</i> =0,061	<i>p</i> =0,048	<i>p</i> =0,160	<i>p</i> =0,092	<i>p</i> =0,624	<i>p</i> =0,092	
Κινητοποίηση	Πτωχή	10 (9-17)	15 (12-24)	6 (75%)	7 (87,5%)	7 (87,5)	5 (62,5%)	8 (100%)	5 (62,5%)	8 (100%)	5 (62,5%)	
	Καλή	11 (9-27)	14 (8-50)	19 (79,2%)	20 (83,3%)	22 (91,7%)	19 (79,2%)	22 (91,7%)	15 (62,5%)	22 (91,7%)	15 (62,5%)	
	Πολύ καλή	10 (8-22)	12 (8-29)	28 (96,6%)	28 (96,6%)	29 (100%)	29 (100%)	29 (100%)	28 (96,6%)	29 (100%)	28 (96,6%)	
		<i>p</i> =0,685	<i>p</i> =0,001	<i>p</i> =0,099	<i>p</i> =0,264	<i>p</i> =0,214	<i>p</i> =0,007	<i>p</i> =0,203	<i>p</i> =0,005	<i>p</i> =0,203	<i>p</i> =0,005	
Κατάσταση όσου στην ΑΜΜΟ	CR	10 (8-27)	14 (8-50)	27 (87,1%)	28 (90,3%)	28 (90,3%)	27 (87,1%)	29 (93,5%)	23 (74,2%)	30 (96,8%)	23 (74,2%)	
	≠CR	11 (8-22)	14 (9-29)	26 (86,7%)	27 (90,0%)	30 (100%)	26 (86,7%)	30 (100%)	25 (83,3%)	29 (96,7%)	25 (83,3%)	
			<i>p</i> =0,059	<i>p</i> =0,418	<i>p</i> =0,628	<i>p</i> =0,648	<i>p</i> =0,125	<i>p</i> =0,628	<i>p</i> =0,254	<i>p</i> =0,534	<i>p</i> =0,746	<i>p</i> =0,534
Μεγαθεραπεία	Tri-alkylator (Tri-A)	8 (8-9)	10 (8-12)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	
	BEAM	10 (8-27)	14 (8-50)	31 (86,1%)	32 (88,9%)	34 (94,4%)	31 (86,1%)	35 (97,2%)	28 (77,8%)	36 (100%)	28 (77,8%)	
	BEAC	10 (9-12)	14 (9-24)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)	
	Melphalan	11 (10-22)	14 (11-24)	18 (90%)	19 (95%)	18 (90%)	19 (95%)	20 (100%)	17 (85%)	19 (95%)	17 (85%)	
			<i>p</i> =0,001	<i>p</i> =0,221	<i>p</i> =0,667	<i>p</i> =0,444	<i>p</i> =0,096	<i>p</i> =0,200	<i>p</i> =0,025	<i>p</i> =0,630	<i>p</i> =0,018	<i>p</i> =0,630
	Tri-A vs Melphalan		<i>p</i> =0,028									
BEAM vs Melphalan		<i>p</i> =0,002										

N= αριθμός ασθενών

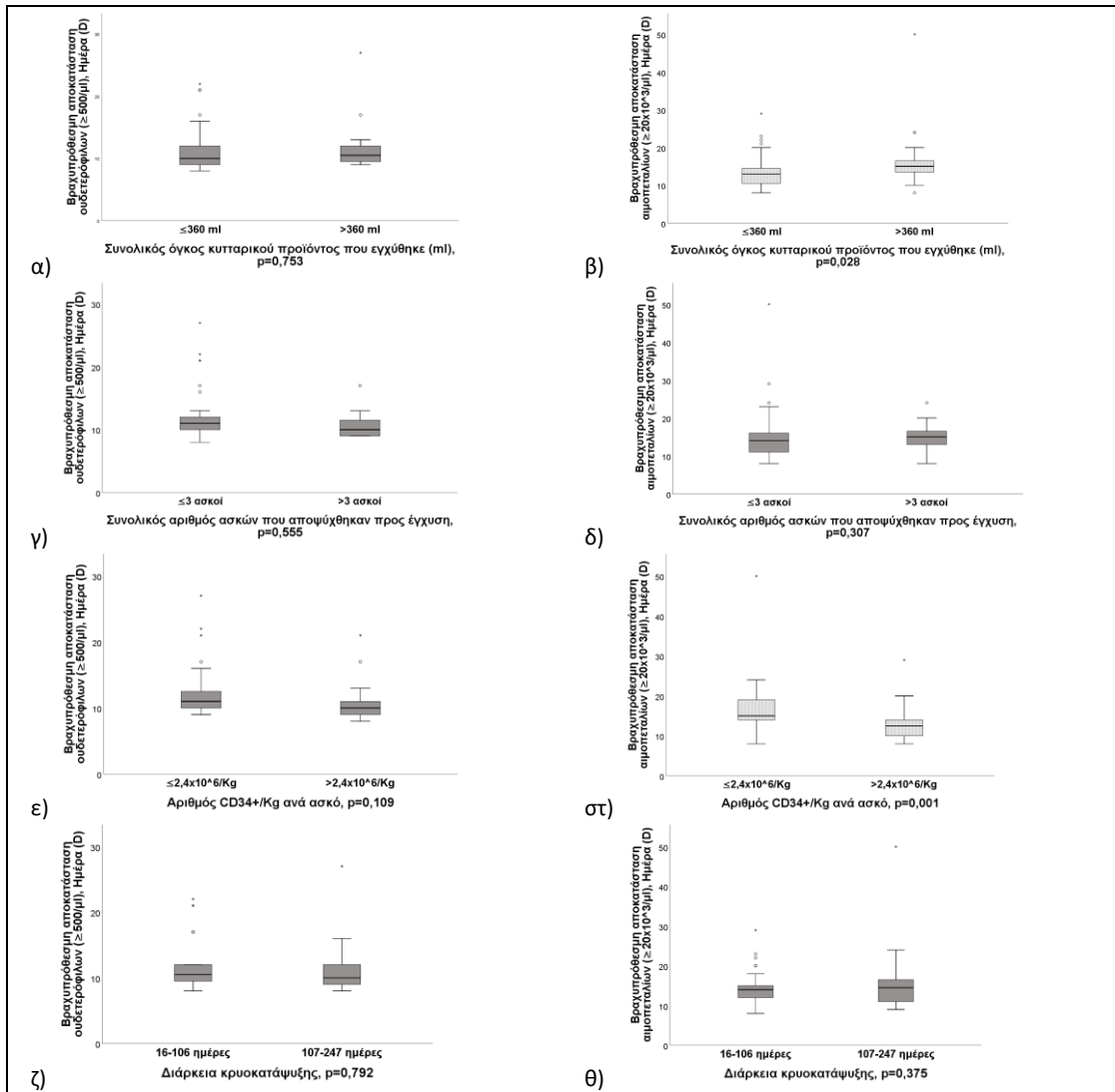
3.3.5 Αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του μοσχεύματος

- Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του όγκου του αποψυγμένου κυτταρικού προϊόντος, που εγχύθηκε στη AMMO, και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων ($p=0,472$). Αντίθετα παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μικρή θετική συσχέτιση του όγκου του κυτταρικού προϊόντος με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων ($r=0,283$, $p=0,028$). Όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση, παρατηρήθηκε μια σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων έως την D60 ($r=-0,274$, $p=0,033$) καθώς και μια σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση με την αποκατάσταση των αιμοπεταλίων έως την D60 ($r=-0,428$, $p=0,001$), την D90 ($r=-0,430$, $p=0,001$) και την D180 ($r=-0,430$, $p=0,001$). Μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν $\leq 360\text{ml}$ και $>360\text{ml}$ κυτταρικού προϊόντος, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη διάμεση τιμή της ημέρας, όπου τα ουδετερόφιλα ήταν $>500/\mu\text{l}$ (10 έναντι 11 ημερών, αντίστοιχα, $p=0,753$), όμως το 94,4% των ασθενών, που έλαβαν $\leq 360\text{ml}$, είχε αριθμό ουδετερόφιλων >1500 έως την D30 σε αντίθεση με το 76% των ασθενών, που έλαβαν $>360\text{ml}$, μια διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0,044$). Τα ποσοστά των ασθενών στους οποίους υπήρξε ή όχι αποκατάσταση των ουδετερόφιλων έως τις D60, 90 και 180 δε διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των δυο ομάδων ασθενών. Αντίθετα, μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν $\leq 360\text{ml}$ και $>360\text{ml}$ κυτταρικού προϊόντος υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο στη διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$ (13 ημέρες έναντι 15 ημερών, αντίστοιχα, $p=0,028$), όσο και στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $>50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D30 (97,2% των ασθενών έναντι 80%, αντίστοιχα, $p=0,038$), στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $>100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D60 (100% των ασθενών έναντι 68%, αντίστοιχα, $p<0,0005$), και στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $>140 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D90 και D180 (94,4% των ασθενών έναντι 56%, αντίστοιχα, $p<0,0005$) (Πίνακας 3.10, εικόνα 3.6α,β).

- Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ασκών, που αποψύχθηκαν και εγχύθηκαν στην AMMO, και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων ($p=0,313$). Αντίθετα παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μικρή θετική συσχέτιση του αριθμού των ασκών με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων ($r=0,264$, $p=0,041$). Όσο αφορά τη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση, παρατηρήθηκε μια σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων έως την D60 ($r=-0,267$, $p=0,038$ και $r=-0,401$, $p=0,001$, αντίστοιχα) καθώς και μια σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση με την αποκατάσταση των αιμοπεταλίων έως την D90 και την D180 ($r=-0,371$, $p=0,003$). Μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν ≤ 3 και >3 ασκοί κυτταρικού προϊόντος, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων. Αντίθετα, μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν ≤ 3 και >3 ασκοί κυτταρικού προϊόντος, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων ή στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $>50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D30, αλλά υπήρξαν στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $>100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D60 (95,6% των ασθενών έναντι 62,5, αντίστοιχα, $p=0,003$), και στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $>140 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D90 και D180 (86,7% των ασθενών έναντι 56,3%, αντίστοιχα, $p=0,017$) (Πίνακας 3.10, εικόνα 3.6γ,δ).
- Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των CD34+/Kg, που περιέχονταν ανά ασκό, που εγχύθηκε στην AMMO με την ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων $>500/\mu\text{l}$ ($r=-0,291$, $p=0,024$) καθώς και μια στατιστικά σημαντική μικρή θετική συσχέτιση με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων $>1500/\mu\text{l}$ έως την D30 και την D60 ($r=0,259$, $p=0,044$ και $r=0,267$, $p=0,038$, αντίστοιχα). Όσο αφορά στα αιμοπετάλια, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των CD34+/Kg που περιέχονταν ανά ασκό, που εγχύθηκε στην AMMO, με την ημέρα αποκατάστασης τους $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($r=-0,459$, $p<0,0005$) αλλά και μια στατιστικά σημαντική μέτρια θετική

συσχέτιση με την αποκατάσταση τους $>140 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D90 και την D180 ($r=0,384$, $p=0,002$). Μεταξύ των ασθενών που έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ και $>2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων ($p=0,109$), υπήρξε όμως διαφορά στην ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων (D15 έναντι D12, $p=0,001$). Όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση της αιμοποίησης, με στατιστικά σημαντικές διαφορές, το 96,9% των ασθενών που έλαβαν $>2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ είχε $>1500/\mu\text{l}$ ουδετερόφιλα έως την D30 έναντι του 75,9% όσων έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,018$), το 96,9% έναντι του 75,9% είχε $>100 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D60 ($p=0,018$) και το 93,8% έναντι του 62,1% είχε $>140 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D90 και την D180 ($p=0,003$) (Πίνακας 3.10, εικόνα 3.6ε,στ).

- Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση της βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης αποκατάστασης της αιμοποίησης με τη διάρκεια της κρυσυντήρησης (εύρος 16-247 ημέρες) (Πίνακας 3.10, εικόνα 3.6ζ,η).



Εικόνα 3.6 Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων στην AMMO σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του μοσχεύματος

Πίνακας 3.10 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του μοσχεύματος

	Ημέρες (εύρος) έως		Έως D30 N (%) με		Έως D60 N (%) με		Έως D90 N (%) με		Έως D180 N (%) με	
	NEUT≥500/μl	PLT≥20x10 ³ /μl	NEUT≥1500/μl	PLT≥50K/μl	NEUT≥1500/μl	NEUT≥500/μl	PLT≥20x10 ³ /μl	NEUT≥1500/μl	PLT≥50K/μl	NEUT≥1500/μl
Όγκος προϊόντος που εγχύθηκε (ml), r	p=0,472	0,283, p=0,028	p=0,089	p=0,121	-0,274, p=0,033	-0,428, p=0,001	p=0,169	-0,430, p=0,001	p=0,226	-0,430, p=0,001
≤360 ml	10 (8-22)	13 (8-29)	34 (94,4%)	35 (97,2%)	36 (100%)	36 (100%)	36 (100%)	34 (94,4%)	36 (100%)	34 (94,4%)
>360 ml	11 (9-27)	15 (8-50)	19 (76%)	20 (80%)	22 (88%)	17 (68%)	23 (92%)	14 (56%)	23 (92%)	14 (56%)
	p=0,753	p=0,028	p=0,044	p=0,038	p=0,064	p<0,0005	p=0,164	p<0,0005	p=0,164	p<0,0005
Αριθμός ασκών που αποψύχθηκαν, r	p=0,313	0,264, p=0,041	p=0,143	p=0,229	-0,267, p=0,038	-0,401, p=0,001	p=0,201	-0,371, p=0,003	p=0,531	-0,371, p=0,003
≤3	11 (8-27)	14 (8-50)	41 (91,1%)	42 (93,3%)	44 (97,8%)	43 (95,6%)	44 (97,8%)	39 (86,7%)	44 (97,8%)	39 (86,7%)
>3	10 (9-17)	15 (8-24)	12 (75%)	13 (81,3%)	14 (87,5%)	10 (62,5%)	15 (93,8%)	9 (56,3%)	15 (93,8%)	9 (56,3%)
	p=0,555	p=0,307	p=0,116	p=0,179	p=0,166	p=0,003	p=0,459	p=0,017	p=0,459	p=0,017
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε, r	-0,291, p=0,024	-0,459, p<0,0005	0,259, p=0,044	0,222, p=0,086	0,267, p=0,038	0,350, p=0,006	0,214, p=0,097	0,384, p=0,002	p=0,125	0,384, p=0,002
≤2,4x10⁶	11 (9-27)	15 (8-50)	22 (75,9%)	24 (82,8%)	26 (89,7%)	22 (75,9%)	27 (93,1%)	18 (62,1%)	27 (93,1%)	18 (62,1%)
>2,4x10⁶	10 (8-21)	12 (8-29)	31 (96,9%)	31 (96,9%)	32 (100%)	31 (96,9%)	32 (100%)	30 (93,8%)	32 (100%)	30 (93,8%)
	p=0,109	p=0,001	p=0,018	p=0,077	p=0,102	p=0,018	p=0,222	p=0,003	p=0,222	p=0,003
Διάρκεια κρυσσυντήρησης, r	p=0,983	p=0,291	p=0,568	p=0,258	p=0,381	p=0,275	p=0,508	p=0,341	p=0,345	p=0,341
16-106 ημέρες	10 (8-22)	14 (8-29)	29 (90,6%)	30 (93,8%)	32 (100%)	30 (93,8%)	32 (100%)	27 (84)	32 (100%)	27 (84)
107-247 ημέρες	10 (8-27)	14 (9-50)	24 (82,8%)	25 (86,2%)	26 (89,7%)	23 (79,3%)	27 (93,1%)	21 (72,4%)	27 (93,1%)	21 (72,4%)
	p=0,792	p=0,375	p=0,298	p=0,289	p=0,102	p=0,098	p=0,222	p=0,204	p=0,222	p=0,204

3.5.6 Αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των CD34+/Kg που χορηγήθηκαν στην ΑΜΜΟ

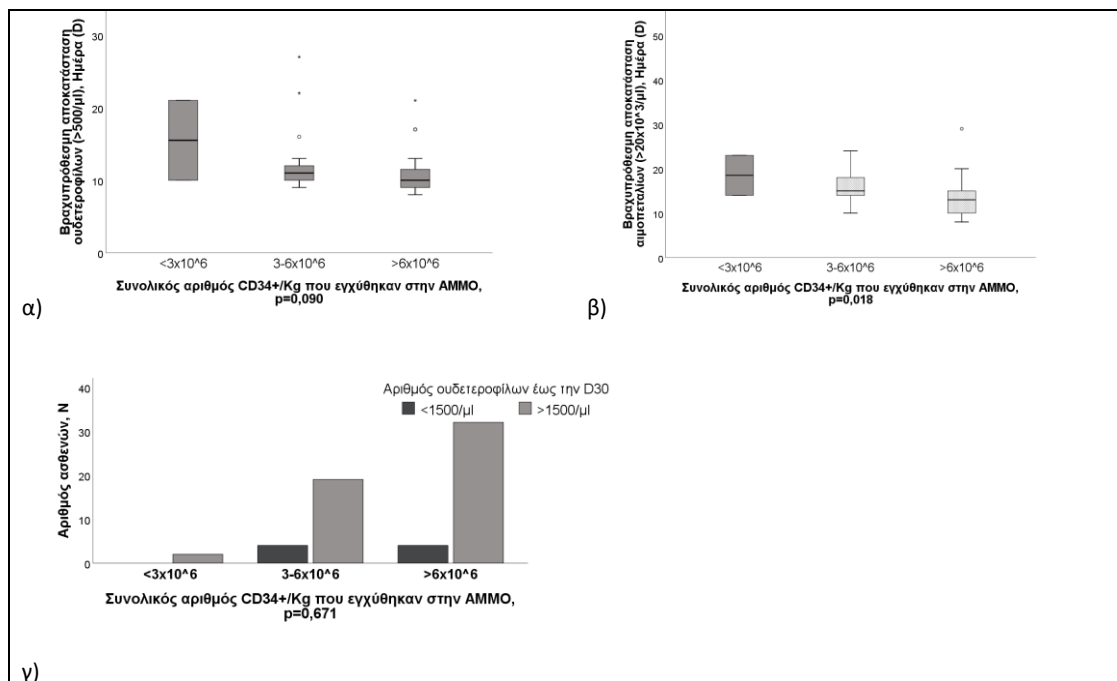
Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ στους ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν $< 3 \times 10^6$ CD34+ κύτταρα/Kg βάρους σώματος ($2,7 \times 10^6/\text{Kg}$ - $2,9 \times 10^6/\text{Kg}$, N=2), ήταν η D15 (εύρος 10-21). Οι ασθενείς αυτοί είχαν $\geq 1500/\mu\text{l}$ ουδετερόφιλα έως την D30, τη D60 και την D90, και $\geq 2000/\mu\text{l}$ ουδετερόφιλα έως τη D180. Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων τους $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ ήταν η D18 (εύρος 14-23), ενώ είχαν $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D30, $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως τη D60, $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D90 και τη D180 (Πίνακας 3.11, εικ. 3.7).

Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ στους ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν 3×10^6 - 6×10^6 CD34+ κύτταρα/Kg βάρους σώματος (N=23), ήταν η D11 (εύρος 9-27). Το 82,6% αυτών των ασθενών είχε $\geq 1500/\mu\text{l}$ ουδετερόφιλα έως την D30, και το 91,3% έως τη D60 και τη D90, και $\geq 2000/\mu\text{l}$ ουδετερόφιλα έως τη D180. Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων τους $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ ήταν η D15 (εύρος 10-50), ενώ το 82,6% είχε $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D30 και $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως τη D60, και το 65,2% είχε $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D90 και τη D180 (Πίνακας 3.11, εικ. 3.7).

Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ στους ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν $\geq 6 \times 10^6$ CD34+ κύτταρα/Kg βάρους σώματος ($6,1 \times 10^6/\text{Kg}$ - $12,5 \times 10^6/\text{Kg}$, N=36), ήταν η D10 (εύρος 8-21). Το 88,9% αυτών των ασθενών είχε $\geq 1500/\mu\text{l}$ ουδετερόφιλα έως την D30, το 97,2% έως τη D60, το 100% έως τη D90, και το 100% είχε $\geq 2000/\mu\text{l}$ ουδετερόφιλα έως τη D180. Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων τους $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ ήταν η D13 (εύρος 8-29), ενώ το 94,4% είχε $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D30, το 88,9% είχε $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως τη D60, και το 86,1% είχε $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D90 και τη D180 (Πίνακας 3.11, εικ. 3.7).

Ο αριθμός των CD34+κυττάρων/Kg βάρους σώματος είχε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων ($r=-0,332$, $p=0,010$ και $r=-0,447$, $p<0,0005$,

αντίστοιχα). Οι διαφορές στις διάμεσες ημέρες βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών με βάση τον αριθμό των ΑΑΚ, που εγχύθηκαν, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,090$). Αντίθετα, οι διαφορές στις διάμεσες ημέρες βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,018$). Ο αριθμός των $CD34+$ κυττάρων/ Kg βάρους σώματος δεν είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων και οι διαφορές στα ποσοστά των ασθενών, που πέτυχαν μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 3.11, εικ. 3.7).



Εικόνα 3.7 Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων στην ΑΜΜΟ σε σχέση με τον αριθμό $CD34+/Kg$ που εγχύθηκαν

Πίνακας 3.11 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση της αιμοποίησης σε σχέση με τον αριθμό CD34+ κυττάρων /Kg που εγχύθηκαν

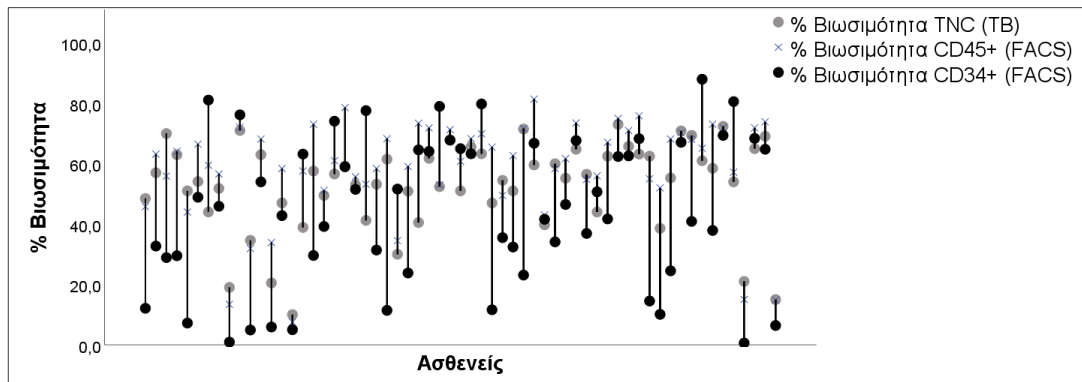
Αριθμός CD34+/Kg	Ημέρες (εύρος) έως		Έως D30 N (%) με		Έως D60 N (%) με		Έως D90 N (%) με		Έως D180 N (%) με	
	NEUT≥500/μl	PLT≥20x10 ³ /μl	NEUT≥1500/μl	PLT≥50K/μl	NEUT≥1500/μl	NEUT≥500/μl	PLT≥20x10 ³ /μl	NEUT≥1500/μl	PLT≥50K/μl	NEUT≥1500/μl
	-0,332, p=0,010	-0,447, p<0,0005	p=0,346	p=0,158	p=0,553	p=0,568	p=0,146	p=0,217	p=0,056	p=0,217
<3x10 ⁶ /Kg	15 (10-21)	18 (14-23)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
3 x10 ⁶ -6 x10 ⁶ /Kg	11 (9-27)	15 (10-50)	19 (82,6%)	19 (82,6%)	21 (91,3%)	19 (82,6%)	21 (91,3%)	15 (65,2%)	21 (91,3%)	15 (65,2%)
>6 x10 ⁶ /Kg	10 (8-21)	13 (8-29)	32 (88,9%)	34 (94,4%)	35 (97,2%)	32 (88,9%)	36 (100%)	31 (86,1%)	36 (100%)	31 (86,1%)
	p=0,090	p=0,018	p=0,671	p=0,295	p=0,560	p=0,671	p=0,181	p=0,122	p=0,181	p=0,122

3.4 Βιωσιμότητα και απόπτωση αποψυγμένων AAK

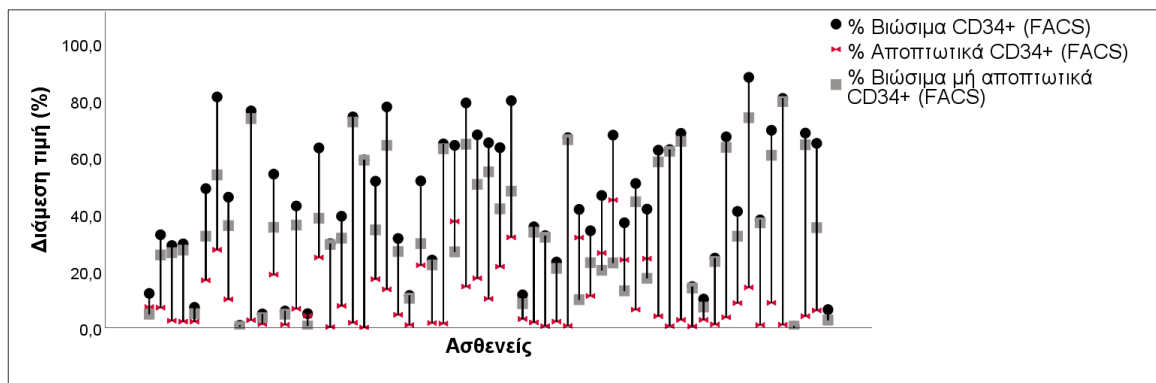
3.4.1 Γενικά

Οι πειραματικές μετρήσεις της βιωσιμότητας και της απόπτωσης των AAK στα κρουοσυντηρημένα προϊόντα πραγματοποιήθηκαν με την απόψυξη και ανάλυση των δειγμάτων στα δορυφόρα κρουοφιαλίδια. Ο διάμεσος χρόνος μεταξύ της αυτόλογης μεταμόσχευσης και της μέτρησης της βιωσιμότητας ήταν 335 ημέρες (εύρος 169-817 ημέρες), ενώ ο διάμεσος συνολικός χρόνος κρουοσυντήρησης από τη συλλογή έως τη μέτρηση βιωσιμότητας ήταν 456 ημέρες (εύρος 242-912 ημέρες) (Πίνακας 3.16).

Η βιωσιμότητα των κυττάρων αναλύθηκε με δύο τεχνικές μεθόδους: α) με χρωστική Trypan blue (TB) και β) με κυτταρομετρία ροής (FACS). Με την πρώτη μέθοδο υπολογίστηκε το ποσοστό των ζώντων εμπύρηνων κυττάρων (TNC) ενώ με τη δεύτερη μέθοδο μετρήθηκε το ποσοστό των βιώσιμων CD45+ και CD34+ κυττάρων. Επιπλέον, με τον αποκλεισμό των αποπτωτικών CD45+ και CD34+ κυττάρων, μετρήθηκε ο αριθμός των βιώσιμων μη αποπτωτικών («πραγματικά» βιώσιμων) CD45+ και CD34+ κυττάρων αντίστοιχα. Οι διάμεσες και οι μέσες τιμές του ποσοστού βιωσιμότητας και απόπτωσης για κάθε κυτταρικό πληθυσμό, δηλαδή των TNC, CD45+ και CD34+ κυττάρων παρατίθενται στον πίνακα 3.12. Παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση τιμών τόσο της % βιωσιμότητας ανά κυτταρικό πληθυσμό μεταξύ των δειγμάτων όσο και μεταξύ της % βιωσιμότητας των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών ανά δείγμα, η οποία φαίνεται διαγραμματικά στην εικόνα 6.8α. Παρόμοια διακύμανση παρατηρήθηκε και μεταξύ της % απόπτωσης και της % «πραγματικής» βιωσιμότητας των AAK (εικόνα 3.8β).



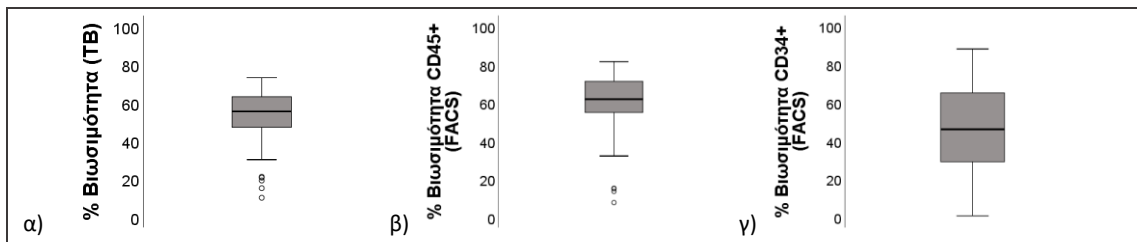
Εικόνα 3.8α Διακύμανση της % βιωσιμότητας ανά κυτταρικό πληθυσμό μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων ασθενών



Εικόνα 3.8β Διακύμανση του % ποσοστού βιωσιμότητας και απόπτωσης των CD34+ κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων (β).

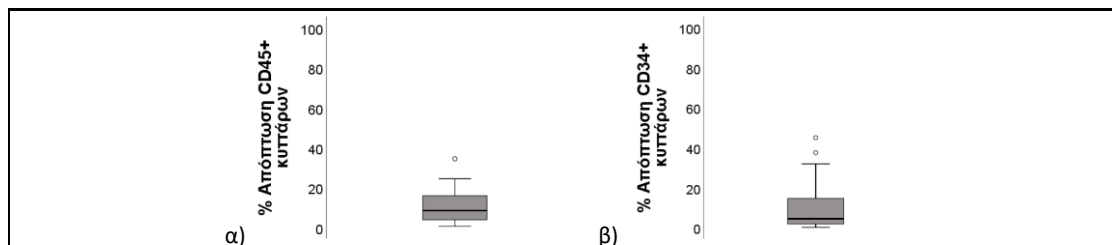
3.4.2 Βιωσιμότητα και απόπτωση των CD45+ και CD34+ κυττάρων

Η διάμεση τιμή του ποσοστού βιωσιμότητας των CD45+ κυττάρων στα 61 δείγματα, που αναλύθηκαν, ήταν 61,7% (εύρος: 7,5-81,4%) και των και CD34+ κυττάρων 45,9% (εύρος: 0,6-88%) (Πίνακας 3.12, εικ. 3.9β,γ). Σε 11 δείγματα η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων ήταν καλύτερη έναντι των CD45+ κυττάρων έως και 56,9% ενώ σε 50 δείγματα ήταν χειρότερη έως και 26%. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μειωμένη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων σε σχέση με των CD45+ κυττάρων (-12,6%, $p < 0,0005$). Η διμεταβλητή συσχέτιση των δύο ποσοστών βιωσιμότητας έδειξε πως υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική θετική, μέτριας ισχύος συσχέτιση μεταξύ τους, $r(59)=0,506$, $p < 0,0005$, η οποία δεν είναι γραμμική (Πίνακας 3.13, εικ.3.12β).



Εικόνα 3.9 Βιωσιμότητα κυτταρικών πληθυσμών, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο με Trypan Blue (TB) και κυτταρομετρία ροής (FACS).

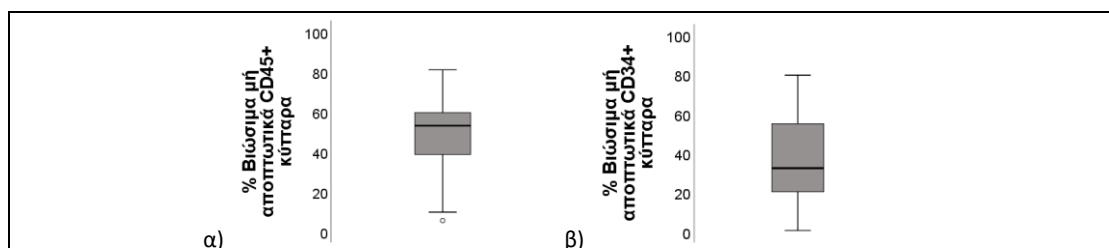
Η διάμεση τιμή του ποσοστού απόπτωσης των CD45+ κυττάρων στα 61 δείγματα, που αναλύθηκαν, ήταν 8,4% (εύρος: 0,5-34,3%) και των και CD34+ κυττάρων 4,3% (εύρος: 0-44,9%) (Πίνακας 3.12, εικ. 3.10). Σε 32 δείγματα η απόπτωση των CD34+ κυττάρων ήταν μεγαλύτερη έναντι των CD45+ κυττάρων έως και 31,7% ενώ σε 29 δείγματα ήταν μικρότερη έως και 20,3%. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά μη σημαντική μειωμένη απόπτωση των CD34+ κυττάρων σε σχέση με των CD45+ κυττάρων (-0,5%, $p=0,281$). Η διμεταβλητή συσχέτιση των δύο ποσοστών απόπτωσης έδειξε πως υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική, μη γραμμική, μέτριας ισχύος θετική συσχέτιση μεταξύ τους ($r_{(s)}=0,553$, $p<0.0005$) (Πίνακας 3.13).



Εικόνα 3.10 Απόπτωση CD45+ και CD34+ κυττάρων

Η διάμεση τιμή του % «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD45+ κυττάρων στα 61 δείγματα, που αναλύθηκαν, ήταν 52,9% (εύρος: 5,4-80,9%) και των και CD34+ κυττάρων 32,2% (εύρος: 0,5-79,5%) (Πίνακας 3.12, εικ. 3.11). Σε 13 δείγματα το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ήταν μεγαλύτερο έναντι των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ κυττάρων έως και 23,2% ενώ σε 47 δείγματα ήταν μικρότερο έως και 57,3%. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε ένα στατιστικά σημαντικό μειωμένο ποσοστό «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων σε σχέση με των CD45+ κυττάρων (-12,7%, $p<0,0005$). Η διμεταβλητή συσχέτιση των δύο ποσοστών «πραγματικής» βιωσιμότητας έδειξε πως υπάρχει μια στατιστικώς

σημαντική, μη γραμμική, μέτριας ισχύος θετική συσχέτιση μεταξύ τους, $r(59)=0,542$, $p<0,0005$ (Πίνακας 3.13, εικ. 3.14β).

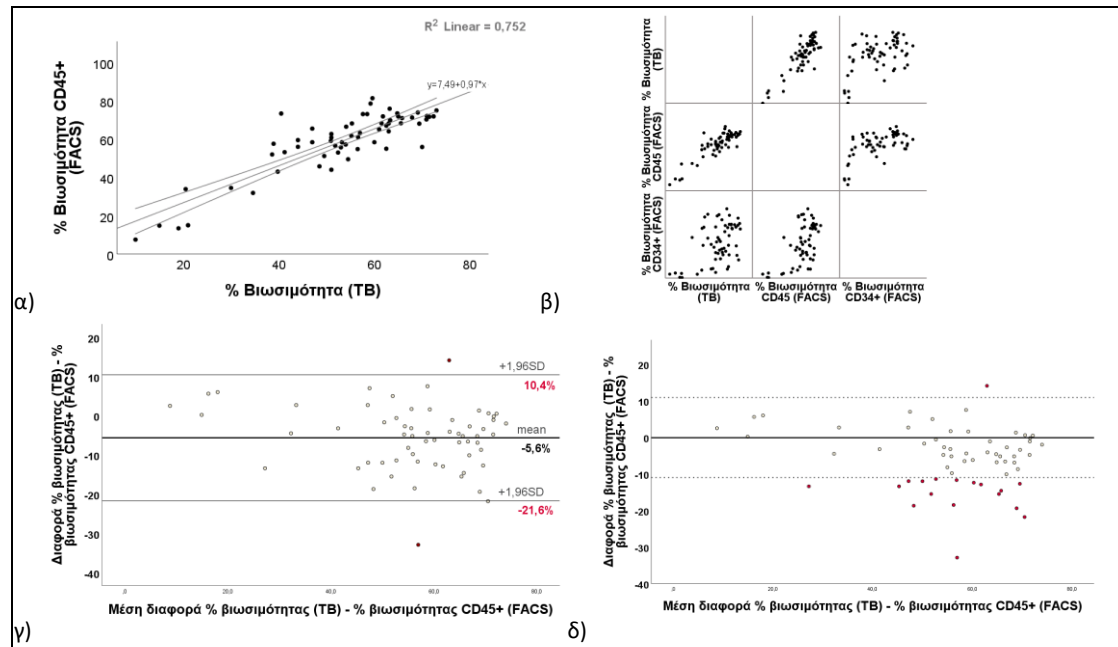


Εικόνα 3.11 «Πραγματική» βιωσιμότητα CD45+ και CD34+ κυττάρων

3.4.3 Σύγκριση βιωσιμότητας με TB έναντι βιωσιμότητας με FACS

Η διάμεση τιμή της % βιωσιμότητας των TNC κυττάρων στα 61 δείγματα, που αναλύθηκαν, ήταν 55,3% (εύρος: 10-73%) (Πίνακας 3.12, εικ. 3.9α). Σε 15 δείγματα το ποσοστό των ζωντανών TNC ήταν μεγαλύτερο έναντι των CD45+ κυττάρων έως και 14,1% ενώ σε 46 δείγματα ήταν μικρότερο έως και 32,9%. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε ένα στατιστικά σημαντικό μειωμένο % βιωσιμότητας των TNC σε σχέση με των CD45+ κυττάρων (-4,8%, $p<0,0005$) και μια στατιστικά σημαντική ικανοποιητική συμφωνία των δύο μετρήσεων της τάξεως του 87,2% ($W=0,872$, $p<0,0005$). Ομοίως ικανοποιητική συμφωνία κατέδειξε και ο Lin's correlation coefficient, $r_c=0,808$. Η γραμμική διμεταβλητή συσχέτιση των δύο ποσοστών βιωσιμότητας έδειξε πως υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική μετρίως ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ τους, $r(59)=0,867$, $p<0,0005$, η οποία μπορεί να εκφραστεί με τη γραμμική εξίσωση: $\%CD45+ \text{ βιωσιμότητα} = 7,49 + (0,97 \times \%TNC \text{ βιωσιμότητα})$, $R^2=0,748$, $p<0,0005$ (Πίνακας 3.13, εικ. 3.12α,β). Με βάση την ανάλυση κατά Bland και Altman η μέση διαφορά μεταξύ της % βιωσιμότητας των TNC (με τη μέθοδο TB) και της % βιωσιμότητας των CD45+ (με τη μέθοδο FACS) ήταν ίση με $-5,64 \pm 8,18$, με όρια συμφωνίας μεταξύ $-21,6$ και $10,4$ (εικ. 3.12γ). Η απόσταση του 5,6% απέχει σημαντικά από το 0 ($p<0,0005$), ενώ τα όρια συμφωνίας είναι ευρεία και ξεπερνούν το $\pm 10\%$, το οποίο θα μπορούσε να αποτελεί ένα αποδεκτό όριο. Μεταξύ των 18 περιπτώσεων, όπου η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από $\pm 10\%$, σε μία περίπτωση είχε υπερεκτιμηθεί η % βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο TB (κατά

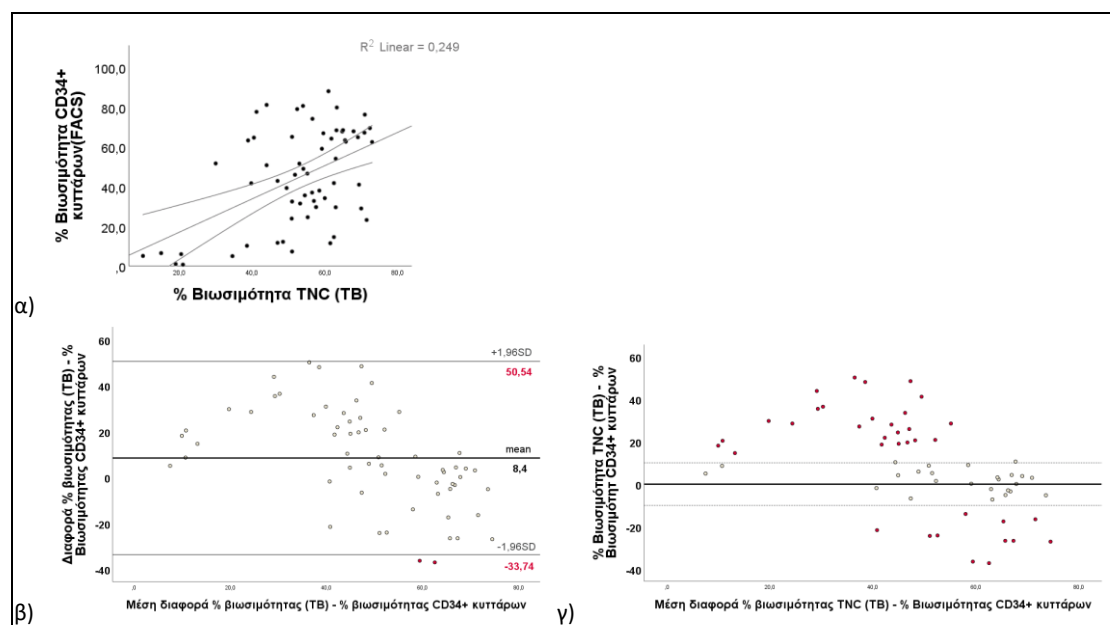
14,1%) ενώ στις λοιπές 17 περιπτώσεις, η μέθοδος TB είχε υποτιμήσει την % βιωσιμότητα (σε 7 περιπτώσεις περισσότερο από 15%, έως και 33%) (εικ. 3. 12δ).



Εικόνα 3.12 Σύγκριση εκτίμησης βιωσιμότητας με TB έναντι βιωσιμότητας CD45+ κυττάρων με FACS

Σε 42 δείγματα το ποσοστό των ζωντανών TNC ήταν μεγαλύτερο έναντι των CD34+ κυττάρων έως και 50,1% ενώ σε 19 δείγματα ήταν μικρότερο έως και 37,1%. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε ένα στατιστικά σημαντικό αυξημένο % βιωσιμότητας των TNC σε σχέση με των CD34+ κυττάρων (5,9%, $p=0,004$ και $p=0,005$) και μια στατιστικά σημαντική μη ικανοποιητική συμφωνία των μεθόδων ανάλυσης ($W=0,705$, $p=0,02$). Ομοίως μικρή συμφωνία κατέδειξε και ο Lin's correlation coefficient, $r_c=0,405$. Η διμεταβλητή συσχέτιση των δύο ποσοστών βιωσιμότητας έδειξε πως υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική μικρής έντασης θετική συσχέτιση μεταξύ τους, $r(59)=0,410$, $p=0,001$, η οποία δεν είναι γραμμική (Πίνακας 3.13, εικ. 3.12β). Με βάση την ανάλυση κατά Bland και Altman η μέση διαφορά μεταξύ της % βιωσιμότητας των TNC (με τη μέθοδο TB) και της % βιωσιμότητας των CD34+ (με τη μέθοδο FACS) ήταν ίση με $8,4 \pm 21,5$, με όρια συμφωνίας μεταξύ $-33,74$ και $50,54$ (εικ. 3.13β). Η απόσταση των $8,4\%$ απέχει σημαντικά από το 0 ($p<0,003$), ενώ τα όρια συμφωνίας ξεπερνούν το αποδεκτό όριο του $\pm 10\%$ και ταυτόχρονα είναι εξαιρετικά ευρεία. Στις 26 από τις 37 περιπτώσεις όπου η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από $\pm 10\%$, είχε υπερεκτιμηθεί η % βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού με τη

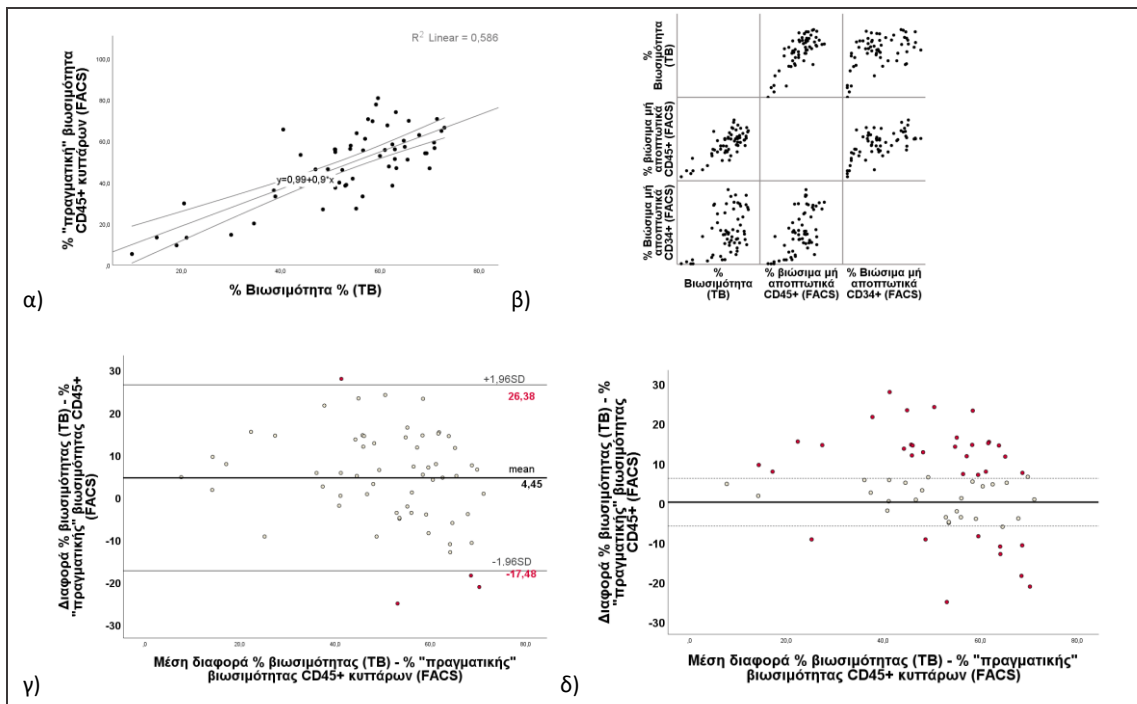
μέθοδο TB, στις 24 εξ αυτών η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από 15%, στις 15 ήταν μεγαλύτερη από 25%, και σε 5 ήταν μεγαλύτερη από 40%. Στις λοιπές 11 περιπτώσεις, η μέθοδος TB είχε υποτιμήσει την % βιωσιμότητα περισσότερο από 15%, έως και 37,1% (εικ. 13γ).



Εικόνα 3.13 Σύγκριση εκτίμησης βιωσιμότητας με TB έναντι βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων με FACS

Σε 43 δείγματα το ποσοστό των ζωντανών TNC ήταν μεγαλύτερο έναντι των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ κυττάρων έως και 27,8% ενώ σε 18 δείγματα ήταν μικρότερο έως και 25,2%. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε ένα στατιστικά σημαντικό αυξημένο % βιωσιμότητας των TNC σε σχέση με των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ κυττάρων (5,2%, $p < 0,0005$) και μια στατιστικά σημαντική μετρίως ικανοποιητική συμφωνία των δύο μεθόδων της τάξεως του 83,4% ($W=0,834$, $p=0,001$). Ομοίως μετρίως ικανοποιητική συμφωνία κατέδειξε και ο Lin's correlation coefficient, $r_c=0,718$. Η διμεταβλητή συσχέτιση των δύο ποσοστών βιωσιμότητας έδειξε πως υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική μετρίως ισχυρή θετική και γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους, $r(59)=0,766$, $p < 0,0005$, η οποία εκφράζεται από την εξίσωση: $\%CD45$ «πραγματική» βιωσιμότητα = $0,99 + (0,9 \times \%TNC$ βιωσιμότητα) (Πίνακας 3.13, εικ. 3.14α,β). Η ανάλυση κατά Bland και Altman έδειξε μία μέση διαφορά μεταξύ της % βιωσιμότητας των TNC (με τη μέθοδο TB) και της % βιωσιμότητας των CD45+ (με τη μέθοδο FACS) ίση με $4,45 \pm 11,19$, με όρια συμφωνίας μεταξύ -17,45 και 26,38 (εικ. 3.14γ). Η απόσταση των 4,45% απέχει

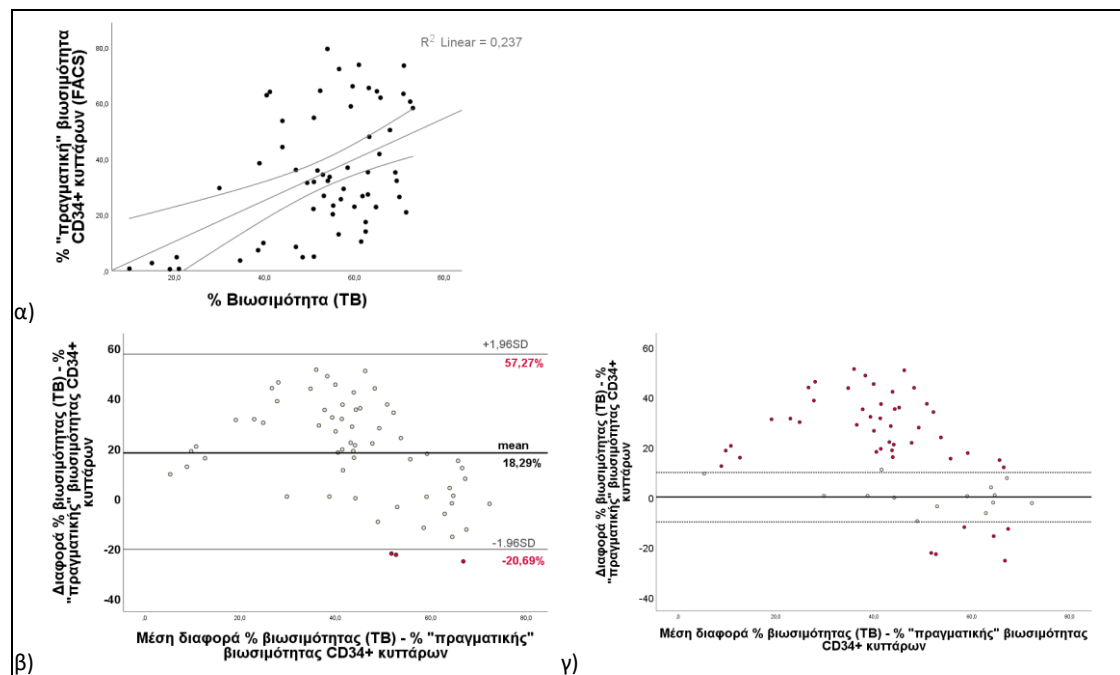
σημαντικά από 0 ($p < 0,003$), ενώ τα όρια συμφωνίας είναι ευρεία και ξεπερνούν το αποδεκτό όριο του $\pm 10\%$. Στις 20 από τις 26 περιπτώσεις όπου η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από $\pm 10\%$, είχε υπερεκτιμηθεί η % βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο TB, στις 3 εξ αυτών η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από 15%, έως και 25,2%. Στις λοιπές 6 περιπτώσεις, η μέθοδος TB είχε υποτιμήσει την % βιωσιμότητα, ενώ σε 3 η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από 15%, έως και 27,8% (εικ. 3.14δ).



Εικόνα 3.14 Σύγκριση εκτίμησης βιωσιμότητας με TB έναντι «πραγματικής» βιωσιμότητας CD45+ κυττάρων με FACS

Σε 49 δείγματα το ποσοστό των ζωντανών TNC ήταν μεγαλύτερο έναντι των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων έως και 51,1% ενώ σε 12 δείγματα ήταν μικρότερο έως και 25,5%. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε ένα στατιστικά σημαντικό αυξημένο % βιωσιμότητας των TNC σε σχέση με των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων (19,2%, $p < 0,0005$) και μια στατιστικά σημαντική μη ικανοποιητική συμφωνία των δύο μεθόδων ($W = 0,709$, $p = 0,018$). Ομοίως μικρή συμφωνία κατέδειξε και ο Lin's correlation coefficient, $r_c = 0,304$. Η διμεταβλητή συσχέτιση των δύο ποσοστών βιωσιμότητας έδειξε πως υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική χαμηλής έντασης θετική συσχέτιση μεταξύ τους, $r(59) = 0,418$, $p = 0,001$, η οποία δεν είναι γραμμική (Πίνακας 3.13, εικ. 3.14β). Η ανάλυση κατά Bland και

Altman έδειξε μία μέση διαφορά μεταξύ της % βιωσιμότητας των TNC (με τη μέθοδο TB) και της % βιωσιμότητας των CD34+ (με τη μέθοδο FACS) ίση με 18,3±19,9, με όρια συμφωνίας μεταξύ -20,69 και 57,27 (εικ. 3.15β). Η απόσταση των 18,3% απέχει σημαντικά από το 0 ($p < 0,0005$), ενώ τα όρια συμφωνίας ξεπερνούν το αποδεκτό όριο του $\pm 10\%$ και ταυτόχρονα είναι εξαιρετικά ευρεία. Στις 42 από τις 48 περιπτώσεις όπου η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από $\pm 10\%$, είχε υπερεκτιμηθεί η % βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο TB, στις 35 εξ αυτών η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από 15%, στις 26 ήταν μεγαλύτερη από 25%, και σε 10 ήταν μεγαλύτερη από 40% έως και 51,1%. Στις λοιπές 6 περιπτώσεις, η μέθοδος TB είχε υποτιμήσει την % βιωσιμότητα, σε 4 εξ αυτών περισσότερο από 15% (εικ. 3.15γ).



Εικόνα 3.15 Σύγκριση εκτίμησης βιωσιμότητας με TB έναντι «πραγματικής» βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων με FACS

Πίνακας 3.12 Βιωσιμότητα και απόπτωση κυτταρικών πληθυσμών αποψυγμένων δειγμάτων

	% Βιωσιμότητα			% Απόπτωση		% Βιώσιμα μη αποπτωτικά	
	TNC	CD45+	CD34+	CD45+	CD34+	CD45+	CD34+
Μέση τιμή (mean±SD)	53,1±14,7	58,7±16,4	44,7±24,7	10,1±7,7	9,5±10,7	48,6±17,2	34,8±22,3
Διάμεση τιμή (median)	55,3	61,7	45,9	8,4	4,3	52,9	32,2
Εύρος (min-max)	63 (10-73)	73,9 (7,5-81,4)	87,4 (0,6-88)	33,8 (0,5-34,3)	44,9 (0-44,9)	75,5 (5,4-80,9)	79 (0,5-79,5)

Πίνακας 3.13 Σύγκριση βιωσιμότητας και απόπτωσης κυτταρικών πληθυσμών αποψυγμένων δειγμάτων

	Διαφορά % βιωσιμότητας μεταξύ των πληθυσμών			Διαφορά % απόπτωσης μεταξύ των πληθυσμών		Διαφορά % «πραγματικής» βιωσιμότητας μεταξύ των πληθυσμών	
	TNC και CD45+	TNC και CD34+	CD34+ και CD45+	CD34+ και CD45+	CD34+ και CD45+	TNC και CD45+	TNC και CD34+
	Διάμεση τιμή διαφοράς (median)	-4.8%	5.9%	-12,6%	-0,5%	-12,7%	5,2%
Εύρος διαφοράς (range)	47%	87%	83%	52%	80,5%	53%	76,6%
Minimum διαφορά	-32,9%	-37,1%	-56,9%	-20,3%	-57,3%	-25,2%	-25,5%
Maximum διαφορά	14,1%	50,1%	26%	31,7%	23,2%	27,8%	51,1%
Θετικές/αρνητικές διαφορές (N)	15/46	42/19	11/50	29/32	13/47	43/18	49/12
Sign test	$p<0,0005$	$p=0,005$	$p<0,0005$	$p=0,798$	$p<0,0005$	$p=0,002$	$p<0,0005$
Wilcoxon signed-rank test	$p<0,0005$	$p=0,004$	$p<0,0005$	$p=0,281$	$p<0,0005$	$p=0,002$	$p<0,0005$
Kendall's coefficient of concordance, W	0,872, $p<0,0005$	0,705, $p=0,02$	-	-	-	0,834, $p=0,001$	0,709, $p=0,018$
Lin's concordance correlation coefficient, r_c	0,808	0,405	-	-	-	0,728	0,304
Bland Altman's analysis							
Μέση τιμή διαφοράς (mean \pmSD)	-5.6 \pm 8.2%	8.4 \pm 21.5%	-14,0 \pm 19,8%	-0,56 \pm 9,8%	-13,8 \pm 18,3%	4,4 \pm 11,2%	18,3 \pm 19,9%
Άνω όριο (upper LOA)	10,39%	50,54%	-	-	-	26,38%	57,27%
Κάτω όριο (lower LOA)	-21,68%	-33,74%	-	-	-	-17,48%	-20,27%
	$p<0,0005$	$p=0,003$	-	-	-	$p=0,003$	$p<0,0005$
Pearson correlation, r	0,867, $p<0,0005$	-				0,766, $p<0,0005$	-
Spearman's correlation, $r_{(s)}$	-	0,499, $p<0,0005$	-	-	-	-	0,418, $p=0,001$

3.4.4 Παράγοντες που επηρέασαν τη βιωσιμότητα και την απόπτωση των AAK

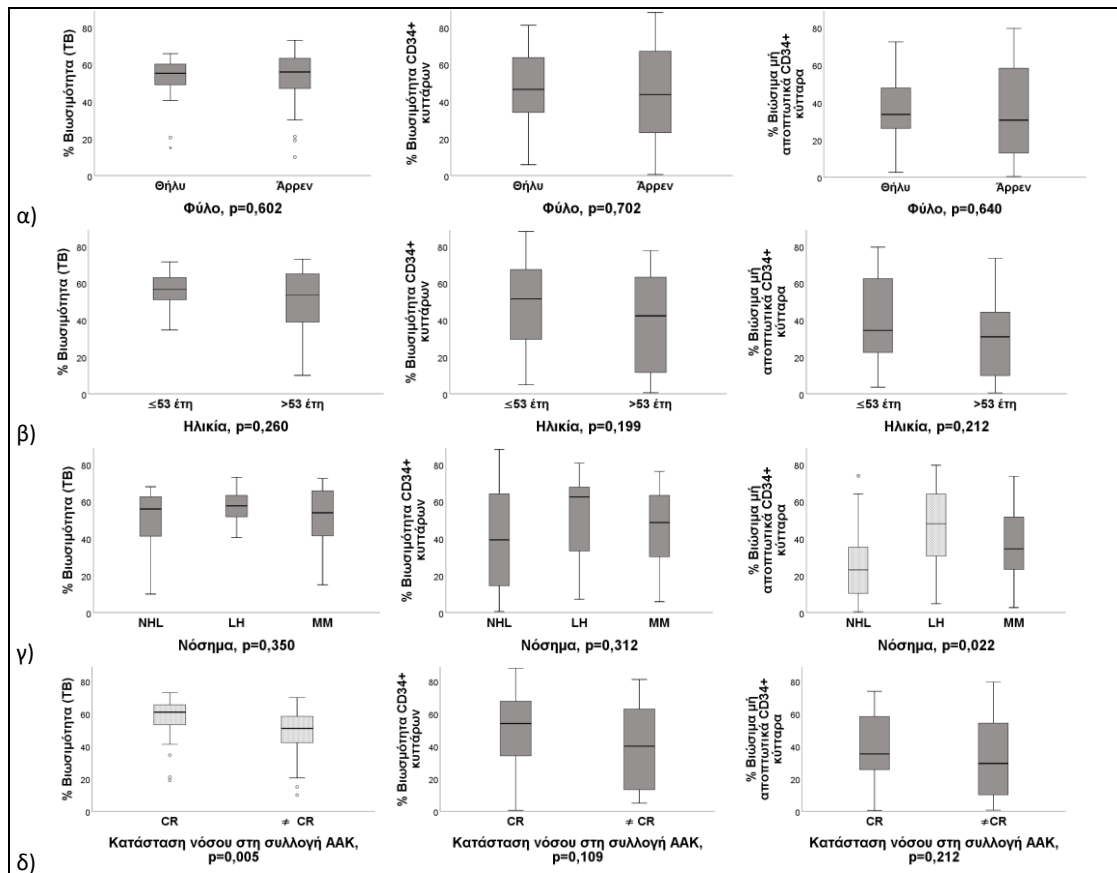
Εξαιτίας του μεγάλου εύρους της % βιωσιμότητας των AAK, διερευνήθηκαν οι παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να επηρεάζουν την βιωσιμότητα μετά την κρυοσυντήρηση και απόψυξη. Οι παράγοντες αυτοί αφορούν α) στα χαρακτηριστικά των ασθενών (φύλο, ηλικία, νόσημα, κατάσταση νόσου κατά τη συλλογή AAK), β) στα χαρακτηριστικά της κινητοποίησης και της συλλογής των AAK (σχήμα κινητοποίησης, χορήγηση Plerixafor, πτωχή κινητοποίηση, ποσοστό CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων, βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα γ) στα χαρακτηριστικά της κρυοκατάψυξης των κυττάρων (συντήρηση προ κατάψυξης, βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων προ κατάψυξης, συγκέντρωση CD45+, CD34+, PLT και PMN στον ασκό κρυοκατάψυξης, όγκος περιεχομένου ασκού κρυοκατάψυξης, διάρκεια κρυοσυντήρησης).

Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών κατά τη συλλογή των AAK.

- Μεταξύ των ασθενών διαφορετικού φύλου και διαφορετικής ηλικίας δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά βιωσιμότητας ή απόπτωσης των TNC, των CD45+ και των CD34+ κυττάρων. Παρατηρήθηκε μόνο μία στατιστικά σημαντική μέτρια πτωτική τάση της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD45+ κυττάρων σε σχέση με την ηλικία ($r_{(s)}=-0,304$, $p=0,017$), χωρίς ερευνητικό ενδιαφέρον (Πίνακας 3.14, εικ. 3.16α,β).
- Οι ασθενείς με διαφορετικά νοσήματα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα ποσοστά βιωσιμότητας, αν και συγκριτικά, οι ασθενείς με HL είχαν συνολικά καλύτερη βιωσιμότητα των TNC, των CD45+ και των CD34+ κυττάρων (57,6%, 68,1% και 62,4% αντίστοιχα) έναντι των ασθενών με NHL (55,9%, 59,3% και 39,2% αντίστοιχα) και των ασθενών με MM (53,8%, 58% και 48,6% αντίστοιχα). Ενδιαφέρουσα, αν και μη στατιστικά σημαντική, είναι η αρκετά μικρότερη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων των ασθενών με NHL. Στατιστικά μη σημαντικές ήταν οι διαφορές των ποσοστών απόπτωσης. Παρόλα αυτά το ποσοστό απόπτωσης των CD34+ κυττάρων των ασθενών με NHL ήταν αισθητά υψηλότερο (10,3%) σε σχέση με των υπολοίπων, ενώ των ασθενών με HL ήταν αισθητά χαμηλότερο (2,8%). Το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων

CD34+ κυττάρων διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των ασθενών με NHL, HL και MM (23%, 48% και 34,4% αντίστοιχα, $p=0,022$) και συγκεκριμένα μεταξύ των ασθενών με NHL και HL ($p=0,018$), ενώ το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ κυττάρων διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των ασθενών με HL και MM (56,3% και 42%, αντίστοιχα, $p=0,022$) (Πίνακας 3.14, εικ. 3.16γ).

- Η κατάσταση νόσου κατά τη συλλογή των AAK δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα και απόπτωση των CD34+ κυττάρων με στατιστικά σημαντικό τρόπο αν και είναι διακριτές οι διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μεταξύ των ασθενών, που βρίσκονταν ή όχι σε πλήρη ύφεση κατά τη συλλογή AAK (CR: 54% και 35,3% αντίστοιχα, και όχι CR: 40% και 29,4% αντίστοιχα). Η βιωσιμότητα των TNC και των CD45+ κυττάρων των ασθενών, που δε βρίσκονταν σε πλήρη ύφεση, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τους υπολοίπους (51% έναντι 61%, $p=0,005$ και 58,3% έναντι 68,2%, $p=0,021$, αντίστοιχα) (Πίνακας 3.14, εικ. 3.16δ).



Εικόνα 3.16 Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών κατά τη συλλογή των AAK

Πίνακας 3.14 Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών								
		% Βιωσιμότητα (TB)	% Βιώσιμα CD45+	% Βιώσιμα CD34+	% Αποπτωτικά CD45+	% Αποπτωτικά CD34+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD45+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+
Φύλο	Άρρεν	55,9 (10-73)	58,7 (7,5-81,4)	43,7 (0,6-88)	9,1 (0,5-24,3)	4,4 (0-44,9)	49,2 (5,4-80,9)	30,5 (0,5-79,5)
	Θήλυ	55,2 (15-65)	63,2 (14,8-73,4)	46,5 (5,9-81,1)	7,6 (1,1-34,3)	4,1 (0,3-37,4)	55,6 (13,4-70,7)	33,6 (2,7-72,3)
	<i>p</i>	0,602	0,405	0,720	0,697	0,988	0,392	0,640
Ηλικία , r(s)		-0,05, p=0,113	-0,226, p=0,079	-0,122, p=0,348	0,170, p=0,189	0,240, p=0,115	-0,304, p=0,017	-0,193, p=0,136
	≤53	56,6 (34,6-71,5)	62,7 (31,9-81,4)	51,5 (4,9-88)	6,7 (0,5-34,3)	2,8 (0,3-44,9)	55,6 (20,2-80,9)	34,4 (3,6-79,5)
	>53	53,65 (10-73)	58,4 (7,5-78,6)	42,2 (0,6-77,6)	8,8 (0,6-24,3)	5,5 (0-37,4)	44,2 (5,4-77,8)	30,9 (0,5-73,5)
	<i>p</i>	0,260	0,184	0,199	0,373	0,419	0,076	0,212
Νόσημα	NHL	55,9 (10-67,9)	59,3 (7,5-73,5)	39,2 (0,6-88)	8,9 (0,6-24,1)	10,3 (0-44,9)	49,6 (5,4-67,7)	23 (0,5-73,8)
	HL	57,6 (40,5-70,3)	68,1 (44-81,4)	62,4 (7,2-80,6)	6,5 (0,5-22,9)	2,8 (0,3-31,8)	56,3 (27-80,9)	48 (4,8-79,5)
	MM	53,8 (15-72,4)	58 (14,8-78,6)	48,6 (5,9-76,2)	15,6 (0,8-34,3)	4,3 (0,1-26,3)	42 (13,4-77,8)	34,4 (2,7-73,5)
	<i>p</i>	0,350	0,970	0,312	0,051	0,343	0,017	0,022
	<i>NHL vs HL</i>						0,074	0,018
	<i>NHL vs MM</i>						1,000	0,368
<i>HL vs MM</i>						0,022	0,229	
Κατάσταση νόσου	CR	61 (19-73)	68,2 (13,4-81,4)	54 (0,6-88)	11,7 (0,5-24,1)	7,1 (0-44,9)	54,2 (9,6-80,9)	35,3 (0,5-73,8)
	≠CR	51 (10-70)	58,3 (7,5-78,6)	40 (5-81,1)	6,6 (0,6-34,3)	2,9 (0,1-31,7)	46,7 (5,4-77,8)	29,4 (0,7-79,5)
	<i>p</i>	0,005	0,021	0,109	0,191	0,115	0,225	0,212
Σύνολο		55,3 (10-73)	61,7 (7,5-81,4)	45,9 (0,6-88)	8,4 (0,5-34,3)	4,3 (0-44,9)	52,9 (5,4-80,9)	32,2 (0,5-79,5)

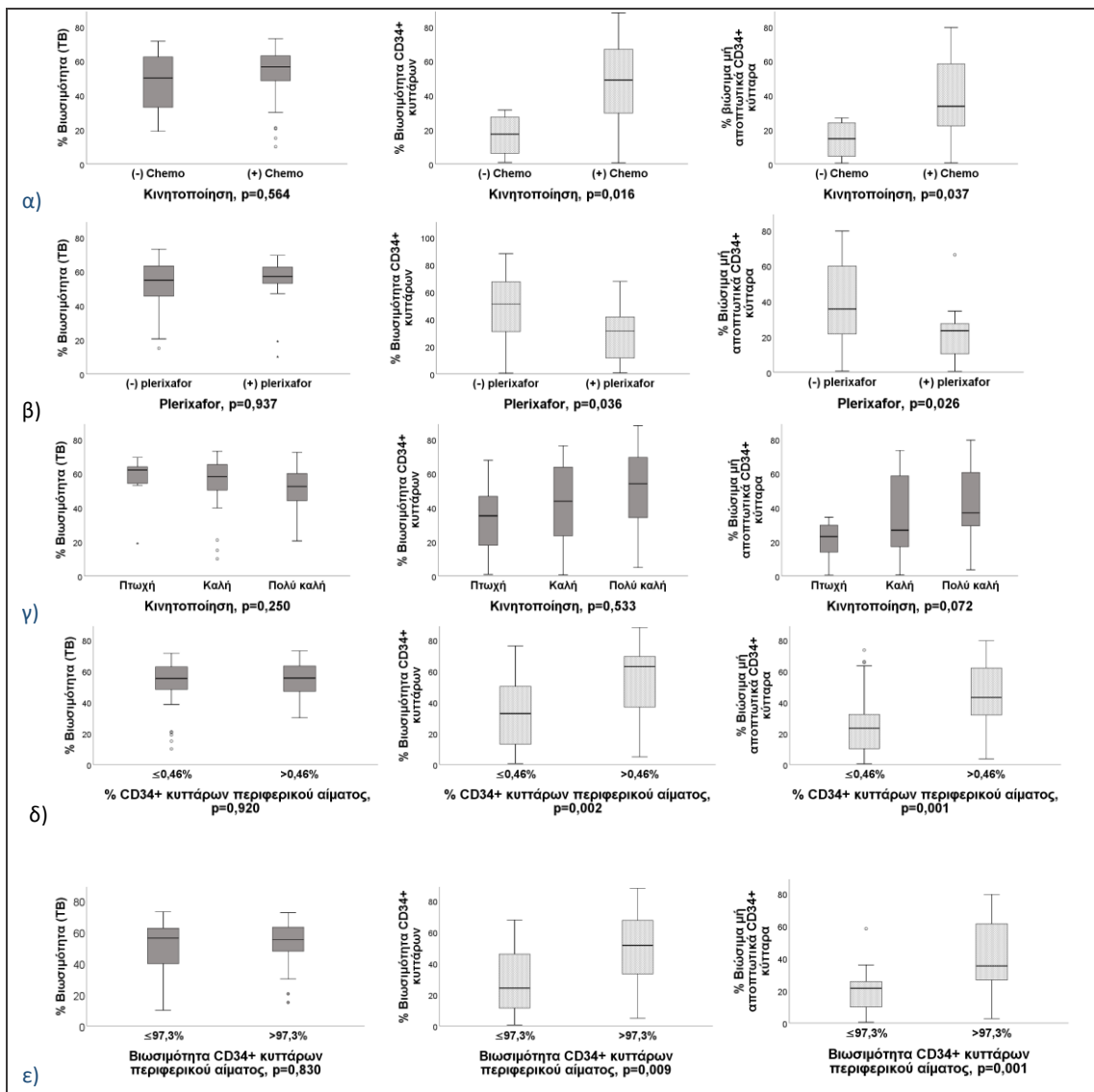
Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά της κινητοποίησης των ΑΑΚ

- Στατιστικά σημαντική ήταν η μεγαλύτερη % βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων των ασθενών, που κινητοποιήθηκαν με χημειοθεραπεία και G-CSF σε σχέση με εκείνων, που κινητοποιήθηκαν μόνο με G-CSF (48,9% έναντι 17,3%, $p=0,016$), όπως επίσης και το μεγαλύτερο ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων στην ίδια ομάδα ασθενών (33,6% έναντι 14,4%, $p=0,037$) (Πίνακας 3.15, εικ. 3.17α).
- Στους ασθενείς που χορηγήθηκε Plerixafor παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ελαττωμένη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων (31,4% έναντι 51,1%, $p=0,036$) και στατιστικά σημαντικό ελαττωμένο ποσοστό «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων (23,3% έναντι 35,6%, $p=0,026$) (Πίνακας 3.15, εικ. 3.17β).
- Μεταξύ των πτωχών, των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις διάμεσες τιμές βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων, αν και τόσο τα ποσοστά των βιώσιμων όσο και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ήταν διακριτά μεγαλύτερα στους πολύ καλούς κινητοποιητές (54% και 36,9%, αντίστοιχα), λιγότερο καλά στους καλούς κινητοποιητές (43,7% και 26,7%, αντίστοιχα), και ελαττωμένα στους πτωχούς κινητοποιητές (35,2% και 23%, αντίστοιχα). Αντίστροφη εικόνα υπήρξε για την % βιωσιμότητα των TNC και των CD45+, όπου οι πτωχοί κινητοποιητές είχαν καλύτερη βιωσιμότητα (62% και 67,6%, αντίστοιχα), οι καλοί κινητοποιητές λιγότερο καλή (58,1% και 64,3%, αντίστοιχα) και οι πολύ καλοί κινητοποιητές τη λιγότερο καλή (52,4% και 58,4%, αντίστοιχα), χωρίς οι διαφορές μεταξύ τους να είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 3.15, εικ. 3.17γ).
- Στατιστικά σημαντική ήπια αύξηση της % βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων παρατηρήθηκε με την αύξηση του ποσοστού των CD34+ κυττάρων του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής ($r_{(s)}=0,405$, $p=0.001$) όπως και το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ($r_{(s)}=0,423$, $p=0.001$). Στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά βιώσιμων και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων είχαν οι ασθενείς, οι οποίοι είχαν ποσοστό CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής

μεγαλύτερο από 0,46% (62,9% έναντι 32,7%, $p=0,002$ και 43% έναντι 23,3%, $p=0,001$, αντίστοιχα) (Πίνακας 3.15, εικ. 3.17δ).

- Οι ασθενείς των οποίων η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής ήταν χαμηλότερη από 97,3% (N=14) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων μετά τη απόψυξη (24,1% έναντι 51,5%, $p=0,009$) και στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων (21,5% έναντι 35,3%, $p=0,001$) (Πίνακας 3.15, εικ. 3.17ε).

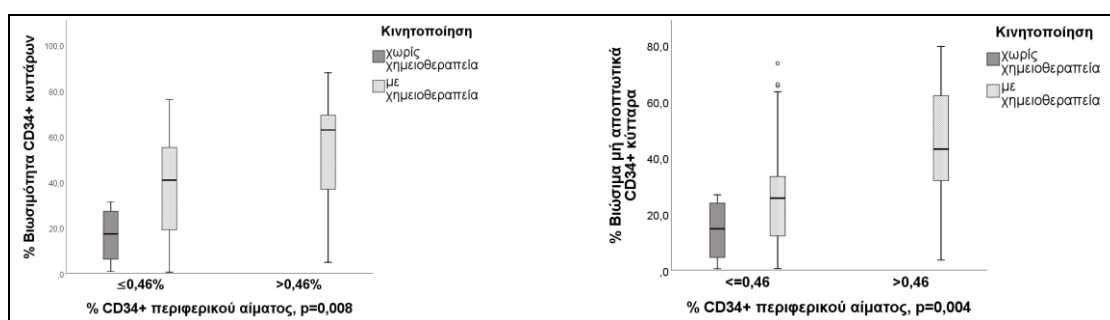
Κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δεν επηρέασε με στατιστικώς σημαντικό τρόπο την % βιωσιμότητα των TNC ή των CD45+ κυττάρων.



Εικόνα 3.17 Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά της κινητοποίησης των AAK

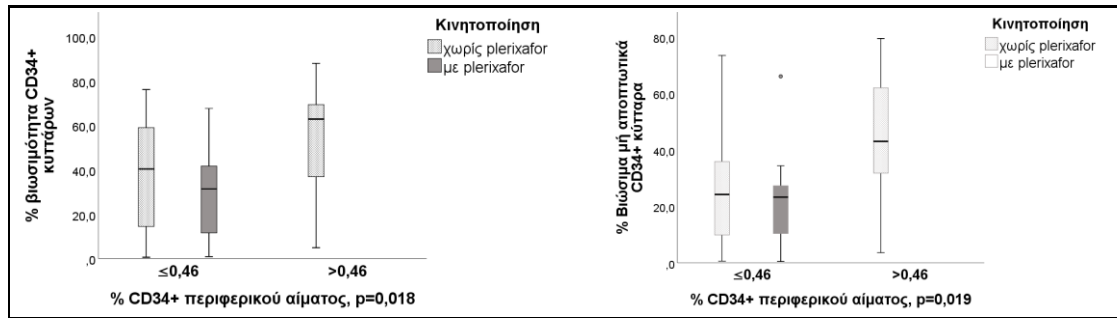
Το αυξημένο ή μειωμένο ποσοστό των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα σχετίζεται σημαντικά με την κινητοποίηση με ή χωρίς χημειοθεραπεία (με χημειοθεραπεία: 0,48% έναντι χωρίς χημειοθεραπεία: 0,14%, $p=0,007$), τη χορήγηση Plerixafor (με Plerixafor: 0,64% έναντι χωρίς Plerixafor: 0,17%, $p<0,0005$), και το νόσημα (HL: 1,07% έναντι NHL: 0,33%, $p=0,003$), όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο (πίνακας 3.2).

- Κανένας από τους ασθενείς, που κινητοποιήθηκε μόνο με G-CSF, δεν παρήγαγε CD34+ κύτταρα σε ποσοστό $>0,46\%$. Μεταξύ των ασθενών, που κινητοποιήθηκαν με χημειοθεραπεία και G-CSF, οι 27 είχαν $\leq 0,46\%$ CD34+ κύτταρα στο περιφερικό αίμα ενώ οι 30 είχαν $>0,46\%$ και η διαφορά της % βιωσιμότητας και της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μεταξύ τους ήταν στατιστικά σημαντική (40,9% έναντι 62,9%, $p=0,008$ και 25,6% έναντι 43%, $p=0,004$, αντίστοιχα) (εικ. 3.18).



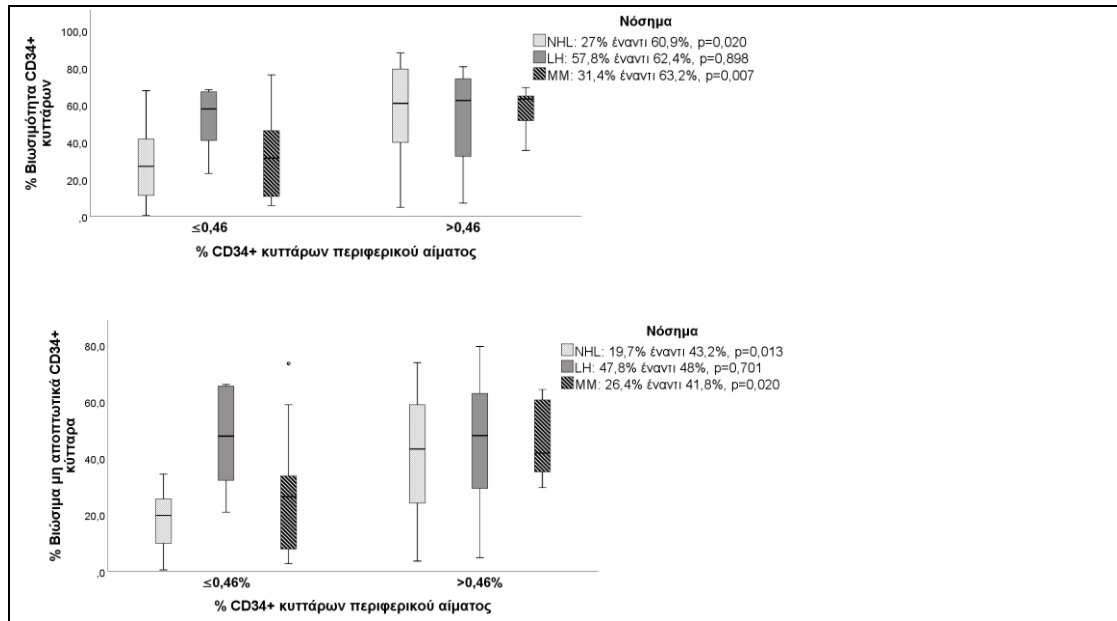
Εικόνα 3.18 Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων σε σχέση με το ποσοστό των CD34+ στο περιφερικό αίμα των ασθενών που κινητοποιήθηκαν με ή χωρίς χημειοθεραπεία

- Κανένας από τους ασθενείς που έλαβε Plerixafor δεν παρήγαγε CD34+ κύτταρα σε ποσοστό $>0,46\%$. Μεταξύ των ασθενών που δεν έλαβαν Plerixafor, οι 18 είχαν $\leq 0,46\%$ CD34+ κύτταρα στο περιφερικό αίμα ενώ οι 30 είχαν $>0,46\%$ και η διαφορά της % βιωσιμότητας και της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μεταξύ τους ήταν στατιστικά σημαντική (40,4% έναντι 62,9%, $p=0,018$ και 24,2% έναντι 43,1%, $p=0,019$, αντίστοιχα) (εικ. 3.19).



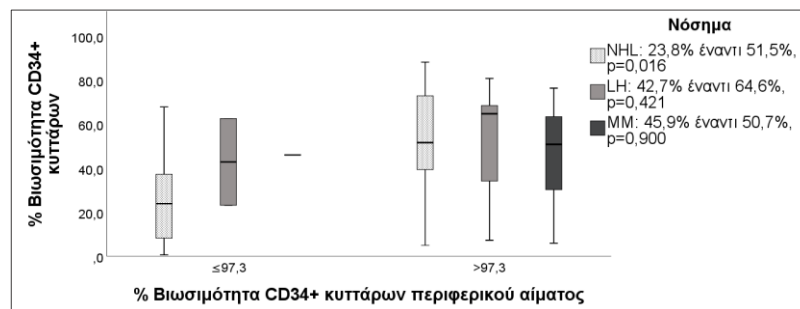
Εικόνα 3.19 Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων σε σχέση με το ποσοστό των CD34+ στο περιφερικό αίμα των ασθενών που κινητοποιήθηκαν με ή χωρίς τη χορήγηση Plerixafor.

- Στους ασθενείς με HL και διαφορετικό ποσοστό CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (6 με $\leq 0,46\%$ και 13 με $> 0,46\%$) η διαφορά της % βιωσιμότητας και της % «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων δεν ήταν στατιστικά σημαντική (57,8% έναντι 62,4%, $p=0,898$ και 47,8% έναντι 48%, $p=0,701$). Αντίθετα στους ασθενείς με BNL και διαφορετικό % CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (14 με $\leq 0,46\%$ και 8 με $> 0,46\%$) η διαφορά της % βιωσιμότητας και της % «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική (27% έναντι 60,9%, $p=0,02$ και 19,7% έναντι 43,2%, $p=0,013$). Ομοίως στους ασθενείς με MM, μεταξύ των οποίων οι 11 είχαν $\leq 0,46\%$ και οι 9 είχαν $> 0,46\%$, η διαφορά της % βιωσιμότητας και της % «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική (31,4% έναντι 63,2%, $p=0,07$ και 26,4% έναντι 41,8%, $p=0,02$) (εικ. 3.20)



Εικόνα 3.20 Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων σε σχέση με το ποσοστό των CD34+ στο περιφερικό αίμα στους ασθενείς με διαφορετικό νόσημα

Το ποσοστό βιώσιμων CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα δε σχετίζεται σημαντικά με την κινητοποίηση με ή χωρίς χημειοθεραπεία (με χημειοθεραπεία: 98,7% έναντι χωρίς χημειοθεραπεία: 96,6%, p=0,122), ή τη χορήγηση Plerixafor (με Plerixafor: 98,8% έναντι χωρίς Plerixafor: 97,8%, p=0,098), αλλά σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με το νόσημα (NHL: 97,6% έναντι HL και MM: 98,8%, p=0,027) (εικ. 3.21).



Εικόνα 3.21 Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων σε σχέση με τη βιωσιμότητά τους στο περιφερικό αίμα στους ασθενείς με διαφορετικό νόσημα

Πίνακας 3.15 Βιωσιμότητα και αποπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά της κινητοποίησης AAK

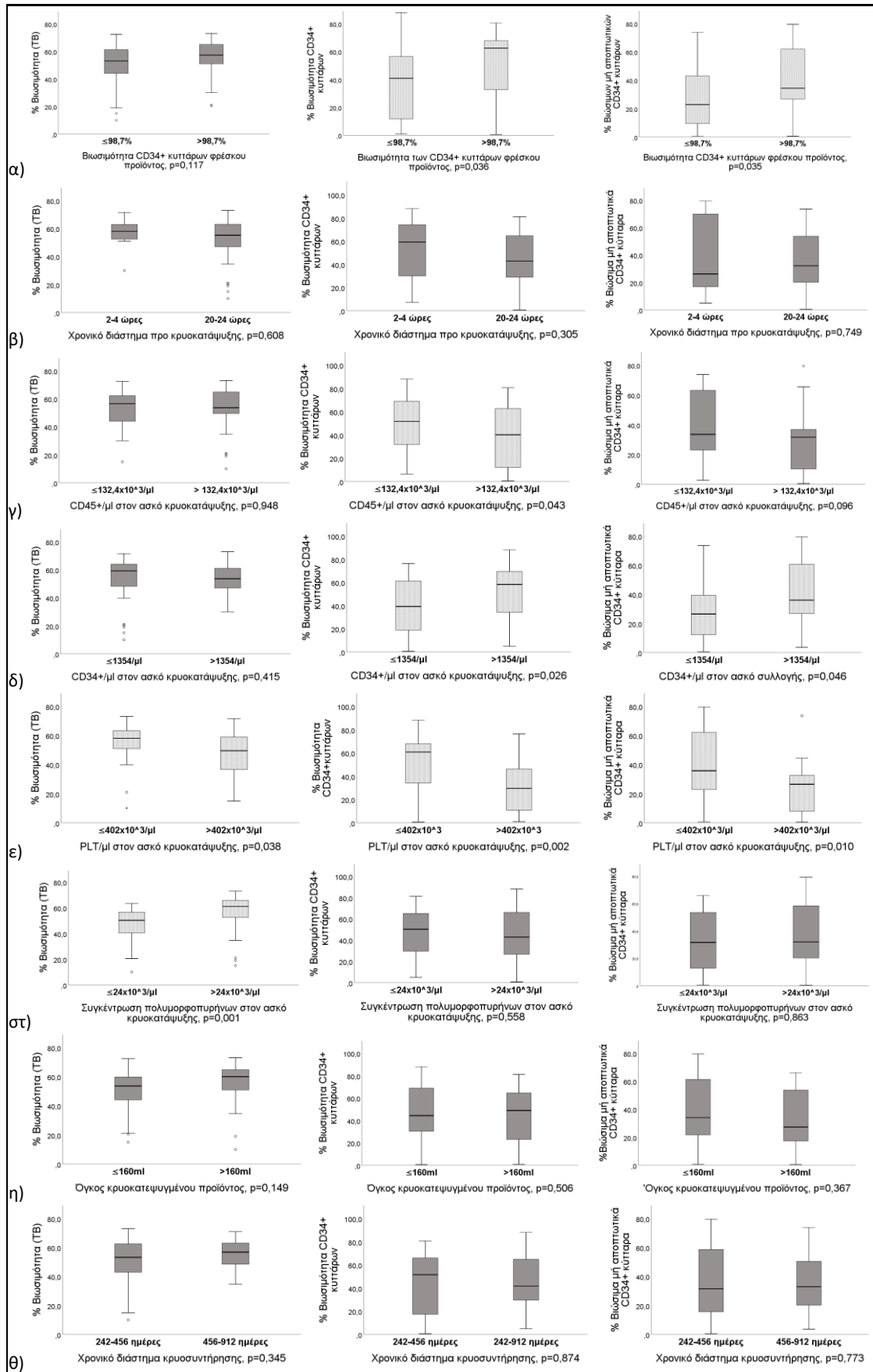
		% Βιωσιμότητα (TB)	% Βιώσιμα CD45+	% Βιώσιμα CD34+	% Αποπτωτικά CD45+	% Αποπτωτικά CD34+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD45+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+
Σχήμα κινητοποίησης	(-) Chemo	50,1 (19-71,5)	61,9 (13,4-71,7)	17,3 (0,9-31,4)	11,6 (0,9-23,4)	2,6 (0,4-4,6)	40,5 (9,6-70,8)	14,7 (0,5-26,8)
	(+) Chemo	56,5 (10-73)	61,7 (7,5-81,4)	48,9 (0,6-88)	8,4 (0,5-34,3)	6,1 (0-44,9)	53,4 (5,4-80,9)	33,6 (0,6-79,5)
	<i>p</i>	0,564	0,725	0,016	0,833	0,237	0,490	0,037
	(-) Plerixafor	54,8 (15-73)	60,1 (14,8-78,6)	51,1 (0,6-88)	8,3 (0,8-34,3)	5,1 (0-37,4)	52 (13,3-77,8)	35,6 (0,6-79,5)
	(+) Plerixafor	57 (10-69,4)	65,5 (7,5-81,4)	31,4 (0,9-67,7)	8,6 (0,5-23,4)	4,3 (0,4-44,9)	54,2 (5,4-80,9)	23,3 (0,5-66,1)
	<i>p</i>	0,937	0,685	0,036	0,698	0,705	0,685	0,026
Κινητοποίηση	Πτωχή	62 (19-69,4)	67,6 (13,4-73,5)	35,2 (0,9-67,7)	10,6 (0,6-17,2)	5,4 (0,4-44,9)	56,3 (9,6-67,7)	23 (0,5-34,4)
	Καλή	58,1 (10-73)	64,3 (7,5-81,4)	43,7 (0,6-76,2)	8,5 (0,5-34,3)	3,9 (0-37,4)	49,4 (5,4-80,9)	26,7 (0,6-73,5)
	Πολύ καλή	52,4 (20,5-72,4)	58,4 (31,9-73,9)	54 (4,9-88)	7,7 (0,9-24,3)	6,7 (0,3-31,8)	52,9 (14,7-70,7)	36,9 (3,6-79,5)
	<i>p</i>	0,250	0,533	0,136	0,729	0,882	0,683	0,072
%CD34+ περιφερικού αίματος, $r_{(s)}$				0.405, $p=0.001$				0.423, $p=0.001$
	≤0,46%	55,3 (10-71,5)	63,2 (7,5-81,4)	32,7 (0,6-76,2)	8,6 (0,5-34,3)	3,1 (0-44,9)	47,8 (5,4-80,9)	23,3 (0,5-73,5)
	>0,46%	55,5 (30-73)	60,9 (31,9-75)	62,9 (4,9-88)	8,3 (0,9-24,3)	7 (0,3-31,8)	53,8 (14,7-70,7)	43 (3,6-79,5)
	<i>p</i>	0,920	0,740	0,002	0,228	0,279	0,801	0,001
Βιωσιμότητα CD34+ αίματος	≤97,3%	56,1 (10-73)	61,1 (7,5-75)	24,1 (0,6-67,7)	2,9 (0,6-24,1)	3,1 (0-44,9)	51,9 (5,4-70,8)	21,5 (0,5-58,3)
	>97,3%	55,2 (15-72,4)	61,7 (14,8-81,4)	51,5 (4,9-88)	9 (0,5-34,3)	6,1 (0,1-31,8)	52,9 (13,4-80,9)	35,3 (2,7-79,5)
	<i>p</i>	0,830	0,656	0,009	0,046	0,401	0,952	0,001

Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του κρυοσυντηρημένου μοσχεύματος

- Η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων και το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη μειώνονται με την ελάττωση της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων στο προϊόν συλλογής πριν την κατάψυξη ($r_{(s)}=0,331$, $p=0,009$). Οι ασθενείς με % βιώσιμων CD34+ κυττάρων προ κατάψυξης $\leq 98,7\%$ είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων και πραγματικά βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη (40,9% έναντι 62,5%, $p=0,036$ και 22,9% έναντι 34,4%, $p=0,035$, αντίστοιχα) (εικ. 3.22α).
- Τα προϊόντα, που συντηρήθηκαν στους 4-8°C για 20-24 ώρες πριν τη βαθμιαία κρυοκατάψυξη, δεν παρουσίασαν διαφορές στα ποσοστά βιωσιμότητας σε σχέση με εκείνα, που κρυοκαταψύχθηκαν την ίδια ημέρα (εικ. 3.22β).
- Η αυξημένη συγκέντρωση των CD45+ κυττάρων στον κρυοκατεψυγμένο ασκό επηρέασε στατιστικά σημαντικά αρνητικά τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη ($r_{(s)}=-0,256$, $p=0,047$). Τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με συγκέντρωση CD45+ κυττάρων $\leq 132,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ είχαν βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 51,6% (εύρος 6,4-88) σε αντίθεση με εκείνα, που είχαν συγκέντρωση CD45+ κυττάρων $>132,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ και βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 40% (εύρος 0,6-80,6), διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0,043$) (εικ. 3.22γ).
- Η αυξημένη συγκέντρωση των CD34+ κυττάρων στον κρυοκατεψυγμένο ασκό επηρέασε στατιστικά σημαντικά θετικά τόσο τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων ($r_{(s)}=0,366$, $p=0,004$) όσο και το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη ($r_{(s)}=0,369$, $p=0,003$). Τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με συγκέντρωση CD34+ κυττάρων $>1354/\mu\text{l}$ είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 58,2% (εύρος 4,9-88) και ποσοστό «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων 36% (εύρος 3,6-79,5%) σε αντίθεση με εκείνα που είχαν συγκέντρωση CD34+ κυττάρων μικρότερη (39,2% και 26,4%, αντίστοιχα, $p=0,026$ και $p=0,046$ αντίστοιχα) (εικ. 3.22δ).

- Η αυξημένη συγκέντρωση των PLT στον κρυοκατεψυγμένο ασκό φαίνεται πως επιφέρει στατιστικά σημαντική μέτρια μείωση της βιωσιμότητας των TNC ($r_{(s)}=-0,295$, $p=0,021$), των CD45+ κυττάρων ($r_{(s)}=-0,365$, $p=0,004$) και των CD34+ κυττάρων ($r_{(s)}=-0,346$, $p=0,006$), όπως και του ποσοστού των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ και CD34+ κυττάρων ($r_{(s)}=-0,532$, $p<0,0005$ και $r_{(s)}=-0,260$, $p=0,043$ αντίστοιχα). Τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με συγκέντρωση $PLT\leq 402/\mu\text{l}$ είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά βιωσιμότητας των TNC (58% έναντι 49,5% $p=0,038$), των CD45+ κυττάρων (67,6% έναντι 55,9%, $p=0,001$) και των CD34+ κυττάρων (60,7% έναντι 29,5%, $p=0,002$). Τα ποσοστά απόπτωσης των CD34+ κυττάρων δεν επηρεάστηκαν από την συγκέντρωση των PLT σε αντίθεση με των CD45+ κυττάρων, τα οποία ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στα προϊόντα με $PLT\leq 402/\mu\text{l}$ (6,9% έναντι 15,4%, $p=0,029$). Τα ποσοστά των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ και CD34+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στα προϊόντα με $PLT\leq 402/\mu\text{l}$ (56% έναντι 38,5%, $p<0,0005$ και 35,7% έναντι 26,4%, $p=0,010$ αντίστοιχα) (εικ. 3.22ε).
- Η συγκέντρωση των PMN στους κρυοκατεψυγμένους ασκούς επηρέασε στατιστικά σημαντικά μόνο την βιωσιμότητα των TNC. Τα προϊόντα με $PMN>24\times 10^3/\mu\text{l}$ είχαν στατιστικά υψηλότερη βιωσιμότητα, όπως αυτή μετρήθηκε με TB (61% έναντι 50,2%, $p=0,001$) (εικ. 3.22στ). Σημαντική ήταν και η διαφορά των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων στα προϊόντα με $PMN>24\times 10^3/\mu\text{l}$ ή $PMN\leq 24\times 10^3/\mu\text{l}$ (3,4% έναντι 11,8%, αντίστοιχα, $p=0,044$).
- Ο όγκος του περιεχομένου του κρυοκατεψυγμένου ασκού δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυτταρικών πληθυσμών (εικ. 3.22ζ).
- Η διάρκεια της κρυοσυντήρησης, δηλαδή το χρονικό διάστημα κατά το οποίο τα προϊόντα παρέμειναν κρυοκατεψυγμένα έως τη μέτρηση της βιωσιμότητας, δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυτταρικών πληθυσμών (εικ. 3.22η).

Η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής δε σχετίζεται με τη βιωσιμότητά τους στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής ($p=0,717$). Η τελική συγκέντρωση των CD34+ στον ασκό σχετίζεται δυναμικά με το ποσοστό τους στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής ($r=0,739$, $p<0,0005$).



Εικόνα 3.22 Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά της κρυσσυντήρησης

Πίνακας 3.16 Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του κρυσυντηρημένου μοσχεύματος

	% Βιωσιμότητα (TB)	% Βιώσιμα CD45+	% Βιώσιμα CD34+	% Αποπτωτικά CD45+	% Αποπτωτικά CD34+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD45+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+
% Βιωσιμότητα CD34+ προϊόντος προ κατάψυξης, $r_{(s)}$	0,326, $p=0,010$	0,205, $p=0,112$	0,331, $p=0,009$	0,172, $p=0,185$	0,102, $p=0,436$	0,139, $p=0,281$	0,282, $p=0,028$
≤98,7%	53 (10-72.4)	59.1 (7.5-81.4)	40.9 (0.9-88)	9.3 (0.5-34.3)	6.4 (0.1-27.4)	46.4 (5.4-80.9)	22.9 (0.5-73.5)
>98,7%	57.3 (20.5-73)	63.6 (15-75.9)	62.5 (0.6-80.6)	7.9 (0.9-24.3)	4.1 (0-44.9)	55.2 (13.3-74.1)	34.4 (0.6-79.5)
p	0,117	0,209	0,036	0,778	0,983	0,162	0,035
Συντήρηση προ κατάψυξης							
2-4h	58 (30-71,5)	61,1 (34,5-81,4)	59,2 (7,2-88)	7,9 (0,5-21,5)	8,2 (0,7-44,9)	56 (14,7-80,9)	26,2 (5-79,5)
20-24h	55,2 (10-73)	61,7 (7,5-78,6)	42,8 (0,6-81,1)	8,4 (0,6-34,3)	4,3 (0-37,4)	51,4 (5,4-77,8)	32,2 (0,5-73,5)
p	0,608	0,898	0,305	0,579	0,631	0,601	0,749
CD45+/μl, $r_{(s)}$				-0,256, $p=0,047$			
≤132,4x10³/μl	56,5 (15-72,4)	61,7 (14,8-81,4)	51,6 (6,4-88)	9,3 (0,5-34,3)	4,1 (0,1-37,4)	47,8 (13,4-80,9)	33,6 (2,7-73,8)
>132,4x10³/μl	53,6 (10-73)	61,7 (7,5-75,9)	40 (0,6-80,6)	6,6 (0,6-19,7)	4,4 (0-44,9)	54,5 (5,4-74,1)	31,6 (0,5-79,5)
p	0,948	0,751	0,043	0,080	0,319	0,735	0,096
CD34+/μl, $r_{(s)}$			0,366, $p=0,004$				0,369, $p=0,003$
≤1354/μl	59,2 (10-71,5)	66,5 (7,5-81,4)	39,2 (0,6-76,2)	4,7 (0,5-24,1)	3,1 (0-44,9)	54,2 (5,4-80,9)	26,4 (0,5-73,5)
>1354/μl	53,6 (30-73)	58,9 (31.9-75)	58,2 (4.9-88)	8,8 (0,9-34,3)	8 (0,3-31,8)	49,9 (14,7-70,7)	36 (3,6-79,5)
p	0,415	0,444	0,026	0,057	0,132	0,323	0,046
PLT/μl, $r_{(s)}$	-0,295, $p=0,021$	-0,365, $p=0,004$	-0,346, $p=0,006$	0,409, $p=0,001$		-0,532, $p<0,0005$	-0,260, $p=0,043$
≤402x10³/μl	58 (10-73)	67,6 (7,5-81,4)	60,7 (0,6-88)	6,9 (0,5-24,1)	6,9 (0-44,9)	56 (5,4-80,9)	35,7 (0,6-79,5)

Πίνακας 3.16 Βιωσιμότητα και απόπτωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του κρουσυντηρημένου μοσχεύματος

	% Βιωσιμότητα (TB)	% Βιώσιμα CD45+	% Βιώσιμα CD34+	% Αποπτωτικά CD45+	% Αποπτωτικά CD34+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD45+	% Βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+
>402x10³/μl	49,5 (15-71,50)	55,9 (13,4-72,1)	29,5 (0,9-34,3)	15,4 (0,9-34,3)	2,8 (0,4-26,3)	38,5 (9,6-70,8)	26,4 (9,5-73,5)
<i>p</i>	0,038	0,001	0,002	0,029	0,308	<0,0005	0,010
PMN/μl, r_(s)	0,469, <i>p</i> <0,0005						
≤24x10³/μl	50,2 (10-63)	58,3 (7,5-81,4)	50,2 (5-81,1)	7,3 (0,5-24,3)	11,8 (0,3-37,4)	46,3 (5,4-80,9)	31,8 (0,7-66,1)
>24x10³/μl	61 (15-73)	64,1 (13,4-78,6)	42,8 (0,6-88)	8,6 (0,6-34,3)	3,7 (0-44,9)	55,6 (9,6-77,8)	32,2 (0,5-79,5)
<i>p</i>	0,001	0,241	0,558	0,636	0,044	0,210	0,863
Όγκος ασκού, ml							
≤160	53,6 (15-72,4)	58 (14,8-75,9)	44,3 (0,6-88)	8,3 (0,9-34,3)	4,1 (0-31,80)	46,2 (13,3-74,1)	34 (0,6-79,5)
>160	60 (10-73)	67,1 (7,5-81,4)	48,9 (0,9-81,1)	8,4 (0,5-24,1)	4,3 (0,1-44,9)	56,1 (5,4-80,9)	27,3 (0,5-66,1)
<i>p</i>	0,149	0,110	0,506	0,440	0,862	0,091	0,367
Διάρκεια κρουσυντήρησης							
242-456 ημέρες	53,2 (10-73)	59,1 (7,5-81,4)	51,5 (0,6-80,6)	6 (0,5-24,3)	4,1 (0-44,9)	47,8 (5,4-80,9)	31,5 (0,5-79,5)
456 - 912 ημέρες	56,8 (34,6-70,9)	62,9 (31,9-73,9)	41,6 (4,9-88)	10,1 (1,1-34,3)	6,2 (0,3-31,7)	53,8 (20,2-70,7)	32,9 (3,6-73,8)
<i>p</i>	0,345	0,891	0,874	0,132	0,762	0,914	0,773
Σύνολο	55,3 (10-73)	61,7 (7,5-81,4)	45,9 (0,6-88)	8,4 (0,5-34,3)	4,3 (0-44,9)	52,9 (5,4-80,9)	32,2 (0,5-79,5)

Οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες για τη βιωσιμότητα και την “πραγματική βιωσιμότητα» των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη, οι οποίοι προέκυψαν κατά την μονοπαραγοντική ανάλυση, μετά την ανάλυση και των μεταξύ τους συσχετίσεων, υποβλήθηκαν σε πολυπαραγοντική ανάλυση. Οι παράγοντες αυτοί ήταν α) η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα προ συλλογής ($\leq 97,3\%$ ή $>97,3\%$), β) η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν της συλλογής ($\leq 98,7\%$ ή $>98,7\%$), γ) η τελική συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στους ασκούς κρουκατάψυξης ($\leq 1354/\mu\text{L}$ ή $>1354/\mu\text{L}$), και δ) η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων στους ασκούς κρουκατάψυξης ($>402 \times 10^3/\mu\text{L}$ ή $>402 \times 10^3/\mu\text{L}$). Η εισαγωγή των παραμέτρων έγινε ιεραρχικά με βάση την πληροφορία, που είναι γνωστή σε κάθε φάση της AMMO, δηλαδή πρώτα (Block 1) εισήχθη η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα προ συλλογής, και έπειτα (Block 2) εισήχθησαν η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν της συλλογής, η τελική συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στους ασκούς κρουκατάψυξης και η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων στους ασκούς κρουκατάψυξης.

Η επίδραση των παραπάνω παραγόντων στη βιωσιμότητα και στην “πραγματική βιωσιμότητα» των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη έγινε σε δυο διαφορετικές αναλύσεις (Model 1 και Model 2, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων περιγράφονται στην εκτύπωση του Model Summary. Οι δυο αναλύσεις έδειξαν πως:

α) βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής $\leq 97,3\%$ σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα και «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο αποψυγμένο προϊόν, όπως μετρήθηκαν με FACS ($p=0,024$ και $0,006$, αντίστοιχα),

β) βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο προϊόν συλλογής πριν την κατάψυξη $\leq 98,7\%$ σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα και «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο αποψυγμένο προϊόν, όπως μετρήθηκαν με FACS ($p=0,020$ και $0,036$, αντίστοιχα), και

γ) τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης $>402 \times 10^3/\mu\text{L}$ σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα και «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο αποψυγμένο προϊόν, όπως μετρήθηκαν με FACS ($p=0,001$ και $0,004$, αντίστοιχα).

Model Summary					
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	
1	,597 ^a	,356	,310	20,5186	

a. Predictors: (Constant), Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος, Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος, Συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στον ασκό κρουοκατάψυξης, Συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουοκατάψυξης

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	13036,124	4	3259,031	7,741	,000 ^b
	Residual	23576,793	56	421,014		
	Total	36612,917	60			

a. Dependent Variable: % βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων (FACS)
b. Predictors: (Constant), Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος, Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος, Συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στον ασκό κρουοκατάψυξης, Συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουοκατάψυξης

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		Sig.
		B	Std. Error	Beta	t	
1	(Constant)	29,243	6,251		4,678	,000
	Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (≤97,3% ή >97,3%)	15,727	6,791	,270	2,316	,024
	Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (≤98,7% ή >98,7%)	12,658	5,270	,258	2,402	,020
	Συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στον ασκό κρουοκατάψυξης (≤1354/μl ή >1354/μl)	6,992	5,722	,143	1,222	,227
	Συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουοκατάψυξης (≤402x103/μl ή >402x103/μl)	-20,283	5,716	-,383	-3,548	,001

a. Dependent Variable: % βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων (FACS)

Model Summary					
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	
2	,572 ^a	,327	,279	18,9621	

a. Predictors: (Constant), Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος, Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος, Συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στον ασκό κρουοκατάψυξης, Συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουοκατάψυξης

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
2	Regression	9795,759	4	2448,940	6,811	,000 ^b
	Residual	20135,516	56	359,563		
	Total	29931,274	60			

a. Dependent Variable: % «πραγματική» βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων (FACS)
b. Predictors: (Constant), Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος, Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος, Συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στον ασκό κρουοκατάψυξης, Συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουοκατάψυξης

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		Sig.
		B	Std. Error	Beta	t	
2	(Constant)	18,957	5,777		3,281	,002
	Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (≤97,3% ή >97,3%)	17,953	6,276	,341	2,861	,006
	Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (≤98,7% ή >98,7%)	10,454	4,870	,236	2,146	,036
	Συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στον ασκό κρουοκατάψυξης (≤1354/μl ή >1354/μl)	3,786	5,288	,085	,716	,477
	Συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουοκατάψυξης (≤402x103/μl ή >402x103/μl)	-15,997	5,282	-,334	-3,028	,004

a. Dependent Variable: % «πραγματική» βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων (FACS)

3.4.5 Επίδραση της βιωσιμότητας και της απόπτωσης στην έκβαση της AMMO

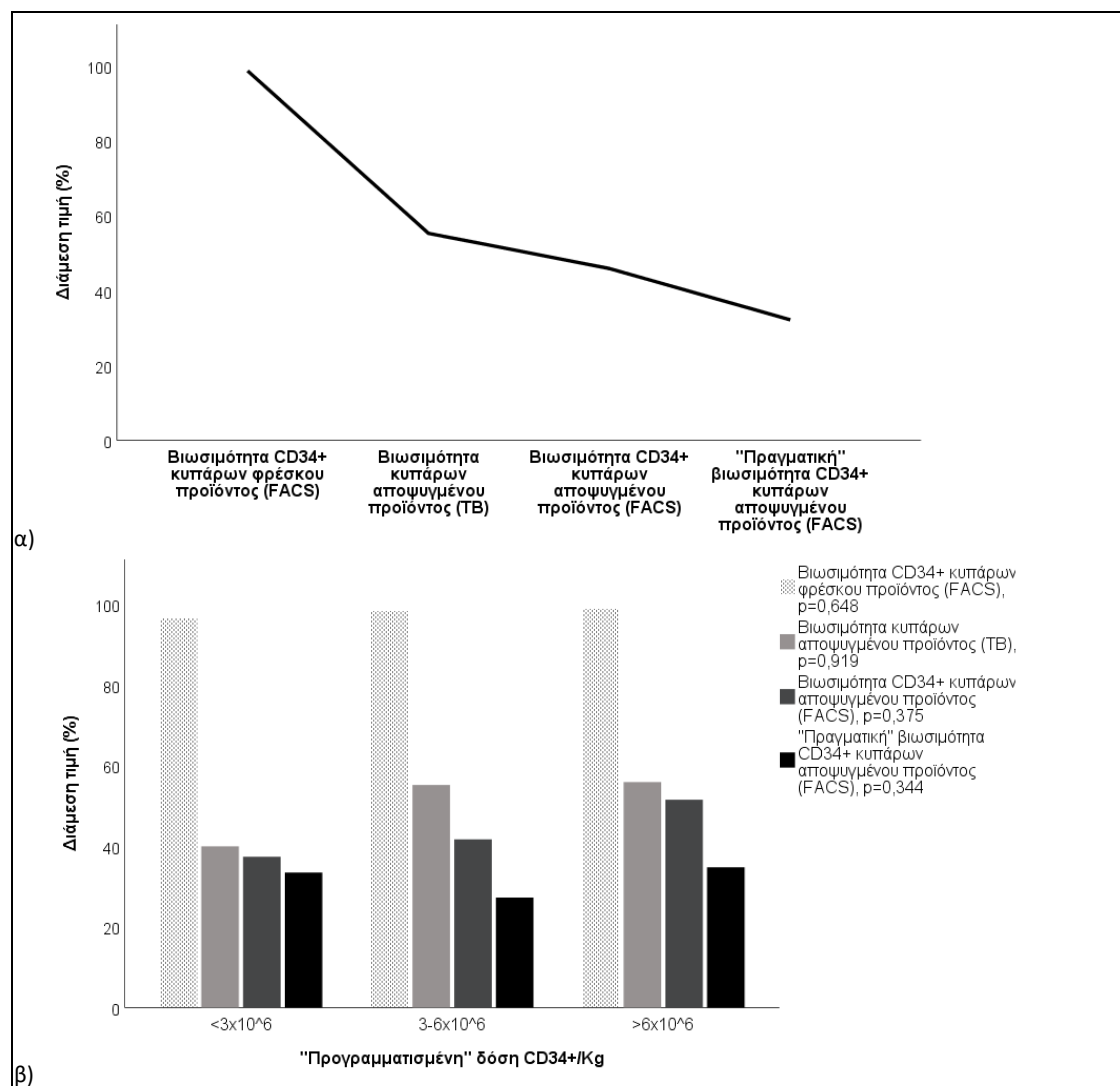
Επίδραση της βιωσιμότητας και της απόπτωσης στον τελικό αριθμό των ΑΑΚ που εγχύθηκαν στην AMMO

Ο αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg βάρους σώματος, που «προγραμματίζεται» ως επαρκής δόση προς έγχυση στην AMMO, προκύπτει από τον αριθμό τους, όπως αυτός καταμετρείται με κυτταρομετρία ροής στο φρέσκο προϊόν συλλογής, πριν την κρουσυντήρηση. Η διάμεση τιμή της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων του φρέσκου προϊόντος στο σύνολο των ασθενών ήταν 98,7% (εύρος 87,9-99,7%). Η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων των φρέσκων προϊόντων των ασθενών, που έλαβαν «προγραμματισμένη» δόση $<3 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, ήταν 96,4%, των ασθενών που έλαβαν $3-6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα ήταν 98,4%, και των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα ήταν 98,7%. Οι παραπάνω διαφορές στα ποσοστά βιωσιμότητας των φρέσκων προϊόντων στις τρεις ομάδες ασθενών με βάση την «προγραμματισμένη» δόση δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,648$) (Πίνακας 3.17, εικ.3.23).

Η διάμεση τιμή της βιωσιμότητας των αντίστοιχων προϊόντων μετά την απόψυξη, όπως μετρήθηκε στο αιμοκυτταρόμετρο με χρώση με Trypan Blue, ήταν 55,3% (εύρος 10-73%) στο σύνολο των ασθενών, 40% στους ασθενείς που έλαβαν «προγραμματισμένη» δόση $<3 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, 55,2% στους ασθενείς που έλαβαν $3-6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, και 55,9% στους ασθενείς που έλαβαν $>6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, όχι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών ($p=0,919$) (εικ.3.24α). Η μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με το φρέσκο προϊόν ήταν της τάξεως του 52,8% (διάμεση τιμή, εύρος 34,5-71,1%), 40,9% (διάμεση τιμή, εύρος 25,2-88,1%) και 42,4% (διάμεση τιμή, εύρος 26,2-75,8%) για κάθε ομάδα ασθενών αντίστοιχα, όχι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p=0,943$) (Πίνακας 3.17, εικ. 3.23 και 3.24δ).

Η διάμεση τιμή της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη, όπως μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής, ήταν 45,9% (εύρος 0,6-88%) στο σύνολο των ασθενών, 37,4% στους ασθενείς που έλαβαν $<3 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, 41,7% στους ασθενείς που έλαβαν $3-6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, και 51,5% στους ασθενείς που έλαβαν $>6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, όχι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές

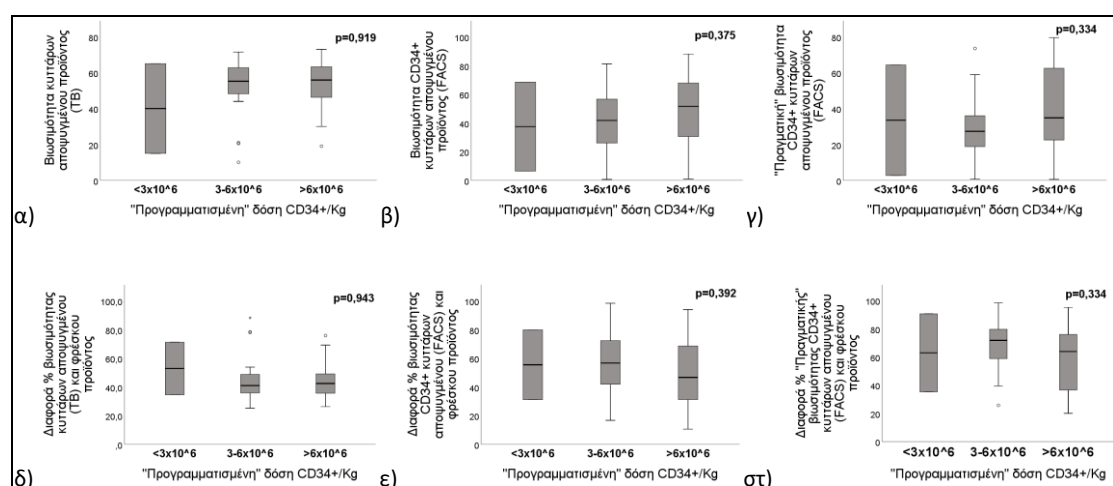
μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών ($p=0,375$) (εικ. 3.24β). Η μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με το φρέσκο προϊόν ήταν της τάξεως του 55,4% (διάμεση τιμή, εύρος 31,1-79,7%), 56,6% (διάμεση τιμή, εύρος 16,7-98,3%) και 46,6% (διάμεση τιμή, εύρος 10,6-93,9%) για κάθε ομάδα ασθενών αντίστοιχα, όχι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p=0,392$). Παρατηρήθηκε μικρότερη μείωση της βιωσιμότητας των κυτταρικών προϊόντων των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6/\text{Kg}$ CD34+ κύτταρα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών, χωρίς στατιστική σημασία (Πίνακας 3.17, εικ. 3.23 και 3.24ε).



Εικόνα 3.23 Μεταβολή της βιωσιμότητας του κυτταρικού προϊόντος μετά την κρυοσυντήρηση και απόψυξη.

Η διάμεση τιμή της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη, όπως μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής, ήταν 32,2% (0,5-79,5%) στο

σύνολο των ασθενών, 33,5% στους ασθενείς που έλαβαν $<3 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, 27,3% στους ασθενείς που έλαβαν $3-6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, και 34,8% στους ασθενείς που έλαβαν $>6 \times 10^6$ /Kg CD34+ κύτταρα, όχι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών ($p=0,334$) (εικ. 3.24γ). Η μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με το φρέσκο προϊόν ήταν της τάξεως του 62,9% (διάμεση τιμή, εύρος 35,2-90,6%), 71,7% (διάμεση τιμή, εύρος 25,7-98,3%) και 63,9% (διάμεση τιμή, εύρος 20-95,1%) για κάθε ομάδα ασθενών αντίστοιχα, όχι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p=0,334$) (εικ. 3.24στ). Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων σε κάθε ομάδα ασθενών ήταν 3,9% (διάμεση τιμή, εύρος: 3,7-4,1%), 6,7% (διάμεση τιμή, εύρος: 0-37,4%) και 4,3% (διάμεση τιμή, εύρος: 0,3-44,9%), αντίστοιχα, όχι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές ($p=0,794$) (Πίνακας 3.17).

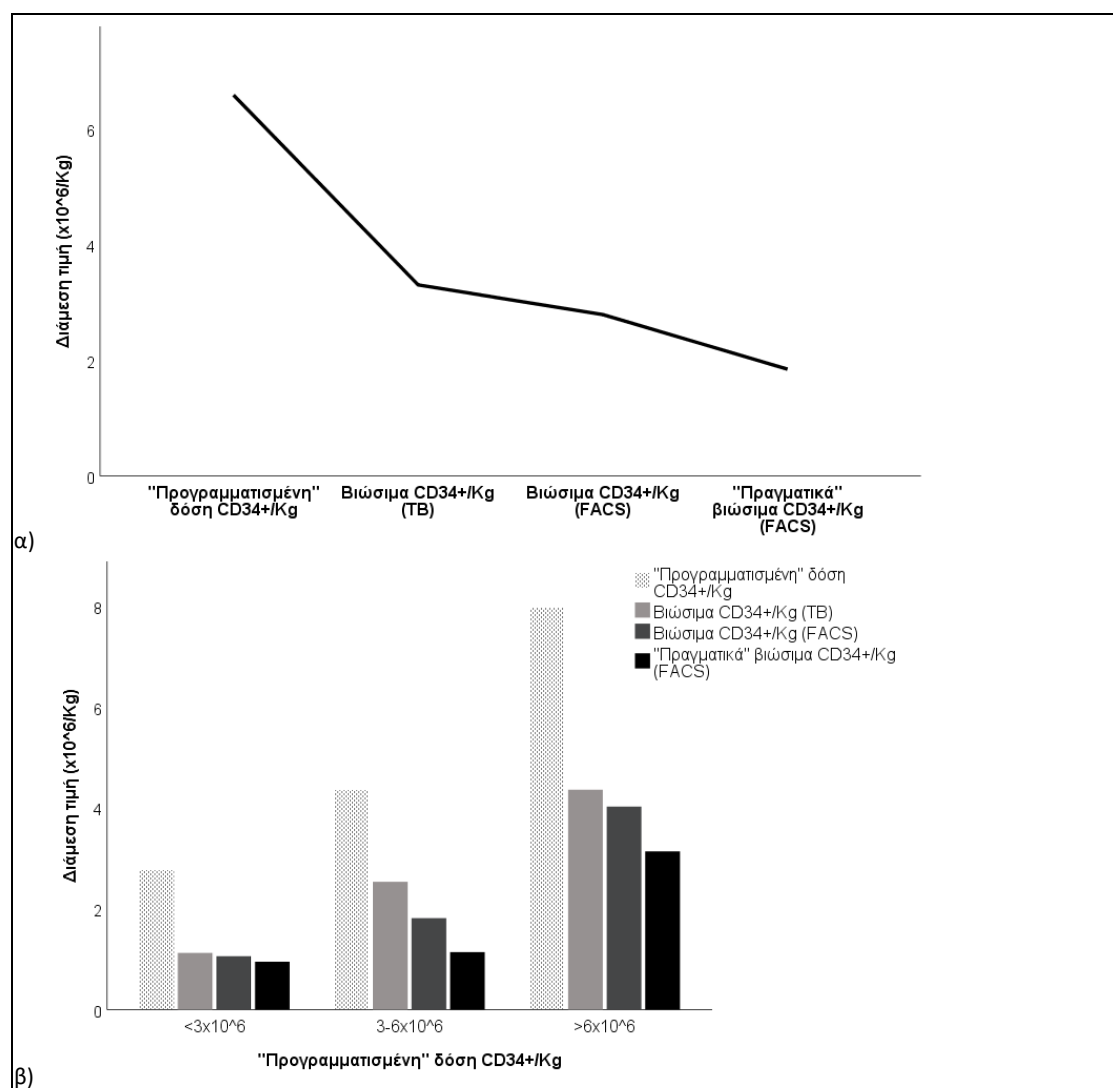


Εικόνα 3.24 Η βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων και η μεταβολή της μετά την κρυοσυντήρηση και την απόψυξη στις τρεις ομάδες ασθενών με βάση την «προγραμματισμένη» δόση AAK στην AMMO.

Η μείωση της βιωσιμότητας των κρυοκατεψυγμένων κυτταρικών προϊόντων είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των «πραγματικών» δόσεων των AAK, που χορηγήθηκαν στην AMMO, σε σχέση με τις «προγραμματισμένες» δόσεις, όπως αυτές είχαν υπολογισθεί με καταμέτρηση των CD34+ κυττάρων στα φρέσκα προϊόντα (εικ. 3.25).

Με βάση τη μέτρηση της βιωσιμότητας στο αιμοκυτταρόμετρο με χρώση με Trypan Blue, οι ασθενείς που θα λάμβαναν $2,7-2,9 \times 10^6$ CD34+/Kg έλαβαν τελικά $1,1 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-1,8 \times 10^6$ CD34+/Kg), οι ασθενείς που θα

λάμβαναν $3-6 \times 10^6$ CD34+/Kg έλαβαν τελικά $2,5 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-3,3 \times 10^6$ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που θα λάμβαναν $6,1-12,5 \times 10^6$ CD34+/Kg έλαβαν τελικά $4,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $1,2-6,8 \times 10^6$ CD34+/Kg) (εικ. 3.26α). Οι διάμεσες τιμές των διαφορών μεταξύ των δόσεων των CD34+ κυττάρων, που προγραμματίσθηκαν και των δόσεων, που τελικά εγχύθηκαν, ήταν $1,6 \times 10^6$ CD34+/Kg (εύρος: $1-2,3 \times 10^6$ CD34+/Kg), $1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (εύρος: $1,1-4 \times 10^6$ CD34+/Kg), και $3,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (εύρος: $1,7-7,4 \times 10^6$ CD34+/Kg), αντίστοιχα για κάθε ομάδα ασθενών (πίνακας 3.17, εικ. 3.26δ).

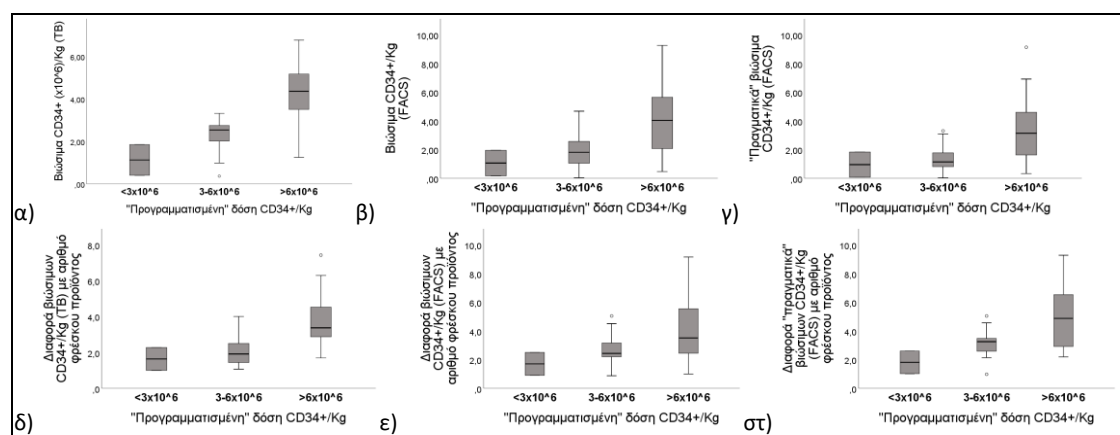


Εικόνα 3.25 Μεταβολή του αριθμού των CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν στην AMMO βάσει μεταβολής βιωσιμότητας

Με βάση τη μέτρηση της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής, οι ασθενείς που θα λάμβαναν $2,7-2,9 \times 10^6$ CD34+/Kg έλαβαν τελικά $1,2 \times 10^6$

CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,2-1,9x10⁶ CD34+/Kg), οι ασθενείς που θα λάμβαναν 3-6x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 1,8x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,03-4,7x10⁶ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που θα λάμβαναν 6,1-12,5x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 4x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,5-9,3x10⁶ CD34+/Kg) (εικ. 3.26β). Οι διάμεσες τιμές των διαφορών μεταξύ των δόσεων των CD34+ κυττάρων, που προγραμματίστηκαν και των δόσεων, που τελικά εγχύθηκαν ήταν 1,7x10⁶ CD34+/Kg (εύρος: 0,9-2,5x10⁶ CD34+/Kg), 2,4x10⁶ CD34+/Kg (εύρος: 0,9-5x10⁶ CD34+/Kg), και 3,5x10⁶ CD34+/Kg (εύρος: 1-9,1x10⁶ CD34+/Kg), αντίστοιχα για κάθε ομάδα ασθενών (πίνακας 3.17, εικ. 3.26ε).

Με βάση τη μέτρηση της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής, οι ασθενείς που θα λάμβαναν 2,7-2,9x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 0,9x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,1-1,8x10⁶ CD34+/Kg), οι ασθενείς που θα λάμβαναν 3-6x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 1,1x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,03-3,3x10⁶ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που θα λάμβαναν 6,1-12,5x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 3,1x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,3-9,1x10⁶ CD34+/Kg) (εικ. 3.26γ). Οι διάμεσες τιμές των διαφορών μεταξύ των δόσεων των CD34+ κυττάρων που προγραμματίστηκαν και των δόσεων που τελικά εγχύθηκαν ήταν 1,8x10⁶ CD34+/Kg (εύρος: 1-2,6x10⁶ CD34+/Kg), 3,2x10⁶ CD34+/Kg (εύρος: 1-5x10⁶ CD34+/Kg), και 4,9x10⁶ CD34+/Kg (εύρος: 2,2-9,3x10⁶ CD34+/Kg), αντίστοιχα για κάθε ομάδα ασθενών (πίνακας 3.17, εικ. 3.26στ).



Εικόνα 3.26 Αριθμός βιώσιμων CD34+/Kg κυττάρων που εγχύθηκαν ανά ομάδα ασθενών με βάση τον προγραμματισμένο αριθμό προς έγχυση

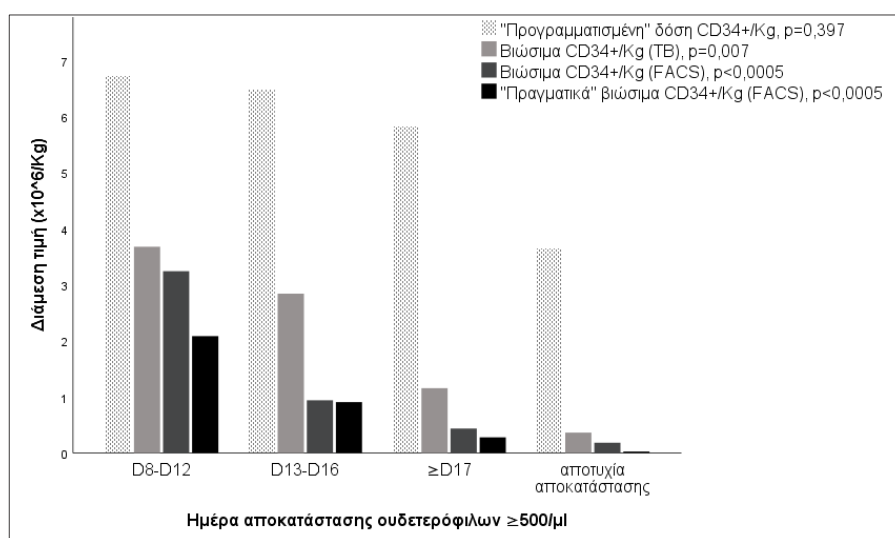
Πίνακας 3.17 Μεταβολή της βιωσιμότητας του κυτταρικού προϊόντος μετά την κρυσσαίνηση και την απόψυξη

Φρέσκο προϊόν		Αποψυγμένο προϊόν							
«Προγραμματισμένη» δόση CD34+(x10 ⁶)/Kg στην ΑΜΜΟ	% Βιωσιμότητα	Διάμεση τιμή (εύρος)				Αριθμός CD34+(x10 ⁶)/Kg Διάμεση τιμή (εύρος)			
Κατηγορία	Διάμεση τιμή (εύρος)	Διάμεση τιμή (εύρος)	% Βιωσιμότητα (TB)	% Βιώσιμα CD34+ (FACS)	% «Πραγματικά» βιώσιμα CD34+ (FACS)	% Αποπτωτικά CD34+	Βιώσιμα (TB)	Βιώσιμα (FACS)	«Πραγματικά» βιώσιμα (FACS)
<3x10 ⁶ /Kg	2,8 (2,7-2,9)	96,4 (93,3-99,5)	40 (15-65)	37,4 (6,4-68,4)	33,5 (2,7-64,3)	3,9 (3,7-4,1)	1,1 (0,4-1,8)	1,2 (0,2-1,9)	0,9 (0,1-1,8)
3-6x10 ⁶ /Kg	4,3 (3,1-5,8)	98,4 (87,9-99,7)	55,2 (10-71,5)	41,7 (0,6-81,1)	27,3 (0,6-73,5)	6,7 (0-37,4)	2,5 (0,4-3,3)	1,8 (0,03-4,7)	1,1 (0,03-3,3)
>6x10 ⁶ /Kg	8 (6,1-12,5)	98,7 (88,4-99,5)	55,9 (19-73)	51,5 (0,9-88)	34,8 (0,5-79,5)	4,3 (0,3-44,9)	4,4 (1,2-6,8)	4 (0,5-9,3)	3,1 (0,3-9,1)
		p=0,648	p=0,919	p=0,375	p=0,344	p=0,794			
Σύνολο ασθενών	6,6 (2,7-12,50)	98,7 (87,9-99,7)	55,3 (10-73)	45,9 (0,6-88)	32,2 (0,5-79,5)	4,3 (0-44,9)	3,3 (0,4-6,8)	2,8 (0,03-9,3)	1,8 (0,03-9,1)
Διαφορά % βιωσιμότητας φρέσκου και αποψυγμένου προϊόντος						Διαφορά αριθμού βιώσιμων CD34+(x10⁶)/Kg φρέσκου και αποψυγμένου προϊόντος			
			Μέτρηση με TB	Μέτρηση με FACS	Μέτρηση με FACS		TB	FACS	FACS (Annexin)
<3x10 ⁶ /Kg			52,8 (34,5-71,1)	55,4 (31,1-79,7)	62,9 (35,2-90,6)		1,6 (1-2,3)	1,7 (0,9-2,5)	1,8 (1-2,6)
3-6x10 ⁶ /Kg			40,9 (25,2-88,1)	56,6 (16,7-98,3)	71,7 (25,7-98,3)		1,9 (1,1-4)	2,4 (0,9-5)	3,2 (1-5)
>6x10 ⁶ /Kg			42,4 (26,2-75,8)	46,6 (10,6-93,9)	63,9 (20-95,1)		3,4 (1,7-7,4)	3,5 (1,0-9,1)	4,9 (2,2-9,3)
			p=0,943	p=0,392	p=0,334				
Σύνολο ασθενών			42,1 (25,2-88,1)	51 (10,6-98,3)	67,3 (20-98,3)		2,9 (1-7,4)	2,8 (0,9-9,1)	3,5 (1-9,3)

Επίδραση της βιωσιμότητας και της απόπτωσης στη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση της αιμοποίησης

Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων

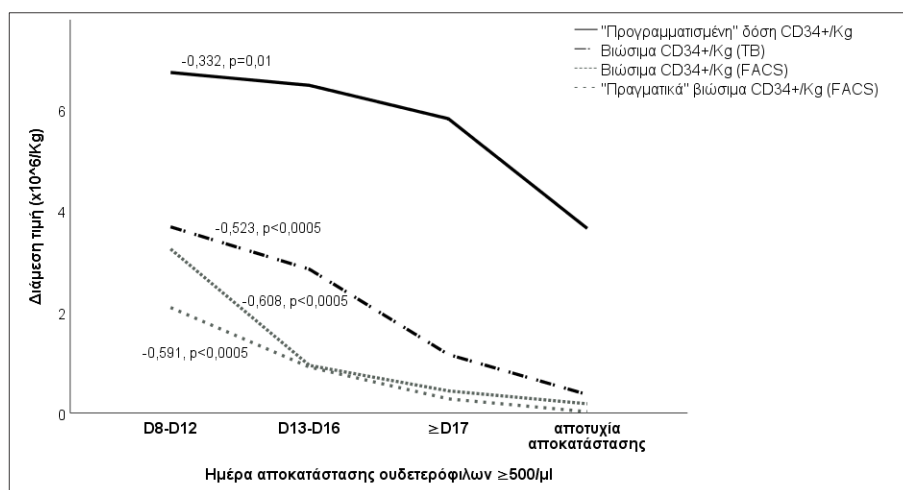
Η διάμεση τιμή του αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg («προγραμματισμένη» δόση, βάσει της μέτρησης του αριθμού των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν) που έλαβαν οι ασθενείς, οι οποίοι είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, ήταν $6,7 \times 10^6/\text{Kg}$ (εύρος $2,9-12,57 \times 10^6/\text{Kg}$), εκείνων που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D13 και D16 ήταν $6,5 \times 10^6/\text{Kg}$ (εύρος $3,6-9,6 \times 10^6/\text{Kg}$), και εκείνων που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D17 και D30 ήταν $5,8 \times 10^6/\text{Kg}$ (εύρος $2,7-8,8 \times 10^6/\text{Kg}$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε $3,6 \times 10^6/\text{Kg}$ (πίνακας 3.18, εικ. 3.27).



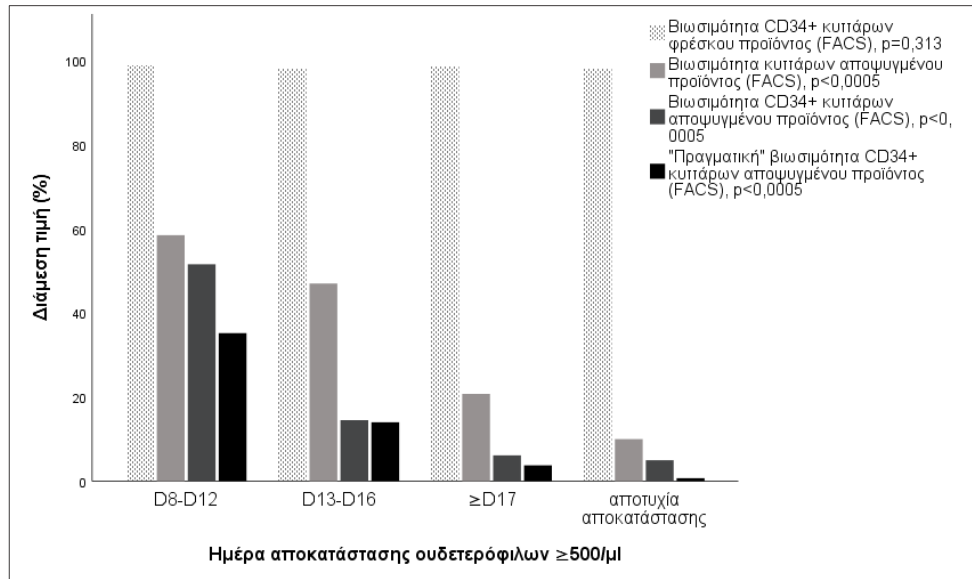
Εικόνα 3.27 Διάμεση τιμή δόσης CD34+/Kg σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων

Οι διαφορές στη δόση των AAK μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,397$), παρότι η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση του αριθμού των AAK, που εγχύθηκαν, και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων ($r=-0,332$, $p=0,010$) (Πίνακας 3.18, εικ. 3.28).

Οι διαφορές στη βιωσιμότητα των φρέσκων προϊόντων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,313$), ενώ αντίθετα οι διαφορές στη βιωσιμότητα των αποψυγμένων προϊόντων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν και με τις τρεις μεθόδους, δηλαδή με τη μέτρηση της βιωσιμότητας με χρώση με Trypan blue, και της βιωσιμότητας και της «πραγματικής» βιωσιμότητας με κυτταρομετρία ροής, ήταν στατιστικά σημαντικές ($p<0,0005$ και στις τρεις περιπτώσεις). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς, που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, είχαν βιωσιμότητα ίση με 58% (εύρος 30-73%), 51,6% (εύρος 11,4-88%) και 35,2 (εύρος 4,8-79,5%), όπως μετρήθηκαν με κάθε μια από τις μεθόδους, αντίστοιχα. Οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D13 και D16, είχαν βιωσιμότητα ίση με 47% (εύρος 34,6-62,5%), 14,5% (εύρος 4,9-63,2%) και 14 (εύρος 3,6-38,5%), αντίστοιχα. Οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D17 και D30, είχαν βιωσιμότητα ίση με 20,8% (εύρος 15-51%), 6,1% (εύρος 0,6-10,1%) και 3,7 (εύρος 0,5-7,3%), αντίστοιχα. Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων είχε βιωσιμότητα ίση με 10%, 5% και 0,7%, αντίστοιχα για κάθε μέθοδο (Πίνακας 3.18, εικ. 3.29).

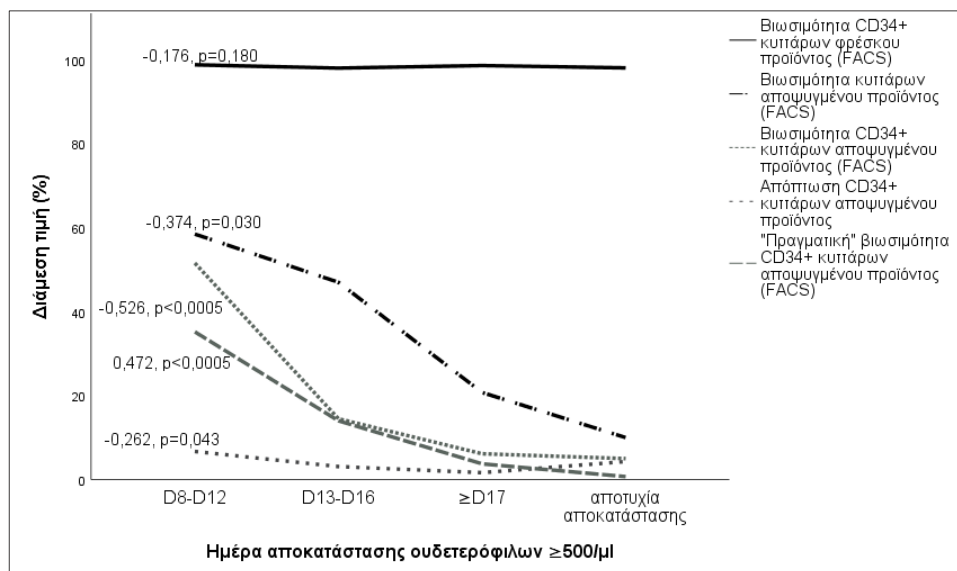


Εικόνα 3.28 Συσχέτιση της διάμεσης τιμής της δόσης CD34+/Kg σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων



Εικόνα 3.29 Διάμεση τιμή βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων

Οι διαφορές στα ποσοστά των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,114$), παρότι η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση του ποσοστού απόπτωσης των CD34+ κυττάρων και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων ($r=-262$, $p=0,043$) (Πίνακας 3.18, εκ. 3.30).



Εικόνα 3.30 Συσχέτιση της διάμεσης τιμής της βιωσιμότητας των CD34+ σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων

Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση του βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν, όπως αυτός

προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της βιωσιμότητας με χρώση με Trypan Blue ($r=0,523$, $p<0,0005$) (εικ. 3.28). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, έλαβαν τελικά $3,7 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $1,8-6,8 \times 10^6$ CD34+/Kg), οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D13 και D16 έλαβαν τελικά $2,8 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $1,7-4 \times 10^6$ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D17 και D30 έλαβαν τελικά $1,1 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-4,5 \times 10^6$ CD34+/Kg), διαφορές στατιστικά σημαντικές ($p=0,007$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε $0,4 \times 10^6/\text{Kg}$ (Πίνακας 3.18, εικ. 3.27).

Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική πολύ καλή αρνητική συσχέτιση του βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής ($r=-0,608$, $p<0,0005$) (εικ. 3.28). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, έλαβαν τελικά $3,2 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,3-9,3 \times 10^6$ CD34+/Kg), οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D13 και D16 έλαβαν τελικά $0,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-4,6 \times 10^6$ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D17 και D30 έλαβαν τελικά $0,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-0,7 \times 10^6$ CD34+/Kg), διαφορές στατιστικά σημαντικές ($p<0,0005$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε $0,2 \times 10^6/\text{Kg}$ (Πίνακας 3.18, εικ. 3.27).

Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική πολύ καλή αρνητική συσχέτιση του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής ($r=-0,591$, $p<0,0005$) (εικ. 3.28). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, έλαβαν τελικά $2,1 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-9,1 \times 10^6$ CD34+/Kg), οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D13 και D16 έλαβαν τελικά $0,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,3-2,8 \times 10^6$ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ μεταξύ D17 και D30 έλαβαν τελικά $0,3 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-0,5 \times 10^6$ CD34+/Kg), διαφορές στατιστικά σημαντικές

($p < 0,0005$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε $0,03 \times 10^6 / \text{Kg}$ (Πίνακας 3.18, εικ. 3.27).

Πίνακας 3.18 Ποσοστό και αριθμός βιώσιμων ΑΚΚ σε σχέση με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων

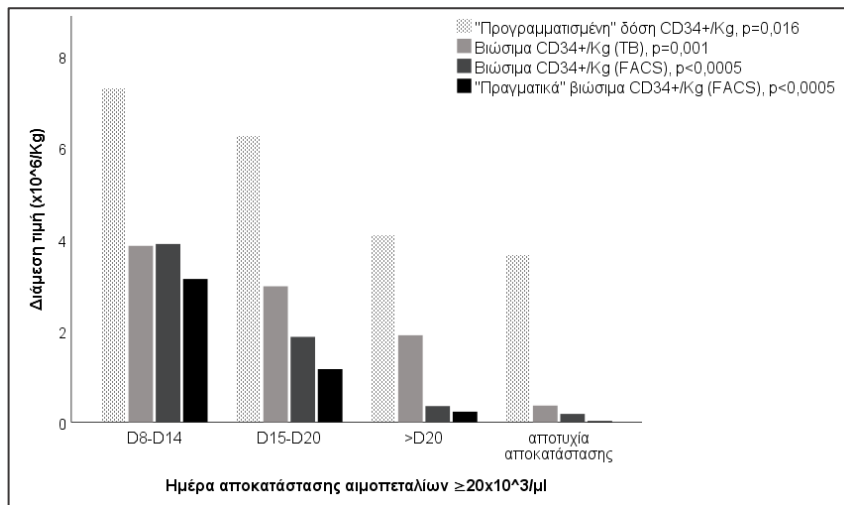
1 ^η ημέρα με NEUT \geq 500/ μ l	Διάμεση τιμή (εύρος)					Αριθμός CD34+(x10 ⁶)/Kg που εγχύθηκε			
	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (FACS)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (TB)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% «Πραγματική» βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% Απόπτωση CD34+ κυττάρων (FACS)	«Προγραμματισμένη» δόση (FACS)	% Βιώσιμα (TB)	% Βιώσιμα (FACS)	% «Πραγματικά» βιώσιμα (FACS)
	D10\pm2	98,8 (87,9-99,7)	58 (30-73)	51,6 (11,4-88)	35,2 (4,8- 79,5)	6,7 (0,1-44,9)	6,7 (2,9-12,5)	3,7 (1,8-6,8)	3,2 (0,3-9,3)
D13-16	98 (96,7-99,4)	47 (34,6-62,5)	14,5 (4,9-63,2)	14 (3,6-38,5)	3,1 (0,5-24,7)	6,5 (3,6-9,6)	2,8 (1,7-4)	0,9 (0,4-4,6)	0,9 (0,3-2,8)
D17-30	98,6 (93,3-98,9)	20,8 (15-51)	6,1 (0,6-10,1)	3,7 (0,5-7,3)	1,6 (0-3,7)	5,8 (2,7-8,8)	1,1 (0,4-4,5)	0,4 (0,03-0,7)	0,3 (0,03-0,5)
D-*	98,1 (-)	10% (-)	5 (-)	0,7 (-)	4,3 (-)	3,6 (-)	0,4 (-)	0,2 (-)	0,03 (-)
	<i>p=0,313</i>	<i>p<0,0005</i>	<i>p<0,0005</i>	<i>p<0,0005</i>	<i>p=0,114</i>	<i>p=0,397</i>	<i>p=0,007</i>	<i>p<0,0005</i>	<i>p<0,0005</i>
r	-0,176, <i>p=0,180</i>	-0,374, <i>p=0,030</i>	-0,526, <i>p<0,0005</i>	-0,472, <i>p<0,0005</i>	-0,262, <i>p=0,043</i>	-0,332, <i>p=0,01</i>	-0,523, <i>p<0,0005</i>	-0,608, <i>p<0,0005</i>	-0,591, <i>p<0,0005</i>

* αποτυχία αποκατάστασης

Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση αιμοπεταλίων

Η διάμεση τιμή του αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg («προγραμματισμένη» δόση), που έλαβαν οι ασθενείς, που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D14, ήταν $7,3 \times 10^6/\text{Kg}$ (εύρος $2,9-12,57 \times 10^6/\text{Kg}$), εκείνων που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους μεταξύ D15 και D20 ήταν $6,3 \times 10^6/\text{Kg}$ (εύρος $3,6-9,8 \times 10^6/\text{Kg}$), και εκείνων που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους μεταξύ D21 και D30 ήταν $4,1 \times 10^6/\text{Kg}$ (εύρος $2,7-8,8 \times 10^6/\text{Kg}$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των αιμοπεταλίων έλαβε $3,6 \times 10^6/\text{Kg}$ (πίνακας 3.19, εικ. 3.31).

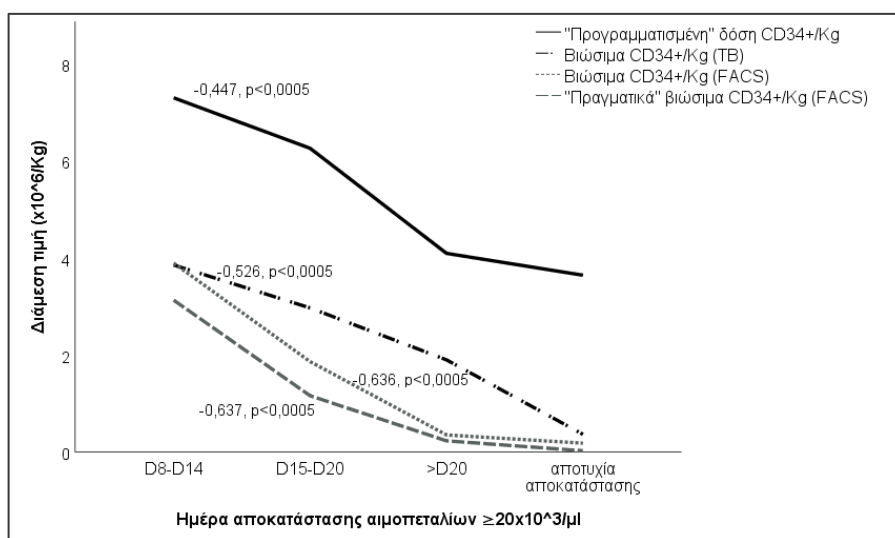
Οι διαφορές στη δόση των AAK μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,016$), και η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση του αριθμού των AAK που εγχύθηκαν και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων ($r=-0,447$, $p<0,0005$) (Πίνακας 3.19, εικ. 3.32).



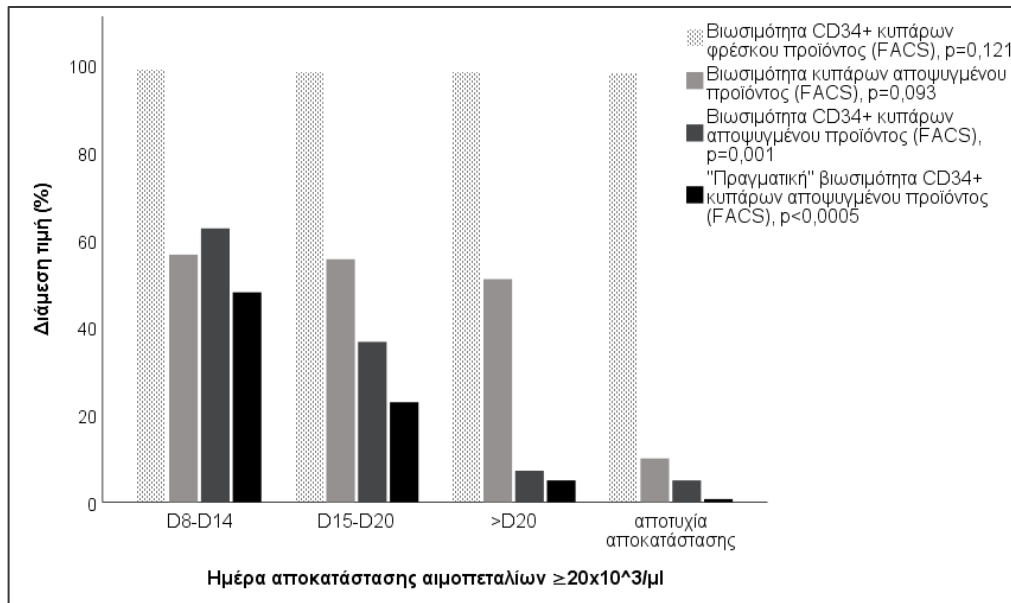
Εικόνα 3.31 Διάμεση τιμή δόσης CD34+/Kg σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων

Οι διαφορές στη βιωσιμότητα των φρέσκων προϊόντων και των αποψυγμένων προϊόντων όπως προσδιορίστηκαν με τη χρώση με Trypan blue, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,121$ και $p=0,093$, αντίστοιχα), ενώ αντίθετα οι διαφορές στη βιωσιμότητα των αποψυγμένων προϊόντων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέτρηση της βιωσιμότητας και της «πραγματικής» βιωσιμότητας με κυτταρομετρία ροής, ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,001$ και $p<0,0005$, αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων

$\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D14, είχαν βιωσιμότητα μετρημένη με TB ίση με 56,6% (εύρος 30-73%), βιωσιμότητα με FACS 62,6% (εύρος 12,1-88%) και «πραγματική» βιωσιμότητα 48% (εύρος 4,8-79,5%). Οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων μεταξύ D15 και D20, είχαν βιωσιμότητα ίση με 55,5% (εύρος 19-69,4%), 36,6% (εύρος 0,9-67,7%) και 22,8 (εύρος 0,5-35,3%), αντίστοιχα. Οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων $> 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ μεταξύ D21 και D30, είχαν βιωσιμότητα ίση με 51% (εύρος 15-65,6%), 7,2% (εύρος 0,6-63,3%) και 5 (εύρος 0,6-41,8%), αντίστοιχα. Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των αιμοπεταλίων είχε βιωσιμότητα ίση με 10%, 5% και 0,7%, αντίστοιχα για κάθε μέθοδο (Πίνακας 3.19, εικ. 3.34).

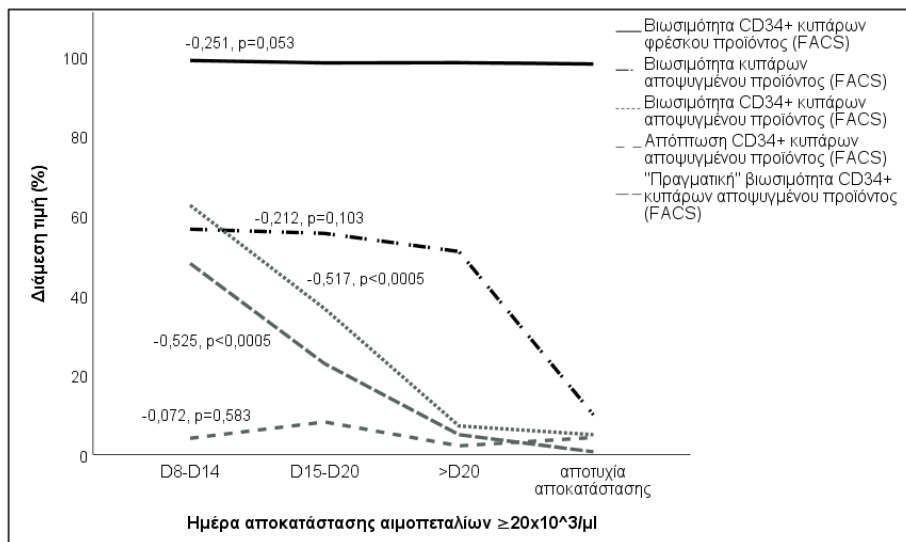


Εικόνα 3.32 Συσχέτιση της διάμεσης τιμής της δόσης CD34+/Kg σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων



Εικόνα 3.33 Διάμεση τιμή βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων

Οι διαφορές στα ποσοστά των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,449$), και η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά μη σημαντική συσχέτιση του ποσοστού απόπτωσης των CD34+ κυττάρων και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων ($p=0,583$) (Πίνακας 3.19, εικ. 3.35).



Εικόνα 3.34 Συσχέτιση της διάμεσης τιμής της βιωσιμότητας των CD34+ σε σχέση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων

Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση του βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν, όπως αυτός

προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της βιωσιμότητας με χρώση με Trypan Blue ($r=-0,526$, $p<0,0005$). Οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D14, έλαβαν τελικά $3,8 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $1,8-6,6 \times 10^6$ CD34+/Kg), οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων μεταξύ D15 και D20 έλαβαν τελικά 3×10^6 CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $1,2-6,8 \times 10^6$ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων μεταξύ D21 και D30 έλαβαν τελικά $1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-4,5 \times 10^6$ CD34+/Kg), διαφορές στατιστικά σημαντικές ($p=0,001$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των αιμοπεταλίων έλαβε $0,4 \times 10^6/\text{Kg}$.

Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική πολύ καλή αρνητική συσχέτιση του βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής ($r=-0,636$, $p<0,0005$). Οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D14, έλαβαν τελικά $3,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $1-9,3 \times 10^6$ CD34+/Kg), οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων μεταξύ D15 και D20 έλαβαν τελικά $1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-5,7 \times 10^6$ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων μεταξύ D21 και D30 έλαβαν τελικά $0,3 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-2,3 \times 10^6$ CD34+/Kg), διαφορές στατιστικά σημαντικές ($p<0,0005$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των αιμοπεταλίων έλαβε $0,2 \times 10^6/\text{Kg}$.

Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική πολύ καλή αρνητική συσχέτιση του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής ($r=-0,637$, $p<0,0005$). Οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D14, έλαβαν τελικά $3,1 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-9,1 \times 10^6$ CD34+/Kg), οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων μεταξύ D15 και D20 έλαβαν τελικά $1,2 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,3-3,1 \times 10^6$ CD34+/Kg), και οι ασθενείς που αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων μεταξύ D21 και D30 έλαβαν τελικά $0,2 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-1,5 \times 10^6$ CD34+/Kg),

διαφορές στατιστικά σημαντικές ($p < 0,0005$). Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των αιμοπεταλίων έλαβε $0,03 \times 10^6/\text{Kg}$.

Πίνακας 3.19 Ποσοστό και αριθμός βιώσιμων ΑΚΚ σε σχέση με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων

3 ^η ημέρα με PLT≥20x10 ³ /μl	Διάμεση τιμή (εύρος)					Αριθμός CD34+(x10 ⁶)/Kg που εγχύθηκε			
	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (FACS)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (TB)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% «Πραγματική» βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% Απόπτωση CD34+ κυττάρων (FACS)	«Προγραμματισμένη» δόση (FACS)	% Βιώσιμα (TB)	% Βιώσιμα (FACS)	% «Πραγματικά» βιώσιμα (FACS)
	D8-14	99 (87,9-99,7)	56,6 (30-73)	62,6 (12,1-88)	48 (4,8-79,5)	4,1 (0,1-31,8)	7,3 (2,9-12,5)	3,8 (1,8-6,6)	3,9 (1-9,3)
D15-20	98,4 (94,8-99,6)	55,5 (19-69,4)	36,6 (0,9-67,7)	22,8 (0,5-35,3)	8,2 (0,4-44,9)	6,3 (3,6-9,8)	3 (1,2-6,8)	1,9 (0,4-5,7)	1,2 (0,3-3,1)
D21-30	98,4 (93,3-98,9)	51 (15-65,6)	7,2 (0,6-63,3)	5 (0,6-41,8)	2,2 (0-21,5)	4,1 (2,7-8,8)	1,9 (0,4-4,5)	0,3 (0,03-2,3)	0,2 (0,03-1,5)
D-*	98,1 (-)	10 (-)	5 (-)	0,7 (-)	4,3 (-)	3,6 (-)	0,4 (-)	0,2 (-)	0,03(-)
	<i>p=0,121</i>	<i>p=0,093</i>	<i>p=0,001</i>	<i>p<0,0005</i>	<i>p=0,499</i>	<i>p=0,016</i>	<i>p=0,001</i>	<i>p<0,0005</i>	<i>p<0,0005</i>
r	-0,251, <i>p=0,053</i>	-0,212, <i>p=0,103</i>	-0,517, <i>p<0,0005</i>	-0,525, <i>p<0,0005</i>	-0,072, <i>p=0,583</i>	-0,447, <i>p<0,0005</i>	-0,526, <i>p<0,0005</i>	-0,636, <i>p<0,0005</i>	-0,637, <i>p<0,0005</i>

*αποτυχία αποκατάστασης

Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων

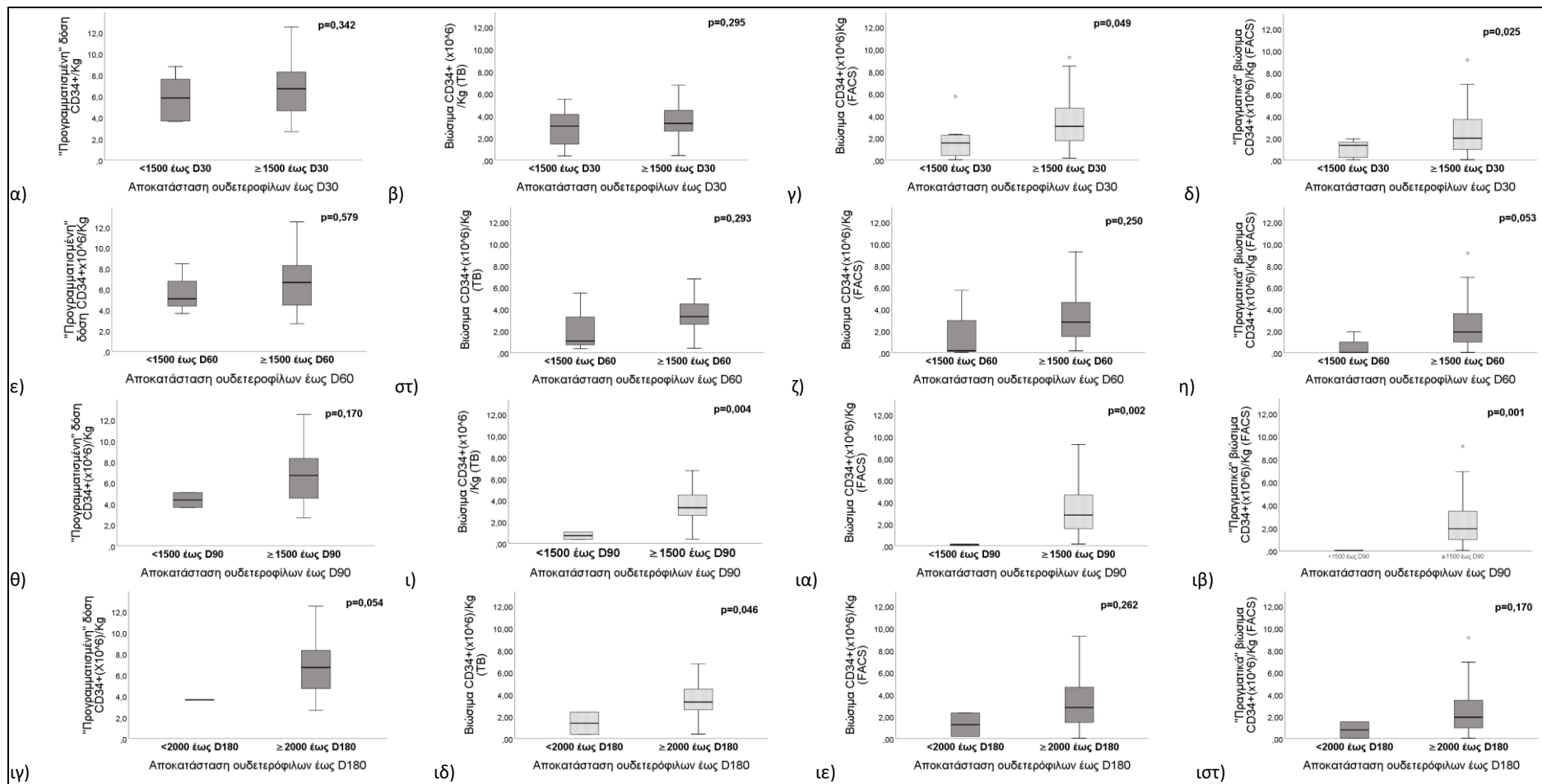
Οι διαφορές στον αριθμό των CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση) και των βιώσιμων (μέτρηση με TB) CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D30, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,342$ και $p=0,295$, αντίστοιχα) (εικ. 3.35α,β). Αντίθετα, οι διαφορές στον αριθμό των βιώσιμων (μέτρηση με FACS) και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,049$ και $p=0,025$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D30, έλαβαν 3×10^6 βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,2-9,3 \times 10^6$ CD34+/Kg) και 2×10^6 «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-9,1 \times 10^6$ CD34+/Kg) σε αντίθεση με τους ασθενείς, που δεν είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D30 και έλαβαν $1,5 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-5,7 \times 10^6$ CD34+/Kg) και $1,3 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg) (εικ. 3.35γ,δ). Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών το ποσοστό «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων διέφερε στατιστικά σημαντικά (34,4% έναντι 23%, αντίστοιχα, $p=0,028$) (Πίνακας 3.20).

Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D60, μόνο ο αριθμός των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, ήταν οριακά στατιστικά σημαντικός ($p=0,053$). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό των ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D60, έλαβαν $1,9 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-9,1 \times 10^6$ CD34+/Kg) ενώ εκείνοι που δεν είχαν, έλαβαν $0,03 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg) (εικ. 3.35ε-η). Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών το ποσοστό «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων διέφερε στατιστικά σημαντικά (32,9% έναντι 0,7%, αντίστοιχα, $p=0,015$) (Πίνακας 3.20).

Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D90, η διαφορά στον αριθμό των CD34+/Kg που εγχύθηκε («προγραμματισμένη» δόση) δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,170$). Αντίθετα, ο αριθμός των βιώσιμων, όπως μετρήθηκε τόσο με TB όσο και

με κυτταρομετρία ροής, και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, ήταν στατιστικά σημαντικός ($p=0,004$, $p=0,002$ και $p=0,004$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό των ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D90, έλαβαν $3,3 \times 10^6$ CD34+/Kg, μετρημένων με TB (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-6,8 \times 10^6$ CD34+/Kg), $2,8 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg, μετρημένων με FACS (διάμεση τιμή, εύρος: $0,2-9,3 \times 10^6$ CD34+/Kg), και $1,9 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-9,1 \times 10^6$ CD34+/Kg) σε αντίθεση με τους ασθενείς που δεν είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $> 1500/\mu\text{l}$ έως την D90 και έλαβαν $0,7 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-1,1 \times 10^6$ CD34+/Kg), $0,1 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-0,2 \times 10^6$ CD34+/Kg) και $0,03 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή) (εικ. 3.35θ-ιβ). Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών τα ποσοστά βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων, όπως μετρήθηκαν με τις τρεις μεθόδους, διέφεραν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας 3.20).

Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους $\geq 2000/\mu\text{l}$ έως την D180, μόνο ο αριθμός των βιώσιμων (TB) CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος που εγχύθηκε, ήταν στατιστικά σημαντικός ($p=0,046$), ενώ ο αριθμός των CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση) ήταν οριακά στατιστικά σημαντικός ($p=0,054$) (Πίνακας 3.20, εικ. 3.35ιγ-ιστ).



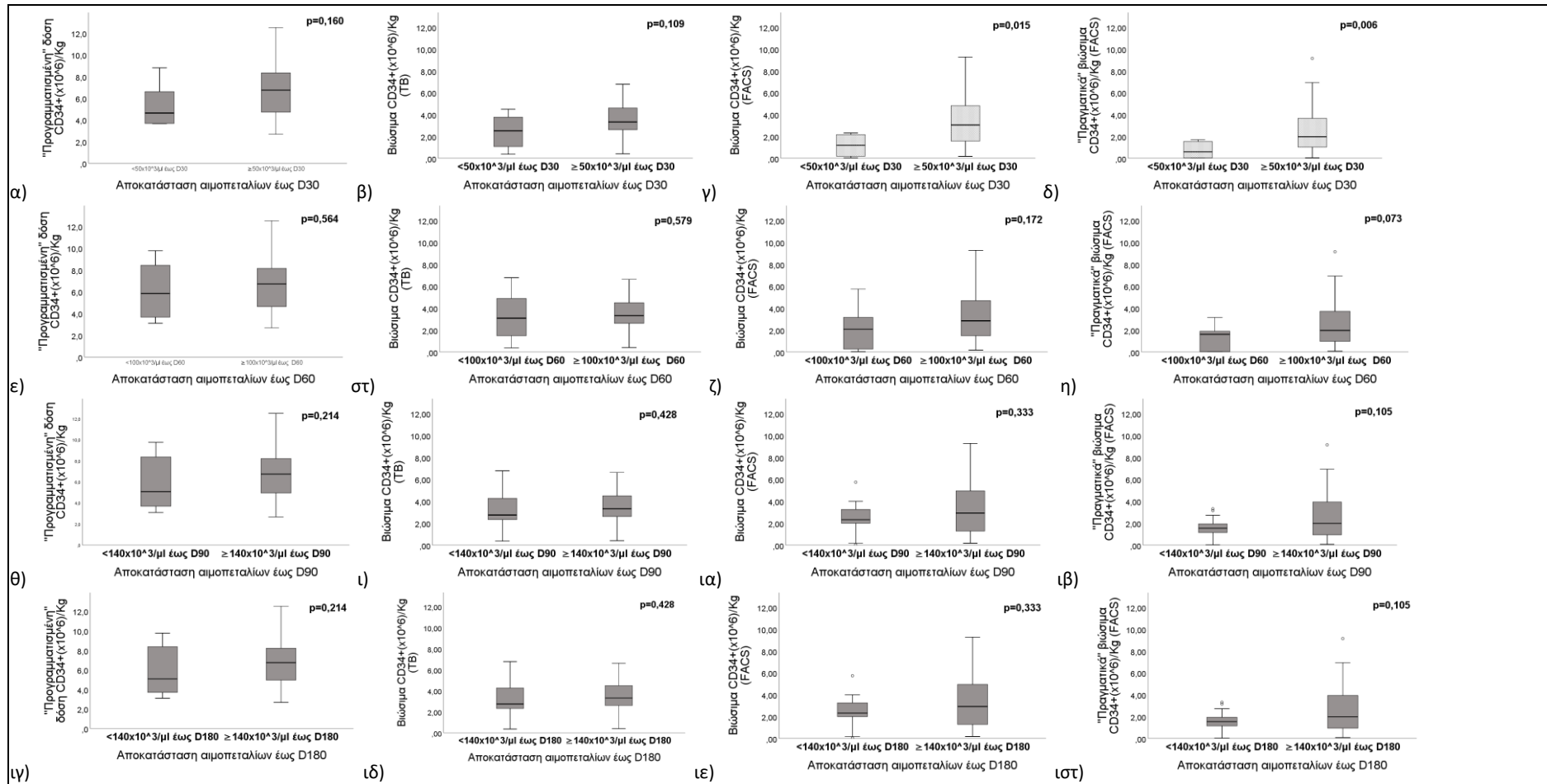
Εικόνα 3.35 Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων σε σχέση με τον αριθμό των CD34+/Kg που εγχύθηκε

Πίνακας 3.20 Ποσοστό και αριθμός βιώσιμων ΑΚΚ σε σχέση με τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων									
Διάμεση τιμή (εύρος)									
	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (FACS)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (TB)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% «Πραγματική» βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% Απόπτωση CD34+ κυττάρων (FACS)	Αριθμός CD34+(x10 ⁶)/Kg που εγχύθηκε			
						«Προγραμματισμένη» δόση (FACS)	% Βιώσιμα (TB)	% Βιώσιμα (FACS)	% «Πραγματικά» βιώσιμα (FACS)
<1500/μl έως D30	98,6 (95,4-99,4)	53,1 (10-65,6)	28,6 (0,6-67,7)	23 (0,6-41,8)	5,7 (0-44,9)	5,8 (3,6-8,8)	3,1 (0,4-5,5)	1,5 (0,03-5,7)	1,3 (0,03-1,9)
≥1500/μl έως D30	98,7 (87,9-99,7)	56,5 (15-73)	48,9 (0,9-88)	34,4 (0,5-79,5)	4,1 (0,1-37,4)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,8)	3 (0,2-9,3)	2 (0,03-9,1)
<i>p</i>	<i>p</i> =0,765	<i>p</i> =0,417	<i>p</i> =0,076	<i>p</i> =0,028	<i>p</i> =0,949	<i>p</i> =0,342	<i>p</i> =0,295	<i>p</i> =0,049	<i>p</i> =0,025
<1500/μl έως D60	98,9 (98,1-99,4)	21 (10-64,8)	5 (0,6-67,7)	0,7 (0,6-22,8)	4,3 (0-44,9)	5,1 (3,7-8,5)	1,1 (0,4-5,5)	0,2 (0,03-5,7)	0,03 (0,03-1,9)
≥1500/μl έως D60	98,7 (87,9-99,7)	55,9 (15-73)	46,2 (0,9-88)	32,9 (0,5-79,5)	4,3 (0,1-37,4)	6,6 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,8)	2,8 (0,2-9,3)	1,9 (0,03-9,1)
<i>p</i>	<i>p</i> =0,670	<i>p</i> =0,223	<i>p</i> =0,211	<i>p</i> =0,015	<i>p</i> =1,000	<i>p</i> =0,579	<i>p</i> =0,293	<i>p</i> =0,250	<i>p</i> =0,053
<1500/μl έως D90	98,5 (98,1-98,9)	15,5 (10-21)	2,8 (0,6-5)	0,6 (0,6-0,7)	2,1 (0-4,3)	4,4 (3,7-5,1)	0,7 (0,4-1,1)	0,1 (0,03-0,2)	0,03 (-)
≥1500/μl έως D90	98,7 (87,9-99,7)	56,5 (15-73)	46,5 (0,9-88)	32,2 (0,5-79,5)	4,6 (0,1-44,9)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,8)	2,8 (0,2-9,3)	1,9 (0,03-9,1)
<i>p</i>	<i>p</i> =0,710	<i>p</i> =0,007	<i>p</i> =0,004	<i>p</i> =0,004	<i>p</i> =0,262	<i>p</i> =0,170	<i>p</i> =0,004	<i>p</i> =0,002	<i>p</i> =0,001
<2000/μl έως D180	98,3 (98,1-98,4)	37,8 (10-65,6)	34,1 (5-63,3)	21,2 (0,7-41,8)	129 (4,3-21,5)	3,7 (-)	1,4 (0,4-2,4)	1,2 (0,2-2,3)	0,8 (0,03-1,5)
≥2000/μl έως D180	98,7 (87,9-99,7)	55,3 (15-73)	45,9 (0,6-88)	32,2 (0,5-79,5)	4,1 (0-44,9)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,8)	2,8 (0,03-9,3)	1,9 (0,03-9,1)
<i>p</i>	<i>p</i> =0,415	<i>p</i> =0,710	<i>p</i> =0,553	<i>p</i> =0,505	<i>p</i> =0,459	<i>p</i> =0,054	<i>p</i> =0,046	<i>p</i> =0,262	<i>p</i> =0,170

Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση αιμοπεταλίων

Οι διαφορές στον αριθμό των CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση) και των βιώσιμων (μέτρηση με TB) CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D30, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,160$ και $p=0,109$, αντίστοιχα) (εικ. 3.36α,β). Αντίθετα, οι διαφορές στον αριθμό των βιώσιμων (μέτρηση με FACS) και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,015$ και $p=0,006$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D30, έλαβαν 3×10^6 βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,2-9,3 \times 10^6$ CD34+/Kg) και $1,9 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-9,1 \times 10^6$ CD34+/Kg) σε αντίθεση με τους ασθενείς, που δεν είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D30 και έλαβαν $1,2 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-2,3 \times 10^6$ CD34+/Kg) και $0,6 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: $0,03-1,7 \times 10^6$ CD34+/Kg) (εικ. 3.36γ,δ). Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών τα ποσοστά βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων, όπως αυτές μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής, διέφερε στατιστικά σημαντικά (48,9% έναντι 19,9% βιωσιμότητα, $p=0,047$ και 33,6% έναντι 11,2% «πραγματική» βιωσιμότητα, $p=0,019$) (Πίνακας 3.21).

Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D60, ο αριθμός των CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, δεν ήταν στατιστικά σημαντικός. Ομοίως μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους $\geq 140/\mu\text{l}$ έως την D90 ή και την D180 (Πίνακας 3.20, εικ. 3.36).



Εικόνα 3.36 Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων σε σχέση με τον αριθμό των CD34+/Kg που εγχύθηκε

Πίνακας 3.21 Ποσοτό και αριθμός βιώσιμων ΑΚΚ σε σχέση με τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων									
	Διάμεση τιμή (εύρος)					Αριθμός CD34+(x10 ⁶)/Kg που εγχύθηκε			
	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (FACS)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (TB)	% Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% «Πραγματική» βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων που εγχύθηκαν (FACS)	% Απόπτωση CD34+ κυττάρων (FACS)	«Προγραμματισμένη» δόση (FACS)	% Βιώσιμα (TB)	% Βιώσιμα (FACS)	% «Πραγματικά» βιώσιμα (FACS)
<50K/μl έως D30	98,5 (98,1-98,9)	54 (10-65,6)	19,9 (0,6-63,3)	11,2 (0,6-41,8)	5,7 (0-24,3)	4,6 (3,7-8,8)	2,5 (0,4-4,5)	1,2 (0,03-2,3)	0,6 (0,03-1,7)
≥50K/μl έως D30	98,7 (87,9-99,7)	19,9 (0,6-63,3)	48,9 (0,9-88)	33,6 (0,5-79,5)	4,1 (0,1-44,9)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,8)	3 (0,2-9,3)	1,9 (0,03-9,1)
<i>p</i>	<i>p=0,455</i>	<i>p=0,470</i>	<i>p=0,047</i>	<i>p=0,019</i>	<i>p=0,878</i>	<i>p=0,160</i>	<i>p=0,109</i>	<i>p=0,015</i>	<i>p=0,006</i>
<100K/μl έως D60	98,4 (97,3-99,4)	59,2 (10-69,4)	28,2 (0,6-67,7)	22,4 (0,6-41,8)	5,7 (0-44,9)	5,8 (3,1-9,8)	3,1 (0,4-6,8)	2,1 (0,03-5,7)	1,6 (0,03-3,1)
≥100K/μl έως D60	98,7 (87,9-99,7)	55,2 (15-73)	48,9 (0,9-88)	34,4 (0,5-79,5)	4,1 (0,1-37,4)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,6)	2,8 (0,2-9,3)	2 (0,1-9,1)
<i>p</i>	<i>p=0,358</i>	<i>p=0,881</i>	<i>p=0,084</i>	<i>p=0,034</i>	<i>p=0,940</i>	<i>p=0,564</i>	<i>p=0,579</i>	<i>p=0,172</i>	<i>p=0,073</i>
<140K/μl έως D90	98,6 (97,3-99,6)	59,2 (10-71)	40,9 (0,6-76,2)	25,6 (0,6-73,5)	7,1 (0-44,9)	5,1 (3,1-9,8)	2,7 (0,4-6,8)	2,3 (0,03-5,7)	1,5 (0,03-3,3)
≥140K/μl έως D90	98,7 (87,9-99,7)	54,2 (15-73)	46,2 (0,9-88)	34,8 (0,5-79,5)	4,1 (0,3-31,8)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,6)	2,9 (0,2-9,3)	2 (0,1-9,1)
<i>p</i>	<i>p=0,792</i>	<i>p=0,388</i>	<i>p=0,449</i>	<i>p=0,164</i>	<i>p=0,641</i>	<i>p=0,214</i>	<i>p=0,428</i>	<i>p=0,333</i>	<i>p=0,105</i>
<140K/μl έως D180	98,6 (97,3-99,6)	59,2 (10-71)	40,9 (0,6-76,2)	25,6 (0,6-73,5)	7,1 (0-44,9)	5,1 (3,1-9,8)	2,7 (0,4-6,8)	2,3 (0,03-5,7)	1,5 (0,03-3,3)
≥140K/μl έως D180	98,7 (87,9-99,7)	54,2 (15-73)	46,2 (0,9-88)	34,8 (0,5-79,5)	4,1 (0,3-31,8)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,6)	2,9 (0,2-9,3)	2 (0,1-9,1)
<i>p</i>	<i>p=0,792</i>	<i>p=0,388</i>	<i>p=0,449</i>	<i>p=0,164</i>	<i>p=0,641</i>	<i>p=0,214</i>	<i>p=0,428</i>	<i>p=0,333</i>	<i>p=0,105</i>

3.5 Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO

3.5.1 Γενικά

Ιδανικά, ο αριθμός των ουδετερόφιλων κυττάρων αποκαθίσταται $\geq 500/\mu\text{l}$ μέχρι τη D12 μετά την ημέρα έγχυσης του αυτόλογου μοσχεύματος (D0) και $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως τη D30. Ταυτόχρονα, ο αριθμός των αιμοπεταλίων αποκαθίσταται $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι την D14 και $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ το αργότερο έως τη D90 (έως τη D30 είναι τουλάχιστον $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ και έως τη D60 είναι τουλάχιστον $100 \times 10^3/\mu\text{l}$). Μεταξύ των 61 ασθενών που μελετήθηκαν, οι 36 ασθενείς (59%) είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων ενώ οι 45 (73,8%) είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση. Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη, συνολικά, είχαν οι 32 ασθενείς (52,5%).

Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, και οι οποίοι αφορούν σε χαρακτηριστικά των ασθενών και σε χαρακτηριστικά του μοσχεύματος φαίνονται στον πίνακα 3.22.

- Τα ποσοστά των ασθενών διαφορετικού φύλου που είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Το 59,5% των αρρένων και το 57,9% των θηλέων είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=1,000$), το 71,4% των αρρένων και το 78,9% των θηλέων είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,755$) και το 50% των αρρένων και το 57,9% των θηλέων είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,593$) (εικ. 3.37α).
- Μεταξύ των νεότερων και των μεγαλύτερης ηλικίας ασθενών υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά όσο αφορά στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση και στη συνολική αιματολογική αποκατάσταση, με σημείο καμπής την ηλικία των 58 ετών. Οι ασθενείς με ηλικία ≤ 58 ετών είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση σε ποσοστό 71,8% έναντι του 36,4% των ασθενών με ηλικία >58 ετών ($p=0,014$) και ιδανική αιματολογική αποκατάσταση σε ποσοστό 64,1% έναντι του 31,8% ($p=0,019$). Ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση είχαν σε ποσοστό 79,5% και 63,6%, αντίστοιχα ($p=0,229\%$) (εικ. 3.37β). Στατιστικά σημαντική διαφορά όσο

αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των νεότερων και των μεγαλύτερων των 49 ετών.

- Μεταξύ των ασθενών με διαφορετικό νόσημα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά όσο αφορά στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση και στη συνολική αιματολογική αποκατάσταση. Οι ασθενείς με NHL είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση σε ποσοστό 40,9% έναντι του 78,9% των ασθενών LH ($p=0,046$)· το ποσοστό του 60% των ασθενών με MM δε διέφερε σημαντικά από των υπολοίπων. Οι ασθενείς με NHL είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση σε ποσοστό 59,1% , οι ασθενείς με LH 84,2% και οι ασθενείς με MM 80%, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,192$). Οι ασθενείς με NHL είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση σε ποσοστό 31,8% έναντι του 78,9% και του 50% των ασθενών με LH και MM, αντίστοιχα, ($p=0,011$). Στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά μεταξύ των ασθενών με LH και MM (εικ. 3.37γ).
- Μεταξύ των πτωχών, των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων με ιδανική και μη ιδανική αποκατάσταση, είτε βραχυπρόθεσμη είτε μακροπρόθεσμη. Το 75,9% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 25% των πτωχών κινητοποιητών ($p=0,019$)· οι διαφορές μεταξύ των καλών και των πτωχών κινητοποιητών και μεταξύ των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν ήταν σημαντικές. Το 93,1% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 58,3% των καλών κινητοποιητών και του 50% των πτωχών κινητοποιητών ($p=0,002$)· η διαφορά μεταξύ των καλών και των πτωχών κινητοποιητών δεν ήταν σημαντική. Το 72,4% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση έναντι του 41,7% των καλών κινητοποιητών και του 12,5% των πτωχών κινητοποιητών ($p=0,004$)· οι διαφορές μεταξύ των καλών και των πτωχών κινητοποιητών και μεταξύ των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν ήταν σημαντικές (εικ. 3.37δ).
- Μεταξύ των ασθενών που είχαν βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής των AAK $\leq 98,5\%$ και εκείνων που είχαν $>98,5\%$, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων

που είχαν ή όχι ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, τόσο βραχυπρόθεσμη όσο και μακροπρόθεσμη. Το 76,5% των ασθενών με >98,5% βιωσιμότητα είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 37% των ασθενών με βιωσιμότητα ≤98,5% ($p=0,004$), το 94,1% έναντι του 48,1% είχε ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ($p<0,0005$) και το 73,5% έναντι του 25,9% είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση συνολικά ($p<0,0005$) (εικ. 3.37ε).

- Μεταξύ των ασθενών που είχαν βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο προϊόν της συλλογής ≤98,7% και εκείνων που είχαν >98,7%, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων που είχαν ή όχι ιδανική βραχυπρόθεσμη και συνολικά ιδανική αιματολογική αποκατάσταση. Το 73,3% των ασθενών με >98,7% βιωσιμότητα είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 45,2% των ασθενών με βιωσιμότητα ≤98,7% ($p=0,037$), και το 70% έναντι του 35,5% είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,010$). Τόσο το 76,7% των ασθενών με >98,7% βιωσιμότητα όσο και το 71% με ≤98,7% βιωσιμότητα είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση χωρίς σημαντική διαφορά ($p=0,772$) (εικ. 3.38α).
- Τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονταν σε ύφεση πριν την AMMO και εκείνων που δε βρίσκονταν σε ύφεση και είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Το 56,7% των ασθενών σε ύφεση και το 61,3% των υπολοίπων είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,797$), το 73,3% των ασθενών σε ύφεση και το 74,2% των υπολοίπων είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=1,000$) και το 50% των ασθενών σε ύφεση και το 54,8% των υπολοίπων είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,800$) (εικ. 3.37στ).
- Το σχήμα της μεθόδου δεν είχε καμία στατιστική σημασία για την ιδανική αιματολογική αποκατάσταση. Οι ασθενείς που έλαβαν Tri-alkylator, BEAM, BEAC ή Melphalan είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση σε ποσοστό 66,7%, 58,3%, 50% και 60%, αντίστοιχα ($p=1,000$), είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση σε ποσοστό 66,7%, 72,2%, 50% και 80%, αντίστοιχα ($p=0,668$) και ιδανική αιματολογική αποκατάσταση συνολικά σε ποσοστό 66,7%, 52,8%, 50% και 50%, αντίστοιχα ($p=1,000$) (εικ. 3.37ζ).

- Μεταξύ των ασθενών που τους εγχύθηκε όγκος αποψυγμένου κυτταρικού προϊόντος $\leq 360\text{ml}$, το ποσοστό εκείνων που είχαν ιδανική αποκατάσταση, βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο από εκείνων που τους εγχύθηκε όγκος $>360\text{ml}$. Το 72,2% των πρώτων έναντι του 40% των δεύτερων είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,017$), το 88,9% των πρώτων έναντι του 52% των δεύτερων είχε ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,002$), και το 66,7% των πρώτων έναντι του 32% των δεύτερων είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,010$) (εικ. 3.38β).
- Ο συνολικός αριθμός των ασκών που αποψύχθηκε προς έγχυση δεν είχε καμία στατιστική σημασία για τη βραχυπρόθεσμη και τη συνολική αιματολογική αποκατάσταση, είχε όμως για τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση. Οι ασθενείς που έλαβαν ≤ 3 ή >3 ασκούς είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση σε ποσοστό 64,4%, και 43,8%, αντίστοιχα ($p=0,236$), και ιδανική αιματολογική αποκατάσταση σε ποσοστό 60% και 31,3%, αντίστοιχα ($p=0,079$). Ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση είχε το 82,2% των ασθενών που έλαβαν ≤ 3 ασκούς έναντι του 50% εκείνων που έλαβαν >3 ασκούς ($p=0,020$) (εικ. 3.38γ).
- Στατιστική σημασία για την αιματολογική αποκατάσταση, βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη, είχε ο αριθμός των $\text{CD34}^+/\text{Kg}$ ανά ασκό που εγχύθηκε. Μεταξύ των ασθενών που έλαβαν $>2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό, το 78,1% είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 37,9% όσων έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό ($p=0,020$), το 90,6% είχε ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 55,2% ($p=0,020$), και το 75% είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση έναντι του 27,6% ($p=0,020$) (εικ. 3.38δ).
- Μεταξύ των ασθενών, των οποίων οι ασκοί είχαν συγκέντρωση $\text{PLT} \leq 506 \times 10^3/\mu\text{l}$ και εκείνων που είχαν $>506 \times 10^3/\mu\text{l}$ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων που είχαν ή όχι ιδανική βραχυπρόθεσμη και συνολικά ιδανική αιματολογική αποκατάσταση. Το 66% των ασθενών με $\text{PLT} \leq 506 \times 10^3/\mu\text{l}$ είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 31,7% των ασθενών με $>506 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($p=0,044$), και

το 59,6% έναντι του 28,6% είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,041$). Το 92,9% των ασθενών με $PLT \leq 506 \times 10^3/\mu\text{l}$ και το 68,1% με $>506 \times 10^3/\mu\text{l}$ είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση με οριακά μη σημαντική διαφορά ($p=0,059$) (εικ. 3.38ε).

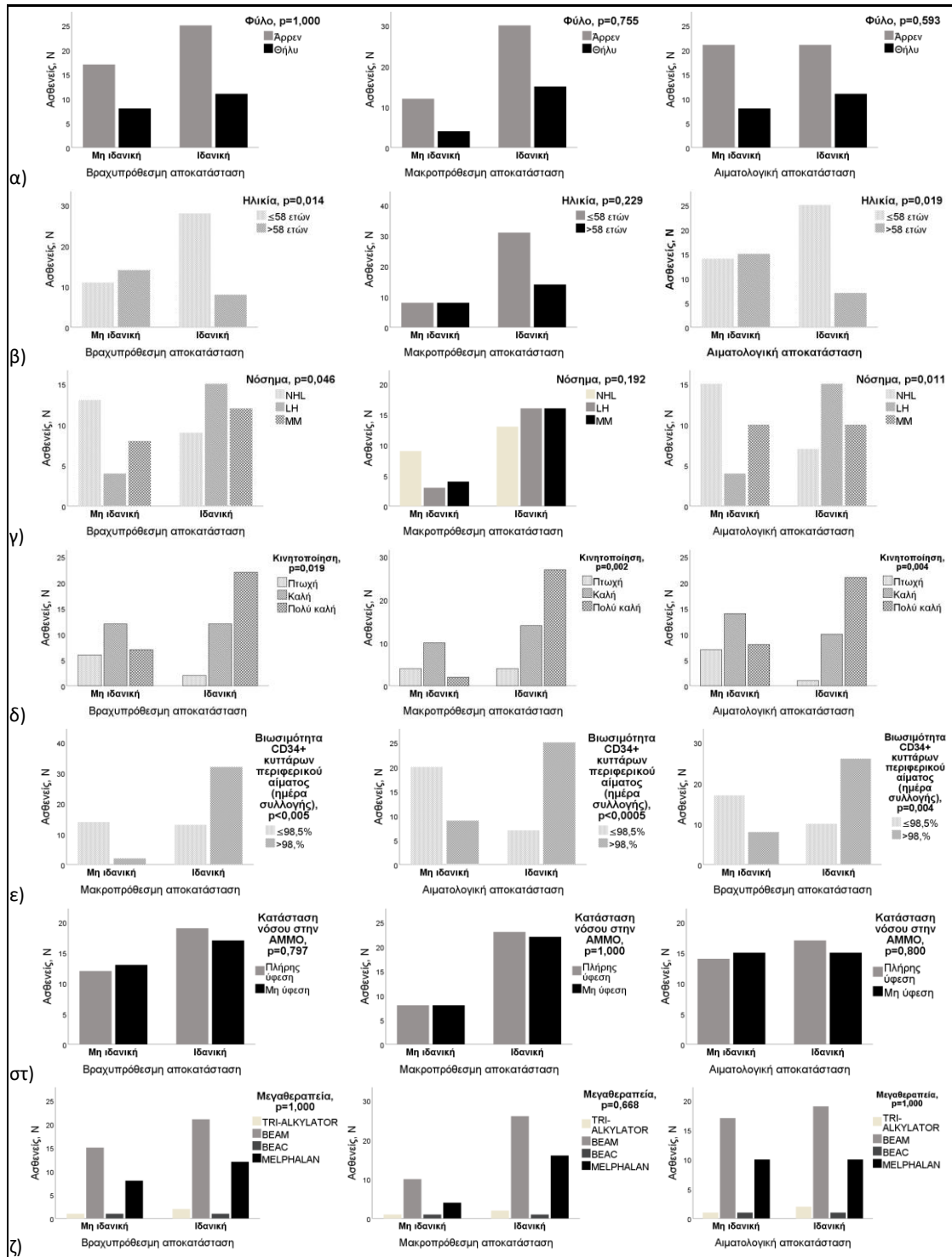
- Τα ποσοστά των ασθενών που έλαβαν διαφορετική «προγραμματισμένη» δόση και είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Το 50% των ασθενών που έλαβαν $<3 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$, το 43,5% των ασθενών που έλαβαν $3-6 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$ και το 69,4% των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$ είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,078$). Το 100% των ασθενών που έλαβαν $<3 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$, το 60,9% των ασθενών που έλαβαν $3-6 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$ και το 80,6% των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$ είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,188$). Το 50% των ασθενών που έλαβαν $<3 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$, το 34,8% των ασθενών που έλαβαν $3-6 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$ και το 63,9% των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6 CD34+/\text{Kg}$ είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,059$). (εικ. 3.37στ).

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ:

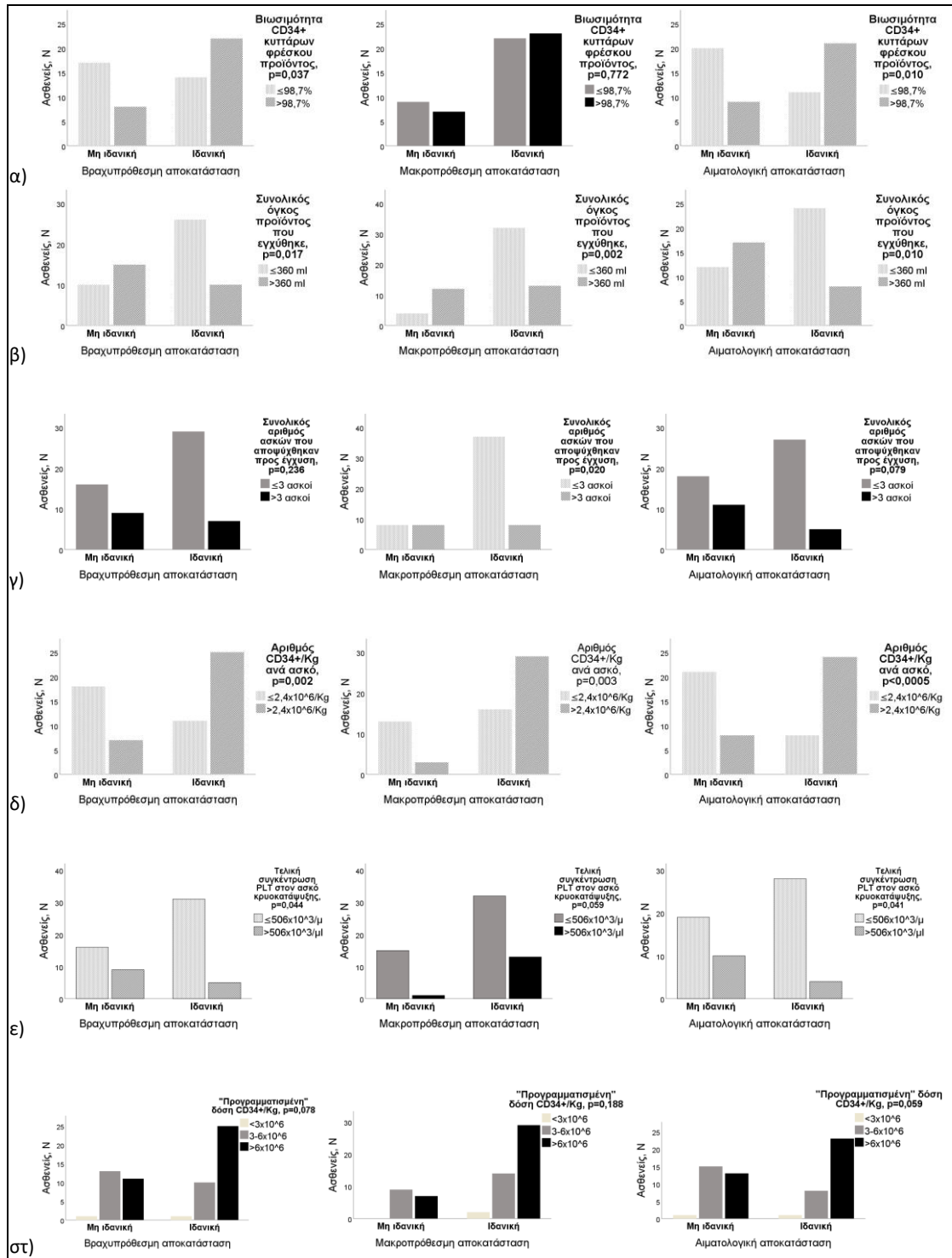
- της πτωχής, καλής ή πολύ καλής κινητοποίησης με τη συγκέντρωση των $CD34+/\text{Kg}$ ανά ασκό. Στο 87,5% των πτωχών και των καλών κινητοποιητών εγχύθηκαν $\leq 2,4 \times 10^6 CD34+/\mu\text{l}$ ανά ασκό σε αντίθεση με το 96,6% των πολύ καλών κινητοποιητών στο οποίο εγχύθηκαν $>2,4 \times 10^6 CD34+/\mu\text{l}$ ανά ασκό ($p<0,0005$).
- της πτωχής, καλής ή πολύ καλής κινητοποίησης με το συνολικό όγκο προϊόντος που εγχύθηκε. Στο 100% των πτωχών κινητοποιητών εγχύθηκε συνολικός όγκος προϊόντος $>360\text{ml}$ σε αντίθεση με το 62,5% των καλών κινητοποιητών και το 93,1% των πολύ καλών κινητοποιητών στους οποίους εγχύθηκαν 360ml ($p<0,0005$).
- της πτωχής, καλής ή πολύ καλής κινητοποίησης με το συνολικό αριθμό ασκών που αποψύχθηκαν προς έγχυση. Στο 87,5% των πτωχών κινητοποιητών αποψύχθηκαν >3 ασκοί σε αντίθεση με το 62,5% των καλών

κινητοποιητών και το 100% των πολύ καλών κινητοποιητών για τους οποίους αποψύχθηκαν ≤ 3 ασκοί ($p < 0,0005$).

- της συγκέντρωσης των CD34+/Kg ανά ασκό με το συνολικό όγκο προϊόντος που εγχύθηκε. Στο 87,5% των ασθενών που έλαβαν $> 2,4 \times 10^6$ CD34+/μl ανά ασκό χορηγήθηκαν ≤ 360 ml και στο 72,4% των ασθενών που έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6$ CD34+/μl ανά ασκό χορηγήθηκαν > 360 ml ($p < 0,0005$).
- της συγκέντρωσης των CD34+/Kg ανά ασκό με το συνολικό αριθμό ασκών που αποψύχθηκαν προς έγχυση. Για το 96,9% των ασθενών που έλαβαν $> 2,4 \times 10^6$ CD34+/μl ανά ασκό αποψύχθηκαν ≤ 3 ασκοί και για το 51,7% των ασθενών που έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6$ CD34+/μl αποψύχθηκαν > 3 ασκοί ($p < 0,0005$).
- του όγκου αποψυγμένου κυτταρικού προϊόντος και του αριθμού των ασκών. Στο 80% των περιπτώσεων που αποψύχθηκαν ≤ 3 ασκοί χορηγήθηκαν και ≤ 360 ml προϊόντος και στο 100% των περιπτώσεων που αποψύχθηκαν > 3 ασκοί χορηγήθηκαν και > 360 ml προϊόντος ($p < 0,0005$).



Εικόνα 3.37 Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών



Εικόνα 3.38 Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του μοσχεύματος

Πίνακας 3.22 Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και του μοσχεύματος				
		Ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση	Ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση	Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση
Φύλο	Άρρεν, N(%)	25 (59,5%)	30 (71,4%)	21 (50%)
	Θήλυ, N(%)	11 (57,9%)	15 (78,9%)	11 (57,9%)
		<i>p=1,000</i>	<i>p=0,755</i>	<i>p=0,593</i>
Ηλικία	≤58 ετών	28 (71,8%)	31 (79,5%)	25 (64,1%)
	>58 ετών	8 (36,4%)	14 (63,6%)	7 (31,8%)
		<i>p=0,014</i>	<i>p=0,229[†]</i>	<i>p=0,019</i>
Νόσημα	NHL	9 (40,9%)	13 (59,1%)	7 (31,8%)
	HL	15 (78,9%)	16 (84,2%)	15 (78,9%)
	MM	12 (60%)	16 (80%)	10 (50%)
		<i>p=0,046</i>	<i>p=0,192</i>	<i>p=0,011</i>
Κινητοποίηση	Πτωχή	2 (25%)	4 (50%)	1 (12,5%)
	Καλή	12 (50%)	14 (58,3%)	10 (41,7%)
	Πολύ καλή	22 (75,9%)	27 (93,1%)	21 (72,4%)
		<i>p=0,019</i>	<i>p=0,002</i>	<i>p=0,004</i>
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής	≤98,5%	10 (37%)	13 (48,1%)	7 (25,9%)
	>98,5%	26 (76,5)	32 (94,1%)	25 (73,5%)
		<i>p=0,004</i>	<i>p<0,0005</i>	<i>p<0,0005</i>
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος συλλογής	≤98,7%	14 (45,2%)	22 (71%)	11 (35,5%)
	>98,7%	22 (73,3%)	23 (76,7%)	21 (70%)
		<i>p=0,037</i>	<i>p=0,772</i>	<i>p=0,010</i>
Κατάσταση όσου στην AMMO	≠CR	19 (61,3%)	23 (74,2%)	17 (54,8%)
	CR	17 (56,7%)	22 (73,3%)	15 (50%)
		<i>p=0,797</i>	<i>p=1,000</i>	<i>p=0,800</i>
Μεγαθεραπεία	Tri-alkylator	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)
	BEAM	21 (58,3%)	26 (72,2%)	19 (52,8%)
	BEAC	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)

Πίνακας 3.22 Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και του μοσχεύματος			
	Ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση	Ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση	Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση
Melphalan	12 (60%)	16 (80%)	10 (50%)
	<i>p=1,000</i>	<i>p=0,668</i>	<i>p=1,000</i>
Συνολικός όγκος αποψυγμένου προϊόντος που εγχύθηκε			
≤360ml	26 (72,2%)	32 (88,9%)	24 (66,7%)
<360ml	10 (40%)	13 (52%)	8 (32%)
	<i>p=0,017</i>	<i>p=0,002</i>	<i>p=0,010</i>
Συνολικός αριθμός ασκών που αποψύχθηκε προς έγχυση			
≤3	29 (64,4%)	37 (82,2%)	27 (60%)
>3	7 (43,8%)	8 (50%)	5 (31,3%)
	<i>p=0,236</i>	<i>p=0,020</i>	<i>p=0,079</i>
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση			
≤2,4x10 ⁶	11 (37,9%)	16 (55,2%)	8 (27,6%)
>2,4x10 ⁶	25 (78,1%)	29 (90,6%)	24 (75%)
	<i>p=0,002</i>	<i>p=0,003</i>	<i>p<0,0005</i>
Συγκέντρωση PLT/μL στον ασκό			
≤506x10 ⁶ /μl	31 (66%)	32 (68,1%)	28 (59,6%)
>506x10 ⁶ /μl	5 (31,7%)	13 (92,9%)	4 (28,6%)
	<i>p=0,044</i>	<i>p=0,059</i>	<i>p=0,041</i>
« Προγραμματισμένη » δόση CD34+/Kg			
<3x10 ⁶	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)
3-6x10 ⁶	10 (43,5%)	14 (60,9%)	8 (34,8%)
>6x10 ⁶	25 (69,4%)	29 (80,6%)	23 (63,9%)
	<i>p=0,078</i>	<i>p=0,188</i>	<i>p=0,059</i>
Σύνολο ασθενών, N(%)	36 (59%)	45 (73,8%)	32 (52,5%)

3.5.2 Έλεγχος της επίδρασης παραγόντων στην ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση με διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση

Με διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση (Binomial logistic regression) ελέγχθηκε η επίδραση παραγόντων στην πιθανότητα των ασθενών να έχουν ιδανική αποκατάσταση της αιμοποίησης. Οι παράγοντες που εισήχθησαν στη λογιστική παλινδρόμηση, ήταν εκείνοι που ήταν στατιστικά σημαντικοί κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση είτε για τη βραχυπρόθεσμη, είτε για τη μακροπρόθεσμη είτε για τη συνολική αιμοποιητική αποκατάσταση, δηλαδή η ηλικία των ασθενών (≤ 58 ετών ή > 58 ετών), η βιωσιμότητα των CD34+ του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής των AAK ($\leq 98,5\%$ ή $> 98,5\%$), η βιωσιμότητα των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής των AAK ($\leq 98,7\%$ ή $> 98,7\%$), ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση ($\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $> 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$), η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης ($\leq 506 \times 10^3/\mu\text{l}$ ή $> 506 \times 10^3/\mu\text{l}$) και ο βιώσιμος αριθμός (μέτρηση με FACS και TB) και ο «πραγματικός» βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg που εγχύθηκε. Επιπλέον εισήχθη και η προγραμματισμένη δόση CD34+/Kg προς έγχυση (μέτρηση στο φρέσκο προϊόν: $\leq 6 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $> 6 \times 10^6/\text{Kg}$). Η ανάλυση έγινε ξεχωριστά για την βραχυπρόθεσμη (μοντέλο #1) και τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση (μοντέλο #2) και συνολικά για την αιμοποιητική αποκατάσταση μετά την AMMO (μοντέλο #3). Σε κάθε μια από τις τρεις αναλύσεις ελέγχθηκε η επίδραση είτε του βιώσιμου αριθμού CD34+ κυττάρων, όπως μετρήθηκε με TB (α) είτε του βιώσιμου αριθμού CD34+ κυττάρων, όπως μετρήθηκε με FACS (β), είτε του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των CD34+ (γ). Σε κάθε ανάλυση η εισαγωγή των παραμέτρων έγινε ιεραρχικά με βάση την πληροφορία, που είναι γνωστή σε κάθε φάση της AMMO, δηλαδή πρώτα (Block 1) εισήχθησαν η ηλικία και η βιωσιμότητα των CD34+ του περιφερικού αίματος (γνωστά κατά τη συλλογή), έπειτα (Block 2) εισήχθησαν η βιωσιμότητα των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης, η προγραμματισμένη δόση CD34+/Kg προς έγχυση (γνωστά κατά τη συλλογή και τη βαθμιαία κρυοκατάψυξη) και τελικά (Block 3) εισήχθηκε ο βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων προς έγχυση (γνωστός μετά από τη μέτρηση της βιωσιμότητας). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης περιγράφονται στον πίνακα.

Μοντέλο 1^α

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB), στην επίτευξη ιδανικής βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων μετά την AMMO, περιγράφεται στην εικόνα.

- Με την εισαγωγή στο μοντέλο της ηλικίας και της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα (Block 1), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(2)=14,731$, $p=0,001$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 70,5% των περιπτώσεων (με ευαισθησία: 91,7%, ειδικότητα: 40%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 68,7% και αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 76,9%). Και οι δυο μεταβλητές, η ηλικία και η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,03$ και $p=0,008$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς ηλικίας ≤ 58 ετών είχαν 3,7 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση και οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση.
- Με την προσθήκη στο μοντέλο, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε, την τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης και της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση (Block 2), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(6)=25,855$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 78,7% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 83,3%, ειδικότητα: 72%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 81%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 74%). Από τις έξι μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,047$): η ηλικία ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντική,

$p=0,051$. Οι ασθενείς με $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής είχαν 0,3 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση.

- Με την προσθήκη στο μοντέλο του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB) (Block 3), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=27,696$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 80,3% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 80,6%, ειδικότητα: 80%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 80,6%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 74,1%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντική ($p=0,058$).

	Chi-square	df	Sig.								
Model	14,731	2	,001								
				Predicted							
				Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση							
Observed				Μη ιδανική	Ιδανική	Percentage Correct					
Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική			10	15	40,0					
	Ιδανική			3	33	91,7					
Overall Percentage						70,5					
a. The cut value is ,500											
				B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
										Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)				1,318	,608	4,700	1	,030	3,736	1,135	12,303
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)				-1,567	,593	6,994	1	,008	,209	,065	,666
Constant				,294	,561	,275	1	,600	1,342		
a. Variable(s) entered on step 1: Ηλικία, Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής).											

	Chi-square	df	Sig.								
Model	25,855	6	,000								
				Predicted							
				Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση							
Observed				Μη ιδανική	Ιδανική	Percentage Correct					
Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική			18	7	72,0					
	Ιδανική			6	30	83,3					
Overall Percentage						78,7					
a. The cut value is ,500											
				B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for odds	
										Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)				1,372	,703	3,811	1	,051	3,943	,995	15,633
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,3\%$)				-1,166	,692	2,841	1	,092	,311	,080	1,209
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)				-1,366	,688	3,943	1	,047	,255	,066	,982
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ($\leq 580 \times 10^3 / \mu\text{l}$)				,690	,768	,808	1	,369	1,995	,443	8,988
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^6 / \text{Kg}$)				-,295	,735	,161	1	,688	,744	,176	3,143
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($2,4 \times 10^6 / \text{Kg}$)				-1,392	,772	3,249	1	,071	,249	,055	1,129
Constant				1,183	,912	1,683	1	,195	3,265		
a. Variable(s) entered: Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος, Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg, Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό.											

	Chi-square	df	Sig.	
Model	27,696	7	,000	

Observed		Predicted		Percentage Correct
		Βραχυπρόθεσμη Μη ιδανική	Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση Ιδανική	
Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική	20	5	80,0
	Ιδανική	7	29	80,6
Overall Percentage				80,3

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤58 ετών)	1,244	,717	3,009	1	,083	3,468	,851	14,134
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) (≤98,6%)	-1,281	,714	3,214	1	,073	,278	,068	1,127
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (≤98,7%)	-1,343	,708	3,602	1	,058	,261	,065	1,045
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης (≤508x10 ³ /μl)	,121	,863	,020	1	,888	1,129	,208	6,125
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg (≤6x10 ⁵ /Kg)	,708	1,059	,447	1	,504	2,030	,255	16,190
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό (≤2,4x10 ⁶ /Kg)	-1,223	,801	2,334	1	,127	,294	,061	1,414
Βιώσιμα CD34+/Kg (TB)	,547	,420	1,698	1	,193	1,728	,759	3,935
Constant	-,592	1,616	,134	1	,714	,553		

a. Variable(s) entered on step 1: Βιώσιμα CD34+/Kg (TB).

Μοντέλο 1β

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS), στην επίτευξη ιδανικής βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων μετά την AMMO, περιγράφεται στη εικόνα:

- Το μοντέλο 1β είναι πανομοιότυπο με το μοντέλο 1α, με την αντικατάσταση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με TB, από το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS. Προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=34,495$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 85,2% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 86,1%, ειδικότητα: 84%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 88,6%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 80,8%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η ηλικία και ο βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,032$ και $p=0,012$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς ηλικίας ≤58 ετών είχαν 5,6 φορές μεγαλύτερη

πιθανότητα για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση και η αύξηση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση.

	Chi-square	df	Sig.
Model	34,495	7	,000

Observed		Predicted		Percentage Correct
		Βραχυπρόθεσμη Μη ιδανική	Βραχυπρόθεσμη Ιδανική	
Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική	21	4	84,0
	Ιδανική	5	31	86,1
Overall Percentage				85,2

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤58 ετών)	1,725	,805	4,586	1	,032	5,611	1,157	27,202
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) (≤98,6%)	-1,289	,807	2,550	1	,110	,276	,057	1,341
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (≤98,7%)	-,949	,761	1,555	1	,212	,387	,087	1,720
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης (≤508x10 ³ /μl)	-,085	,851	,010	1	,921	,919	,173	4,872
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg (≤6x10 ⁶ /Kg)	,604	,915	,435	1	,510	1,829	,304	11,001
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό (≤2,4x10 ⁶ /Kg)	-,835	,955	,764	1	,382	,434	,067	2,821
Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)	,777	,308	6,380	1	,012	2,175	1,190	3,974
Constant	-1,325	1,401	,893	1	,345	,266		

a. Variable(s) entered on step 1: Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS).

Μοντέλο 1γ

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS), στην επίτευξη ιδανικής βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων μετά την AMMO, περιγράφεται στη εικόνα:

- Το μοντέλο 1γ είναι πανομοιότυπο με τα μοντέλα 1α και 1β, με την αντικατάσταση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με TB ή με FACS, αντίστοιχα, από τον «πραγματικά» βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS. Προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό

μοντέλο ($\chi^2(7)=40,525$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 83,6% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 86,1%, ειδικότητα: 80%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 86,1%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 80%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η ηλικία και ο «πραγματικά» βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,040$ και $p=0,004$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς ηλικίας ≤ 58 ετών είχαν 6,6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση και η αύξηση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση.

	Chi-square	df	Sig.
Model	40,525	7	,000

Observed	Predicted	Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση		Percentage Correct
		Μη ιδανική	Ιδανική	
Βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική	20	5	80,0
	Ιδανική	5	31	86,1
Overall Percentage				83,6

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	1,890	,918	4,239	1	,040	6,618	1,095	40,006
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-1,252	,946	1,751	1	,186	,286	,045	1,827
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)	-1,067	,843	1,600	1	,206	,344	,066	1,798
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ($\leq 508 \times 10^3 / \mu\text{l}$)	-,100	,907	,012	1	,912	,905	,153	5,352
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^6 / \text{Kg}$)	,565	,925	,373	1	,541	1,760	,287	10,794
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($\leq 2,4 \times 10^6 / \text{Kg}$)	-,784	1,047	,560	1	,454	,457	,059	3,556
"Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)	1,285	,441	8,502	1	,004	3,616	1,524	8,580
Constant	-1,714	1,488	1,328	1	,249	,180		

a. Variable(s) entered on step 1: "Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg (FACS).

Μοντέλο 2α

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB), στην επίτευξη ιδανικής μακροπρόθεσμης

αποκατάστασης ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων μετά την AMMO, περιγράφεται στη εικόνα:

- Με την εισαγωγή στο μοντέλο της ηλικίας και της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα (Block 1), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(2)=17,857$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 78,7% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 88,9%, ειδικότητα: 50%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 83,3%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 61,5%). Από τις δυο μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,001$). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα είχαν 0,06 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση.
- Με την προσθήκη στο μοντέλο της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε, την τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης και της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση (Block 2), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(6)=31,100$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 91,8% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 95,6%, ειδικότητα: 81,3%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 93,5%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 86,7%). Από τις έξι μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής και η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,005$ και $p=0,013$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και $>508 \times 10^3/\mu\text{l}$ PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης είχαν 0,07 φορές και 0,04 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση.
- Με την προσθήκη στο μοντέλο του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB) (Block 3), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=31,790$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 90,2% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 93,3%, ειδικότητα: 81,3%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 93,3%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 81,3%). Από τις επτά μεταβλητές,

μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα τη ημέρα της συλλογής, η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης και ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,005$, $p=0,020$ και $p=0,047$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα, $>508 \times 10^3/\mu\text{l}$ PLT στον ασκό κρουκατάψυξης και $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση, είχαν 0,07 φορές, 0,05 φορές και 0,1 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση.

Model	Chi-square	df	Sig.
	17,857	2	,000

Observed		Predicted Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση		Percentage Correct
		Μη ιδανική	Ιδανική	
Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική	8	8	50,0
	Ιδανική	5	40	88,9
Overall Percentage				78,7

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	,353	,693	,259	1	,611	1,423	,366	5,531
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-2,782	,832	11,180	1	,001	,062	,012	,316
Constant	2,524	,865	8,516	1	,004	12,483		

a. Variable(s) entered on step 1: Ηλικία, Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής).

Model	Chi-square	df	Sig.
	31,100	6	,000

Observed		Predicted Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση		Percentage Correct
		Μη ιδανική	Ιδανική	
Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική	13	3	81,3
	Ιδανική	2	43	95,6
Overall Percentage				91,8

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	,961	,880	1,192	1	,275	2,614	,466	14,665
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-2,641	,941	7,875	1	,005	,071	,011	,451
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)	-,417	,839	,247	1	,619	,659	,127	3,414
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ($\leq 508 \times 10^3/\mu\text{l}$)	-3,203	1,283	6,232	1	,013	,041	,003	,502
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^6/\mu\text{l}$)	,201	,865	,054	1	,816	1,223	,224	6,668
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$)	-1,799	,960	3,513	1	,061	,166	,025	1,086
Constant	5,884	1,689	12,134	1	,000	359,414		

a. Variable(s) entered on step 1: Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος, Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg, Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό.

	Chi-square	df	Sig.					
Model	31,790	7	,000					
					Predicted Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση			
Observed					Μη ιδανική	Ιδανική	Percentage Correct	
Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση					13	3	81,3	
					3	42	93,3	
Overall Percentage							90,2	
a. The cut value is ,500								
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds Lower Upper	
Ηλικία (≤58 ετών)	1,029	,895	1,320	1	,251	2,798	,484	16,178
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) (≤98,6%)	-2,723	,967	7,926	1	,005	,066	,010	,437
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (≤98,7%)	-,481	,855	,316	1	,574	,618	,116	3,306
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης (≤508x10 ³ /μl)	-3,003	1,292	5,399	1	,020	,050	,004	,625
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg (≤6x10 ⁶ /Kg)	-,470	1,218	,149	1	,699	,625	,057	6,796
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό (≤2,4x10 ⁶ /μl)	-2,007	1,012	3,929	1	,047	,134	,018	,978
Βιώσιμα CD34+/Kg (TB)	-,353	,435	,657	1	,418	,703	,299	1,649
Constant	7,419	2,674	7,696	1	,006	1666,723		
a. Variable(s) entered on step 1: Βιώσιμα CD34+/Kg (TB).								

Μοντέλο 2β

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόσης CD34+/Kg προς έγχυση και του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS), στην επίτευξη ιδανικής μακροπρόθεσμης αποκατάστασης ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων μετά την AMMO, περιγράφεται στη εικόνα:

- Το μοντέλο 2β είναι πανομοιότυπο με το μοντέλο 2α, με την αντικατάσταση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με TB, από το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS. Προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=32,584$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 88,5% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 93,3%, ειδικότητα: 75%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 91,3%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 80%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής και η τελική συγκέντρωση των PLT

στον ασκό κρουκατάψυξης ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,006$ και $p=0,009$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και $>508 \times 10^3/\mu\text{l}$ PLT στον ασκό κρουκατάψυξης είχαν 0,07 φορές, και 0,03 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση.

	Chi-square	df	Sig.
Model	32,584	7	,000

Observed		Predicted Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση		Percentage Correct
		Μη ιδανική	Ιδανική	
Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική	12	4	75,0
	Ιδανική	3	42	93,3
Overall Percentage				88,5

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	,866	,898	,930	1	,335	2,377	,409	13,805
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-2,639	,967	7,448	1	,006	,071	,011	,475
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)	-,168	,892	,036	1	,850	,845	,147	4,851
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ($\leq 402 \times 10^3/\mu\text{l}$)	-3,561	1,369	6,770	1	,009	,028	,002	,415
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^6/\mu\text{l}$)	,644	,970	,440	1	,507	1,903	,284	12,752
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($\leq 2,4 \times 10^6/\mu\text{l}$)	-1,419	1,018	1,946	1	,163	,242	,033	1,777
Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)	,379	,319	1,412	1	,235	1,461	,782	2,730
Constant	4,603	1,913	5,787	1	,016	99,766		

a. Variable(s) entered on step 1: Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS).

Μοντέλο 2γ

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS), στην επίτευξη ιδανικής μακροπρόθεσμης αποκατάστασης ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων μετά την AMMO, περιγράφεται στη εικόνα:

- Το μοντέλο 2γ είναι πανομοιότυπο με τα μοντέλα 2α και 2β, με την αντικατάσταση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με TB ή με FACS, αντίστοιχα, από τον

«πραγματικά» βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS. Προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=33,154$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 90,2% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 93,3%, ειδικότητα: 81,3%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 93,3%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 81,2%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής και η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,011$ και $p=0,009$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και $>508 \times 10^3/\mu\text{l}$ PLT στον ασκό κρουκατάψυξης έχουν 0,08 φορές και 0,03 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση.

	Chi-square	df	Sig.
Model	33,154	7	,000

Observed		Predicted		Percentage Correct
		Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση Μη ιδανική	Ιδανική	
Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση	Μη ιδανική	13	3	81,3
	Ιδανική	3	42	93,3
Overall Percentage				90,2

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	,793	,900	,777	1	,378	2,210	,379	12,888
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-2,500	,978	6,536	1	,011	,082	,012	,558
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)	-,280	,890	,099	1	,753	,756	,132	4,322
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ($\leq 402 \times 10^3/\mu\text{l}$)	-3,473	1,329	6,831	1	,009	,031	,002	,420
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^6/\mu\text{l}$)	,551	,933	,349	1	,555	1,735	,279	10,807
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($\leq 2,4 \times 10^6/\mu\text{l}$)	-1,393	1,039	1,798	1	,180	,248	,032	1,903
"Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)	,496	,367	1,823	1	,177	1,642	,799	3,372
Constant	4,623	1,860	6,174	1	,013	101,760		

a. Variable(s) entered on step 1: "Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg (FACS).

Μοντέλο 3α

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του

βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB), στην επίτευξη ιδανικής αιμοποιητικής αποκατάστασης μετά την AMMO, περιγράφεται στη εικόνα:

- Με την εισαγωγή στο μοντέλο της ηλικίας και της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα (Block 1), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(2)=17,618$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 73,8% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 78,1%, ειδικότητα: 69%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 69,4%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 74,1%). Από τις δυο μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,001$). Οι με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα είχαν 0,1 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση.
- Με την προσθήκη στο μοντέλο της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε, την τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης και της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση (Block 2), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(6)=33,639$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 85,2% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 84,4%, ειδικότητα: 86,2%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 87,1%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 83,3%). Από τις έξι μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα τη ημέρα της συλλογής, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής και ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,027$, $p=0,014$ και $p=0,025$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος, $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής και $\leq 2,4 \times 10^6$ /Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση, είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση.
- Με την προσθήκη στο μοντέλο του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB) (Block 3), προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=33,948$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 83,6% των περιπτώσεων

(ευαισθησία: 84,4%, ειδικότητα: 82,8%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 84,4%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 82,6%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής και ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,025$, $p=0,016$ και $p=0,034$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος, $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής και $\leq 2,4 \times 10^6$ /Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση, είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση.

Model	Chi-square	df	Sig.
	17,618	2	,000

Observed		Predicted		Percentage Correct
		Αιματολογική αποκατάσταση Μη ιδανική	Ιδανική	
Αιματολογική αποκατάσταση	Μη ιδανική	20	9	69,0
	Ιδανική	7	25	78,1
Overall Percentage				73,8

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	1,143	,629	3,306	1	,069	3,136	,915	10,753
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-1,958	,604	10,511	1	,001	,141	,043	,461
Constant	,236	,570	,172	1	,678	1,266		

a. Variable(s) entered on step 1: Ηλικία, Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής).

Model	Chi-square	df	Sig.
	33,639	6	,000

Observed		Predicted		Percentage Correct
		Αιματολογική αποκατάσταση Μη ιδανική	Ιδανική	
Αιματολογική αποκατάσταση	Μη ιδανική	25	4	86,2
	Ιδανική	5	27	84,4
Overall Percentage				85,2

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	1,131	,750	2,278	1	,131	3,100	,713	13,472
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-1,639	,739	4,921	1	,027	,194	,046	,826
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)	-1,866	,756	6,088	1	,014	,155	,035	,681
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ($\leq 508 \times 10^3$ /μl)	,804	,853	,889	1	,346	2,234	,420	11,877
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^5$ /μl)	-,274	,784	,122	1	,726	,760	,164	3,531
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($\leq 2,4 \times 10^6$ /μl)	-1,827	,816	5,012	1	,025	,161	,032	,797
Constant	1,494	,994	2,261	1	,133	4,455		

a. Variable(s) entered on step 1: Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος, Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg, Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό.

	Chi-square	df	Sig.						
Model	33,948	7	,000						
				Predicted					
Observed				Αιματολογική	αποκατάσταση				
				Μη ιδανική	Ιδανική	Percentage Correct			
Αιματολογική αποκατάσταση	Μη ιδανική	24	5	82,8					
	Ιδανική	5	27	84,4					
Overall Percentage				83,6					
a. The cut value is ,500									
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds		
							Lower	Upper	
Ηλικία (≤58 ετών)	1,056	,758	1,940	1	,164	2,875	,650	12,710	
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) (≤98,6%)	-1,676	,747	5,036	1	,025	,187	,043	,809	
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος (≤98,7%)	-1,840	,761	5,840	1	,016	,159	,036	,706	
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό κρουκατάψυξης (≤508x10 ³ /μl)	,509	,994	,262	1	,609	1,664	,237	11,683	
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg (≤6x10 ⁶ /μl)	,220	1,185	,034	1	,853	1,246	,122	12,723	
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό (≤2,4x10 ⁶ /μl)	-1,764	,832	4,496	1	,034	,171	,034	,875	
Βιώσιμα CD34+/Kg (TB)	,247	,445	,308	1	,579	1,280	,535	3,064	
Constant	,701	1,724	,165	1	,684	2,015			
a. Variable(s) entered on step 1: Βιώσιμα CD34+/Kg (TB).									

Μοντέλο 3β

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS), στην επίτευξη ιδανικής αιμοποιητικής αποκατάστασης μετά την AMMO, περιγράφεται στη εικόνα:

- Το μοντέλο 3β είναι πανομοιότυπο με το μοντέλο 3α, με την αντικατάσταση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με TB, από το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS. Προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=39,985$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 85,2% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 87,5%, ειδικότητα: 82,8%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 84,8%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 85,7%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και ο βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση στατιστικά σημαντικές ($p=0,031$ και $p=0,023$, αντίστοιχα)· η

βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντική ($p=0,054$). Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση. Η αύξηση του αριθμού των βιώσιμων CD34+/Kg που εγχύθηκαν συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση.

	Chi-square	df	Sig.
Model	39,985	7	,000

Observed	Αιματολογική αποκατάσταση	Predicted		Percentage Correct
		Μη ιδανική	Ιδανική	
Αιματολογική αποκατάσταση	Μη ιδανική	24	5	82,8
	Ιδανική	4	28	87,5
Overall Percentage				85,2

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	1,343	,829	2,624	1	,105	3,831	,754	19,455
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-1,790	,832	4,629	1	,031	,167	,033	,853
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)	-1,576	,819	3,706	1	,054	,207	,042	1,029
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό	,014	,954	,000	1	,989	1,014	,156	6,577
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^6 / \mu\text{l}$)	,726	,964	,567	1	,452	2,066	,312	13,666
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($\leq 2,4 \times 10^6 / \mu\text{l}$)	-1,512	,927	2,656	1	,103	,221	,036	1,358
Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)	,648	,284	5,195	1	,023	1,912	1,095	3,338
Constant	-,525	1,379	,145	1	,703	,591		

a. Variable(s) entered on step 1: Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS).

Μοντέλο 3γ

Το μοντέλο της διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με το οποίο ελέγχθηκε η επίδραση της ηλικίας, της βιωσιμότητας των CD34+ του περιφερικού αίματος, της βιωσιμότητας των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, του αριθμού των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης, της προγραμματισμένης δόση CD34+/Kg προς έγχυση και του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση (όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS), στην επίτευξη ιδανικής αιμοποιητικής αποκατάστασης μετά την AMMO, περιγράφεται στο πίνακα..

- Το μοντέλο 3γ είναι πανομοιότυπο με τα μοντέλα 3α και 3β, με την αντικατάσταση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με TB ή με FACS, αντίστοιχα, από τον

«πραγματικά» βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS. Προέκυψε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο ($\chi^2(7)=43,994$, $p<0,0005$), το οποίο προέβλεψε ορθώς το 86,9% των περιπτώσεων (ευαισθησία: 87,5%, ειδικότητα: 86,2%, θετική προγνωστική τιμή (PPV): 87,5%, αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 86,9%). Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν και ο «πραγματικά» βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση στατιστικά σημαντικές ($p=0,046$ και $p=0,0207$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση. Η αύξηση του αριθμού των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg που εγχύθηκαν συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση.

	Chi-square	df	Sig.
Model	43,994	7	,000

Observed	Αιματολογική αποκατάσταση	Predicted		Percentage Correct
		Μη ιδανική	Ιδανική	
Αιματολογική αποκατάσταση	Μη ιδανική	25	4	86,2
	Ιδανική	4	28	87,5
Overall Percentage				86,9

a. The cut value is ,500

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Odds	95% C.I. for Odds	
							Lower	Upper
Ηλικία (≤ 58 ετών)	1,450	,914	2,520	1	,112	4,264	,712	25,553
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος (ημέρα συλλογής) ($\leq 98,6\%$)	-1,559	,879	3,147	1	,076	,210	,038	1,177
Βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων φρέσκου προϊόντος ($\leq 98,7\%$)	-1,777	,889	3,991	1	,046	,169	,030	,967
Τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό ($\leq 508 \times 10^3 / \mu\text{l}$)	,103	,996	,011	1	,918	1,108	,157	7,803
"Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg ($\leq 6 \times 10^6 / \text{Kg}$)	,621	,935	,441	1	,507	1,860	,298	11,626
Αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό ($\leq 2,4 \times 10^6 / \text{Kg}$)	-1,611	1,017	2,513	1	,113	,200	,027	1,464
"Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)	,958	,352	7,404	1	,007	2,607	1,307	5,200
Constant	-,681	1,347	,255	1	,614	,506		

a. Variable(s) entered on step 1: "Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg (FACS).

3.5.3 Βέλτιστη ελάχιστη δόση CD34+/Kg για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση

Οι βέλτιστες ελάχιστες δόσεις CD34+/Kg που απαιτήθηκαν για την ιδανική βραχυπρόθεσμη, την ιδανική μακροπρόθεσμη και την ιδανική συνολική αιμοποιητική αποκατάσταση του συνόλου των ασθενών, που μελετήθηκαν, προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της καμπύλης ROC (ROC curve, Receiver operating characteristic curve). Προσδιορίστηκαν τόσο η ελάχιστη «προγραμματισμένη» δόση, όσο και οι ελάχιστες δόσεις των βιώσιμων (TB και FACS) και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg που απαιτήθηκαν. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των καμπυλών φαίνονται στον πίνακα...

Οι ασθενείς που πέτυχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων (>500/μl έως την D12) και των αιμοπεταλίων τους (>20x10³/μl έως την D14) είχαν λάβει «προγραμματισμένη» δόση 7,3x10⁶/Kg CD34+ κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 2,9-12,5x10⁶/Kg), δόση 3,9x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (TB) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 1,8-6,6x10⁶/Kg), δόση 3,9x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 1,0-9,3x10⁶/Kg), και δόση 3,2x10⁶/Kg CD34+ «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,4-9,1 x10⁶/Kg). Σύμφωνα με την ανάλυση της καμπύλης ROC η βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης είναι τα 5,3x10⁶ CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση), τα 2,7x10⁶ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, TB), τα 3,2x10⁶ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, FACS), και τα 1,9x10⁶ CD34+/Kg (δόση «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων, FACS).

Οι ασθενείς που πέτυχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων (>1500/μl έως την D30) και των αιμοπεταλίων τους (>140x10³/μl έως την D90) είχαν λάβει «προγραμματισμένη» δόση 6,7x10⁶/Kg CD34+ κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 2,7-12,5x10⁶/Kg), δόση 3,3x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (TB) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,4-6,6x10⁶/Kg), δόση 3,1x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,2-9,3x10⁶/Kg), και δόση 2,1x10⁶/Kg CD34+ «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,1-9,1 x10⁶/Kg). Σύμφωνα με την ανάλυση της καμπύλης ROC η βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής μακροπρόθεσμης αποκατάστασης είναι τα 5,1x10⁶ CD34+/Kg

(«προγραμματισμένη» δόση), τα $2,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, TB), τα $3,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, FACS), και τα $1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων, FACS).

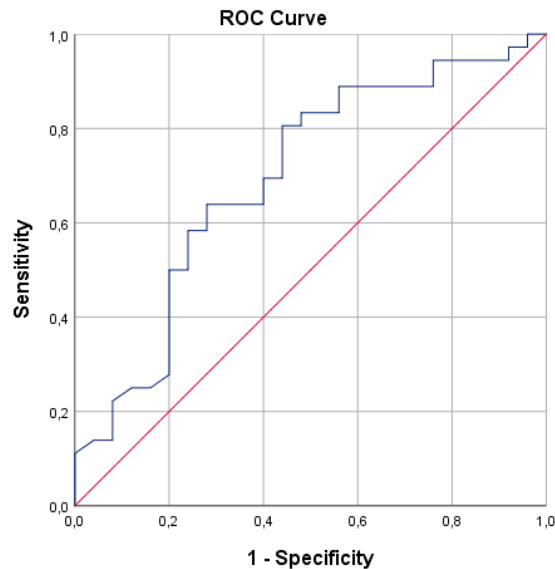
Οι ασθενείς που πέτυχαν ιδανική συνολική αιμοποιητική αποκατάσταση είχαν λάβει «προγραμματισμένη» δόση $7,4 \times 10^6$ /Kg CD34+ κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $2,9-12,5 \times 10^6$ /Kg), δόση $4,0 \times 10^6$ /Kg CD34+ βιώσιμων (TB) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $1,5-6,6 \times 10^6$ /Kg), δόση $4,1 \times 10^6$ /Kg CD34+ βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $1,0-9,3 \times 10^6$ /Kg), και δόση $3,3 \times 10^6$ /Kg CD34+ «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-9,1 \times 10^6$ /Kg). Σύμφωνα με την ανάλυση της καμπύλης ROC η βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής αιμοποιητικής αποκατάστασης είναι τα $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση), τα $2,7 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, TB), τα $3,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, FACS), και τα $2,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων, FACS).

Συμπερασματικά, η βέλτιστη ελάχιστη δόση CD34+/Kg για την επίτευξη ιδανικής αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά την AMMO, ήταν τα:

- $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg, όπως μετρήθηκαν με FACS στο φρέσκο προϊόν («προγραμματισμένη» δόση),
- $2,7 \times 10^6$ CD34+/Kg βιώσιμων κυττάρων, όπως μετρήθηκαν με TB,
- $3,4 \times 10^6$ CD34+/Kg βιώσιμων κυττάρων, όπως μετρήθηκαν με FACS, και
- $2,9 \times 10^6$ CD34+/Kg «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων, όπως μετρήθηκαν με FACS.

Πίνακας 3.23 Ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση σε σχέση με τη δόση των CD34/Kg στην AMMO				
	«Προγραμματισμένη» δόση CD34+(x10⁶)/Kg	Δόση βιώσιμων (TB) CD34+(x10⁶)/Kg	Δόση βιώσιμων (FACS) CD34+(x10⁶)/Kg	Δόση «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) CD34+(x10⁶)/Kg
Ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση αιμοποίησης				
Μέση τιμή±SD	7,2±2,3	4,0±1,3	4,0±2,1	3,3±2,0
Διάμεση τιμή (εύρος)	7,3 (2,9-12,5)	3,9 (1,8-6,6)	3,9 (1,0-9,3)	3,2 (0,4-9,1)
Βέλτιστη ελάχιστη τιμή	5,3	2,7	3,2	1,9
Ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση αιμοποίησης				
Μέση τιμή±SD	6,8±2,3	3,6±1,5	3,4±2,3	2,7±2,1
Διάμεση τιμή (εύρος)	6,7 (2,7-12,5)	3,3 (0,4-6,6)	3,1 (0,2-9,3)	2,1 (0,1-9,1)
Βέλτιστη ελάχιστη τιμή	5,1	2,4	3,4	1,9
Ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση				
Μέση τιμή±SD	7,3±2,3	4,1±1,3	4,2 ±2,2	3,5 ±2,0
Διάμεση τιμή (εύρος)	7,4 (2,9-12,5)	4,0 (1,5-6,6)	4,1 (1,0-9,3)	3,3 (0,4-9,1)
Βέλτιστη ελάχιστη τιμή	6,9	2,7	3,4	2,9

Βέλτιστη ελάχιστη «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg για την ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



Diagonal segments are produced by ties.

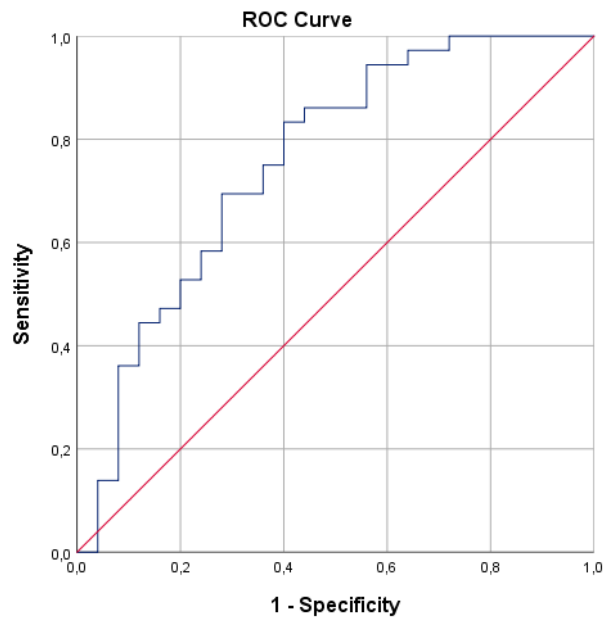
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
4,440	,889	,560
4,535	,861	,560
4,705	,833	,560
4,930	,833	,520
5,090	,833	,480
5,140	,806	,480
5,305	,806	,440
5,465	,778	,440
5,550	,750	,440
5,685	,722	,440
5,910	,694	,440
6,085	,694	,400
6,170	,667	,400
6,355	,639	,400
6,525	,639	,360
6,580	,639	,320
6,645	,639	,280
6,717	,611	,280
6,737	,583	,280
6,910	,583	,240
7,165	,556	,240
7,270	,528	,240
7,300	,500	,240
7,325	,500	,200

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση βιώσιμων (TB) CD34+/Kg για την ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



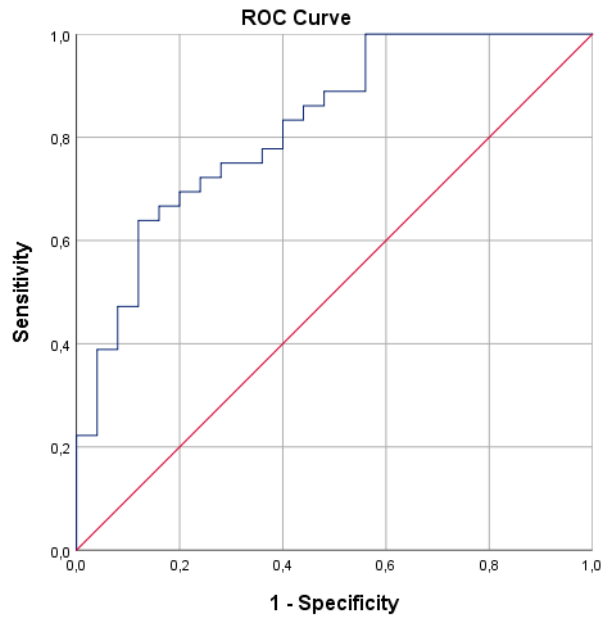
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Βιώσιμα CD34+/Kg (TB)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
2,6055	,861	,520
2,6095	,861	,480
2,6160	,861	,440
2,6795	,833	,440
2,7500	,833	,400
2,7685	,806	,400
2,7790	,778	,400
2,8130	,750	,400
2,8800	,750	,360
3,0475	,722	,360
3,1935	,694	,360
3,2335	,694	,320
3,2750	,694	,280
3,2995	,667	,280
3,3090	,639	,280
3,3160	,611	,280

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση βιώσιμων (FACS) CD34+/Kg για την ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



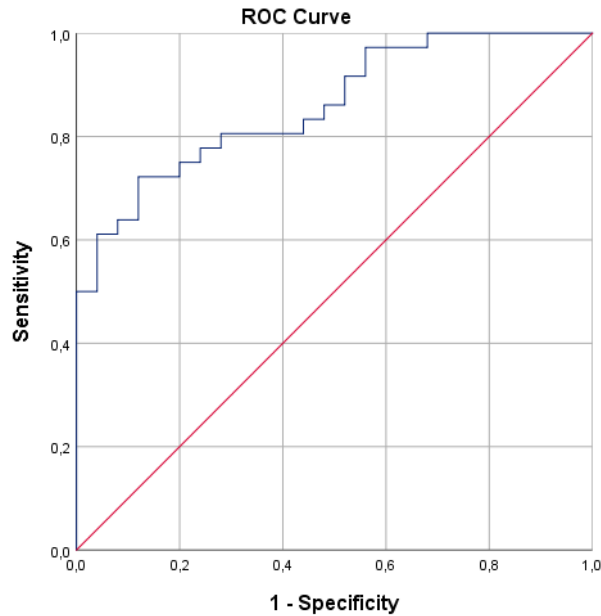
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
2,2210	,750	,280
2,3010	,722	,280
2,3325	,722	,240
2,5715	,694	,240
2,8030	,694	,200
2,8265	,667	,200
2,9395	,667	,160
3,0800	,639	,160
3,1815	,639	,120
3,2760	,611	,120

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) CD34+/Kg για την ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



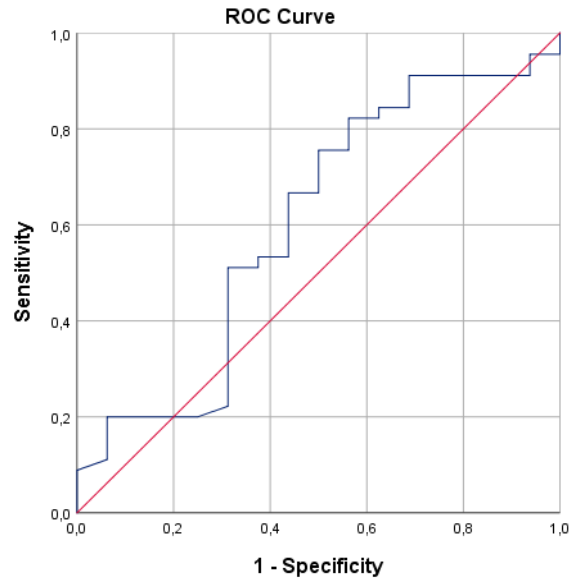
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): "Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg
(FACS)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
1,5480	,806	,280
1,6270	,778	,280
1,7015	,778	,240
1,7710	,750	,240
1,8280	,750	,200
1,8395	,722	,200
1,8890	,722	,160
1,9415	,722	,120
1,9580	,694	,120
1,9730	,667	,120
2,0340	,639	,120
2,4000	,639	,080
2,7640	,611	,080
2,8865	,611	,040
3,2225	,500	,000

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg για την ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



Diagonal segments are produced by ties.

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg

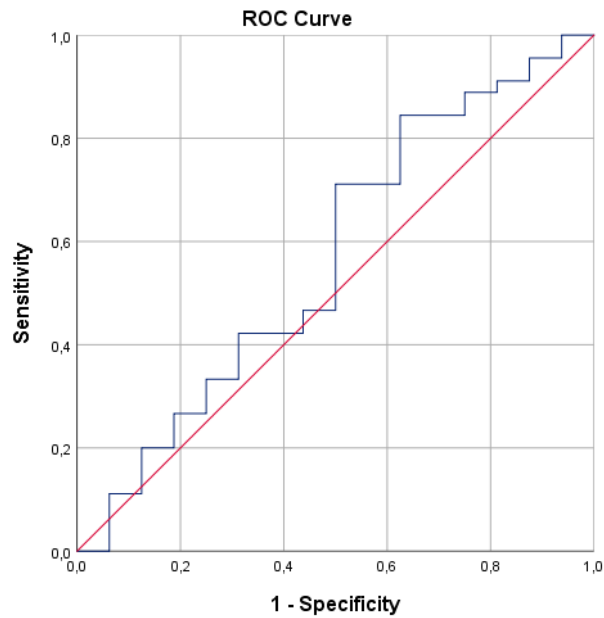
Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
4,440	,822	,563
4,535	,800	,563
4,705	,778	,563
4,930	,756	,563
5,090	,756	,500
5,140	,733	,500
5,305	,711	,500
5,465	,689	,500
5,550	,667	,500

The test result variable(s): "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1.

All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση βιώσιμων (TB) CD34+/Kg για την ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



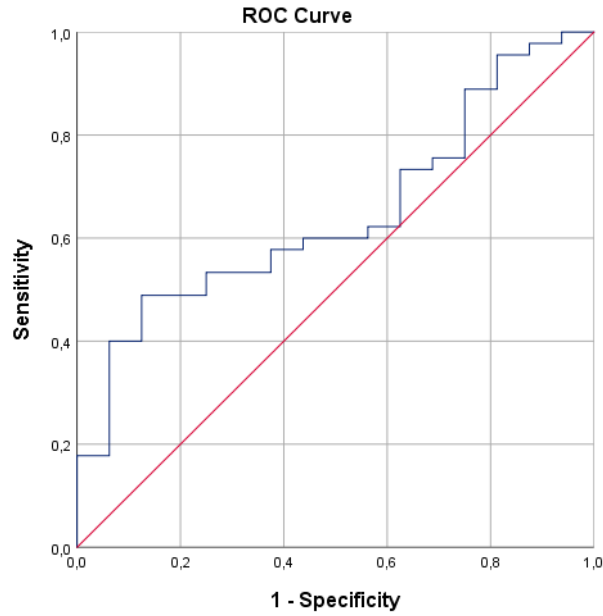
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Βιώσιμα CD34+/Kg (TB)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
2,0120	,889	,750
2,1595	,867	,750
2,2580	,844	,750
2,3580	,844	,688
2,4280	,844	,625
2,4975	,822	,625
2,5590	,800	,625
2,5920	,778	,625
2,6055	,756	,625
2,6095	,733	,625
2,6160	,711	,625

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση βιώσιμων (FACS) CD34+/Kg για την ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



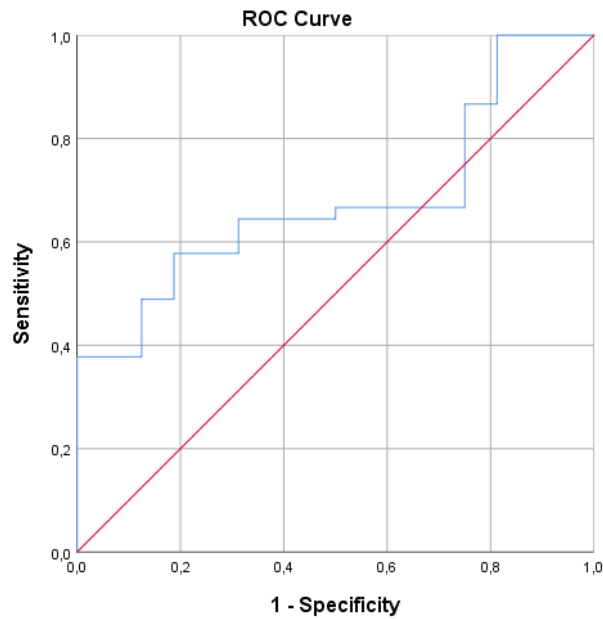
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
2,9395	,533	,250
3,0800	,511	,250
3,1815	,489	,250
3,2760	,489	,188
3,3770	,489	,125
3,4915	,467	,125
3,6775	,444	,125
3,8580	,422	,125
3,9440	,400	,125
4,0270	,400	,063
4,1520	,378	,063
4,3800	,356	,063
4,5690	,333	,063
4,6460	,311	,063
4,8000	,289	,063
4,9360	,267	,063
5,2060	,244	,063

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) CD34+/Kg για την ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



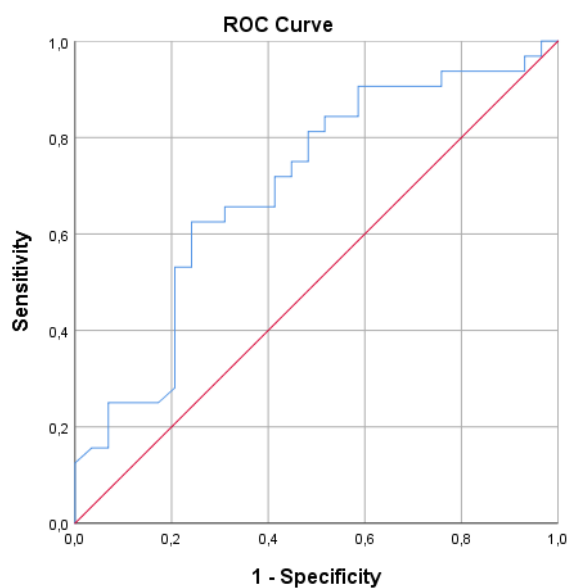
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): "Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
1,6270	,644	,375
1,7015	,644	,313
1,7710	,622	,313
1,8280	,600	,313
1,8395	,578	,313
1,8890	,578	,250
1,9415	,578	,188
1,9580	,556	,188
1,9730	,533	,188
2,0340	,511	,188
2,4000	,489	,188
2,7640	,489	,125
2,8865	,467	,125
2,9715	,444	,125
3,0390	,422	,125
3,1150	,400	,125

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg για την ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



Diagonal segments are produced by ties.

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg

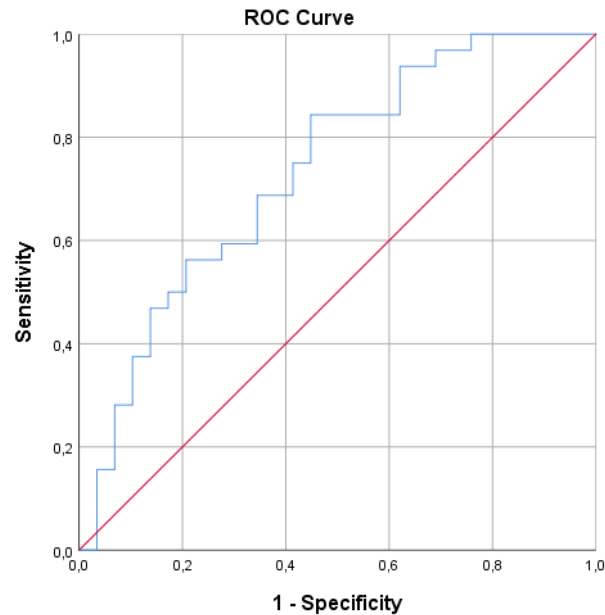
Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
6,525	,656	,379
6,580	,656	,345
6,645	,656	,310
6,717	,625	,310
6,737	,625	,276
6,910	,625	,241
7,165	,594	,241
7,270	,563	,241
7,300	,531	,241
7,325	,531	,207
7,375	,500	,207
7,445	,469	,207
7,505	,438	,207
7,730	,406	,207

The test result variable(s): "Προγραμματισμένη" δόση CD34+/Kg has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1.

All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση βιώσιμων (TB) CD34+/Kg για την ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



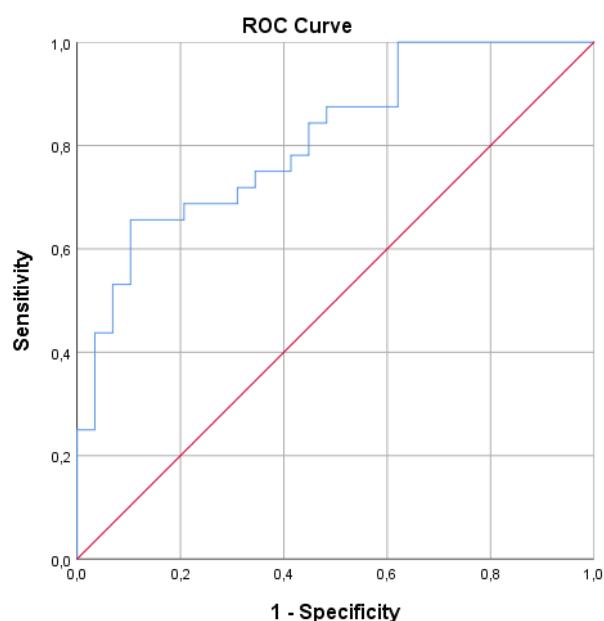
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Βιώσιμα CD34+/Kg (TB)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
2,2580	,938	,690
2,3580	,938	,655
2,4280	,938	,621
2,4975	,906	,621
2,5590	,875	,621
2,5920	,844	,621
2,6055	,844	,586
2,6095	,844	,552
2,6160	,844	,517
2,6795	,844	,483
2,7500	,844	,448
2,7685	,813	,448
2,7790	,781	,448
2,8130	,750	,448
2,8800	,750	,414
3,0475	,719	,414

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση βιώσιμων (FACS) CD34+/Kg για την ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



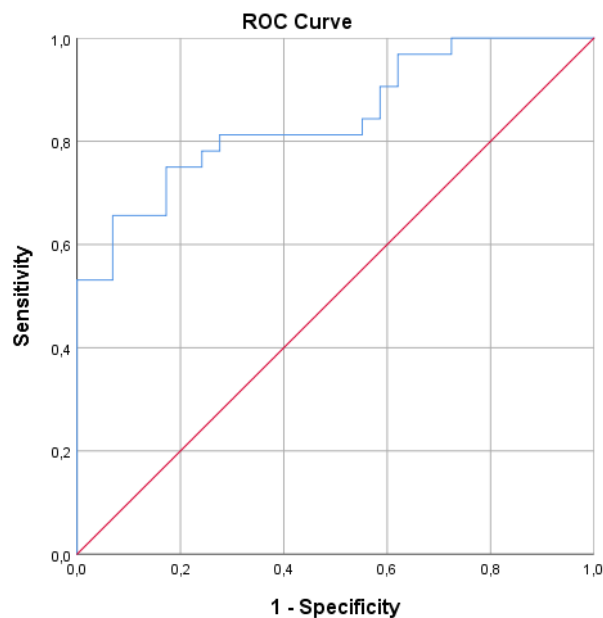
Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Βιώσιμα CD34+/Kg (FACS)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
3,0800	,656	,207
3,1815	,656	,172
3,2760	,656	,138
3,3770	,656	,103
3,4915	,625	,103
3,6775	,594	,103
3,8580	,563	,103
3,9440	,531	,103
4,0270	,531	,069
4,1520	,500	,069
4,3800	,469	,069
4,5690	,438	,069
4,6460	,438	,034
4,8000	,406	,034

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) CD34+/Kg για την ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση με ανάλυση καμπύλης ROC



Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): "Πραγματικά" βιώσιμα CD34+/Kg
(FACS)

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
1,8890	,750	,207
1,9415	,750	,172
1,9580	,719	,172
1,9730	,688	,172
2,0340	,656	,172
2,4000	,656	,138
2,7640	,656	,103
2,8865	,656	,069
2,9715	,625	,069
3,0390	,594	,069
3,1150	,563	,069
3,1380	,531	,069
3,2225	,531	,034

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO

Γενικά

Η ταχεία και ολοκληρωμένη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων αποτελεί το ορόσημο της επιτυχημένης αιματολογικής αποκατάστασης έπειτα από την αυτόλογη μεταμόσχευση κινητοποιημένων αιμοποιητικών κυττάρων (27). Επιτυγχάνεται δε με τη συνδρομή πληθώρας δεσμευμένων προγονικών κυττάρων, που περιέχονται μεταξύ των κινητοποιημένων ΑΑΚ, τα οποία δύναται να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε περίπου 7-10 μέρες μέσω της μυελικής, της ερυθρής και της μεγακαρυωτικής σειράς σε ώριμα κύτταρα του αίματος (78). Η αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια, καθένα από τα οποία σχετίζεται με προγονικά κύτταρα σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Το πρώτο στάδιο αφορά στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων, και εξαρτάται από διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα, δεσμευμένα προς συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, τα οποία εξασφαλίζουν ταχεία, παροδική αποκατάσταση, ενώ το δεύτερο στάδιο αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση, και εξαρτάται από λιγότερο διαφοροποιημένα, μη δεσμευμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να υποστηρίξουν μια μακρά και σταθερή αποκατάσταση (79). Η κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης μετά την AMMO αποτελεί δείκτη ποιότητας τόσο του κλινικού όσο και του εργαστηριακού τμήματος μιας μονάδας μεταμόσχευσης (27).

Κινητική αποκατάστασης αριθμού ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων μετά την AMMO

Γενικά, η διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων μετά την AMMO, δηλαδή η πρώτη ημέρα από τις τρεις συνεχόμενες ημέρες, όπου ο αριθμός τους στο περιφερικό αίμα είναι άνω των 500/μl, είναι η D10 (εύρος 9-11 ημέρες), και η διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων, δηλαδή η πρώτη ημέρα από τρεις συνεχόμενες ημέρες όπου ο αριθμός τους στο περιφερικό

αίμα είναι άνω των $20 \times 10^3/\mu\text{l}$ χωρίς μετάγγιση, η D13 (εύρος 12-22) (80). Τα παραπάνω αφορούν ασθενείς στους οποίους από την επομένη ημέρα της έγχυσης των AAK χορηγείται συστηματικά και αυξητικός παράγοντας G-CSF, όπως οι ασθενείς της παρούσας μελέτης. Οι χρόνοι αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων των ασθενών της παρούσας μελέτης συμπίπτουν με τους αντίστοιχους χρόνους των περισσότερων μελετών (80-82).

Συγκεκριμένα, η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων μετά την ημέρα επανέγχυσης των AAK, στο σύνολο των ασθενών, ήταν η D10. Το 80,3% των ασθενών εξήλθε από την ουδετεροπενία σε 8-12 ημέρες, το 8,2% σε 13-16 ημέρες, το 9,8% σε 17-27 ημέρες ενώ το 1,6% (ένας ασθενής) δεν εξήλθε ποτέ. Παράλληλα, η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων, στο σύνολο των ασθενών, ήταν η D14. Το 60,6% των ασθενών εξήλθε από την θρομβοπενία σε 8-14 ημέρες, το 26,2% σε 16-20 ημέρες, το 9,8% σε 21-29 ημέρες, το 1,6% σε 50 ημέρες και το 1,6% δεν εξήλθε ποτέ. Το 18% των ασθενών είχε ήδη αποκαταστήσει τον αριθμό τόσο των ουδετερόφιλων όσο και των αιμοπεταλίων του έως τη διάμεση ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων (D10), ενώ το 60,7% έως τη διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων (D14). Βέλτιστη αποκατάσταση βραχυπρόθεσμης αιμοποίησης, δηλαδή ταυτόχρονη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων άνω των $500/\mu\text{l}$ μέχρι τη D10 και του αριθμού των αιμοπεταλίων άνω των $20 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι τη D14, πέτυχε το 39,3% των ασθενών. Υπήρξε μια στατιστικά σημαντική μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ της αποκατάστασης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων· η αποκατάσταση των αιμοπεταλίων ακολούθησε την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, στην πλειοψηφία των ασθενών, με μέση διαφορά 3 ± 4 ημερών. Στο 5% των ασθενών η αποκατάσταση των αιμοπεταλίων προηγήθηκε της αποκατάστασης των ουδετερόφιλων κατά μία ημέρα, ενώ στο 13% των ασθενών οι ημέρες αποκατάστασης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων συνέπεσαν. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τη γενική διαπίστωση πως η καθυστερημένη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων μετά την AMMO είναι φαινόμενο πιο σύνηθες σε σχέση με την καθυστερημένη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, που παρατηρείται πιο σπάνια (83).

Μακροπρόθεσμα, το 86,9% του συνόλου των ασθενών, είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl μέχρι τη D30 μετά την έγχυση των AAK, το 95,1% των ασθενών είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl μέχρι τη D60, το 96,7% των ασθενών είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl μέχρι τη D90 και άνω των 2000/μl μέχρι τη D180· η διάμεση ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων >500/μl όλων των ασθενών, που πέτυχαν μακροπρόθεσμα αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων τους, ήταν η D10. Αντίθετα, το 11,5% των ασθενών με αιματολογική αποκατάσταση, δεν είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl έως τη D30 (με διάμεση ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων >500/μl την D12), το 3,3% δεν είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl έως τη D60 (με διάμεση ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων >500/μl την D18), ενώ το 1,6% δεν είχε αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl έως τη D90 (με διάμεση ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων >500/μl την D27)· σε έναν ασθενή (1,6%) δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων. Σύμφωνα με τους Zubair και συν., ο χρόνος μέχρι την αποκατάσταση της ουδετεροπενίας μετά την AMMO αποτελεί το βασικότερο in vivo δείκτη για τη μακροπρόθεσμα αποκατάσταση των ουδετερόφιλων (84). Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη στη διάμεση ημέρα αποκατάστασης της ουδετεροπενίας μεταξύ εκείνων που είχαν ή δεν είχαν αριθμό ουδετερόφιλων άνω των 1500/μl έως τις D30, D60, και D90, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Όσο αφορά στα αιμοπετάλια, το 90,2% των ασθενών είχε αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 50×10^3 /μl μέχρι τη D30, το 86,9% των ασθενών είχε αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 100×10^3 /μl μέχρι τη D60, το 78,7% των ασθενών είχε αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 140×10^3 /μl μέχρι τη D90 και μέχρι τη D180· η διάμεση ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων τους > 20×10^3 /μl ήταν η D14. Αντίθετα, το 8,2% των ασθενών δεν είχαν αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 50/μl έως τη D30 ή άνω των 100/μl έως τη D60. Οι ασθενείς αυτοί είχαν διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων > 20×10^3 /μl τη D24 και τη D20, αντίστοιχα, με διαφορές σε σχέση με την διάμεση ημέρα αποκατάστασης της θρομβοπενίας, εκείνων που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 50/μl έως τη D30 ή άνω των 100/μl έως τη D60, στατιστικά σημαντικές ($p < 0,0005$ και $p = 0,001$, αντίστοιχα). Το 19,7% των ασθενών δεν είχε αριθμό αιμοπεταλίων άνω των

140×10³/μl έως τη D90 ή τη D180. Οι ασθενείς αυτοί είχαν διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων >20×10³/μl τη D16, μια διαφορά σε σχέση με την διάμεση ημέρα αποκατάστασης της θρομβοπενίας, εκείνων που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων άνω των 140×10³/μl έως τη D90 ή τη D180, στατιστικά σημαντική (p=0,003). Έως τη D180 το 8,2% των ασθενών δεν είχε περισσότερα από 100×10³/μl αιμοπετάλια, το 6,6% δεν είχε περισσότερα από 50×10³/μl, ενώ στο 6,6% δεν αποκαταστάθηκε ο αριθμός των αιμοπεταλίων άνω των 50×10³/μl. Σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση των αποτελεσμάτων, ο χρόνος αποκατάστασης της θρομβοπενίας μετά την AMMO θα μπορούσε ίσως να αποτελέσει in vivo δείκτη για τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων· ωστόσο στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σχετικά άρθρα.

Παράγοντες που επηρεάζουν την αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO

Πέρα από την κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης, εξετάστηκαν παράγοντες που ενδεχομένως την επηρεάζουν, όπως χαρακτηριστικά των ασθενών (φύλο, ηλικία, νόσημα), η δυναμική κινητοποίησης κατά τη συλλογή των AAK (πτωχή, καλή, πολύ καλή), η κατάσταση της νόσου στην AMMO, το είδος της μεθεταχείρισης, χαρακτηριστικά των μοσχευμάτων (ο όγκος του αποψυγμένου κυτταρικού προϊόντος, ο συνολικός αριθμός των ασκών που αποψύχθηκαν, ο αριθμός των CD34+/Kg, που περιέχονταν ανά ασκό, η χρονική διάρκεια κρυοσυντήρησης τους) και ο συνολικός «προγραμματισμένος» αριθμός των CD34+/Kg που χορηγήθηκαν.

Όσο αφορά στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο φύλων, μεταξύ πτωχών, καλών ή πολύ καλών κινητοποιητών και μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν ή δε βρίσκονταν σε ύφεση πριν την AMMO. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του όγκου του αποψυγμένου κυτταρικού προϊόντος που εγχύθηκε στην AMMO ή του αριθμού των ασκών που αποψύχθηκαν, ή της διάρκειας κρυοσυντήρησης τους. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μέτρια θετική συσχέτιση της ηλικίας με την αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων, δηλαδή αύξηση της ηλικίας σχετίστηκε με αύξηση των ημερών, που απαιτήθηκαν για αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων. Οι ασθενείς

ηλικίας ≤ 53 ετών χρειάστηκαν μια ημέρα λιγότερη από τους ασθενείς ηλικίας >53 ετών, μια διαφορά στατιστικά σημαντική. Στατιστικά σημαντικές ήταν οι διαφορές και μεταξύ των ασθενών με λέμφωμα ή πολλαπλό μυέλωμα. Οι ασθενείς με LH και NHL είχαν ουδετερόφιλα $\geq 500/\mu\text{l}$ δυο ημέρες και μια ημέρα, αντίστοιχα, νωρίτερα από τους ασθενείς με MM· η μεταξύ των ασθενών με LH και NHL διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Σε αντιστοιχία με τις διαφορές βάσει νοσήματος, οι ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία Tri-Alkylator και BEAM αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους τρεις και μια ημέρα νωρίτερα, αντίστοιχα, από τους ασθενείς που έλαβαν Melphalan, διαφορά στατιστικά σημαντική. Η συσχέτιση της μελφαλάνης με παράταση της ουδετεροπενίας, παρότι είναι πιο ήπια μεθεραπεία συγκριτικά με το Tri-Alkylator και το BEAM, πιθανότατα οφείλεται στη μεγαλύτερη ηλικία των ασθενών με MM. Παρατηρήθηκε ακόμα, μια στατιστικά σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των CD34+/Kg, που περιέχονταν ανά ασκό με την ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων $>500/\mu\text{l}$: μικρότερος αριθμός CD34+/Kg ανά ασκό σχετίστηκε με μεγαλύτερο αριθμό ημερών μέχρι την αποκατάσταση.

Όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, δε παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο φύλων, μεταξύ ασθενών διαφορετικής ηλικίας, μεταξύ ασθενών με διαφορετικό νόσημα, μεταξύ πτωχών, καλών ή πολύ καλών κινητοποιητών, μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν ή δε βρίσκονταν σε ύφεση πριν την AMMO, ούτε υπήρξε συσχέτιση με τη διάρκεια κρυσυντήρησης. Με στατιστικά σημαντική διαφορά μικρότερο ποσοστό ασθενών που έλαβαν Tri-Alkylator είχαν ουδετερόφιλα $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως τη D90 και $\geq 2000/\mu\text{l}$ έως τη D180 συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς. Παρατηρήθηκε επίσης μια σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση του όγκου του κυτταρικού προϊόντος που εγχύθηκε με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων έως την D60: αύξηση του όγκου σχετίστηκε με μείωση του ποσοστού των ασθενών που είχαν ουδετερόφιλα $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως τη D60. Αν και δεν υπήρξε αντίστοιχη συσχέτιση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων έως τη D30, το 94,4% των ασθενών, που έλαβαν $\leq 360\text{ml}$, είχε αριθμό ουδετερόφιλων >1500 έως τη D30 σε αντίθεση με το 76% των ασθενών, που έλαβαν $>360\text{ml}$, μια διαφορά στατιστικά σημαντική: τα ποσοστά των ασθενών στους οποίους υπήρξε ή όχι αποκατάσταση

των ουδετερόφιλων έως τις D60, 90 και 180 δε διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των δυο ομάδων ασθενών. Παρατηρήθηκε ακόμα μια σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση του αριθμού των ασκών με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων έως τη D60· αύξηση του αριθμού των ασκών σχετίστηκε με μικρότερο ποσοστό ασθενών που είχαν ουδετερόφιλα $>1500/\mu\text{l}$ έως τη D60. Βέβαια, μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν ≤ 3 και > 3 ασκοί κυτταρικού προϊόντος, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μια στατιστικά σημαντική μικρή θετική συσχέτιση του αριθμού των CD34/Kg ανά ασκό με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων $>1500/\mu\text{l}$ έως τη D30 και τη D60 παρατηρήθηκε επίσης· αύξηση του αριθμού των CD34/Kg ανά ασκό σχετίστηκε με αύξηση του ποσοστού των ασθενών που είχαν ουδετερόφιλα $>1500/\mu\text{l}$ έως τις D30 και D60.

Όσο αφορά στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων, δε παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο φύλων, μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν ή δε βρίσκονταν σε ύφεση πριν την AMMO, μεταξύ των ασθενών που έλαβαν διαφορετική μεθαθεραπεία, ούτε υπήρξε συσχέτιση με τη διάρκεια κρυσταλλοποίησης. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μέτρια θετική συσχέτιση της ηλικίας με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων· οι ασθενείς ηλικίας ≤ 53 ετών αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων μια ημέρα νωρίτερα από τους ασθενείς ηλικίας >53 ετών, μια διαφορά στατιστικά σημαντική. Η ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών με διαφορετικά νοσήματα· οι ασθενείς με LH είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$ τρεις ημέρες νωρίτερα από τους ασθενείς με MM και 4 ημέρες νωρίτερα από τους ασθενείς με NHL, διαφορές στατιστικά σημαντικές, ενώ η μεταξύ των ασθενών με MM και NHL διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Οι πολύ καλοί κινητοποιητές είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$ δύο ημέρες νωρίτερα από τους καλούς κινητοποιητές και τρεις ημέρες νωρίτερα από τους πτωχούς κινητοποιητές, διαφορές στατιστικά σημαντικές, ενώ η μεταξύ των πτωχών και των καλών κινητοποιητών διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μικρή θετική συσχέτιση του όγκου του κυτταρικού προϊόντος και του αριθμού των ασκών που αποψύχθηκαν με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων, δηλαδή με την αύξηση του συνολικού όγκου ή του αριθμού των ασκών αυξήθηκαν και οι μέρες

που απαιτήθηκαν μέχρι ο αριθμός των αιμοπεταλίων να είναι $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$. Μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν $\leq 360\text{ml}$ και $>360\text{ml}$ κυτταρικού προϊόντος υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$: η πρώτη ομάδα προηγήθηκε της δεύτερης κατά δυο ημέρες. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των $\text{CD34}^+/\text{Kg}$ που περιέχονταν ανά ασκό με την ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$: μείωση του αριθμού των $\text{CD34}^+/\text{Kg}$ ανά ασκό σχετίστηκε με παράταση της θρομβοπενίας. Οι ασθενείς που έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό καθυστέρησαν κατά τρεις ημέρες στην αποκατάσταση της θρομβοπενίας σε σχέση με εκείνους που έλαβαν $>2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό, μια στατιστικά σημαντική διαφορά. Όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο φύλων, μεταξύ ασθενών με διαφορετικό νόσημα, μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν ή δε βρίσκονταν σε ύφεση πριν την AMMO, μεταξύ των ασθενών που έλαβαν διαφορετική μεθεταβολική θεραπεία, ούτε υπήρξε συσχέτιση με τη διάρκεια κρυσταλλοποίησης. Υπήρξε μια στατιστικά σημαντική μικρή, αρνητική συσχέτιση της αποκατάστασης των αιμοπεταλίων έως τη D90 ή/και τη D180 με την ηλικία: μόλις το 66,7% των ασθενών άνω των 53 ετών είχε αριθμό αιμοπεταλίων $>140 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D90 και τη D180, έναντι των νεότερων, μεταξύ των οποίων το 90,3% είχε αποκαταστήσει τον αριθμό των αιμοπεταλίων, μια διαφορά στατιστικά σημαντική. Οι πολύ καλοί κινητοποιητές είχαν στο σύνολό τους $>100 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια μέχρι τη D60, σε αντίθεση με τους καλούς και τους πτωχούς κινητοποιητές, μεταξύ των οποίων είχαν αιμοπετάλια $>100 \times 10^3/\mu\text{l}$ το 79,2% και το 62,5%, αντίστοιχα, διαφορές στατιστικά σημαντικές. Με επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά, το 96,6% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε αιμοπετάλια $>140 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι τις D90 και D180 σε αντίθεση με το μόλις 62,5% των καλών και πτωχών κινητοποιητών. Μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν $\leq 360\text{ml}$ και $>360\text{ml}$ κυτταρικού προϊόντος, η πρώτη ομάδα είχε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά ασθενών με αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $>50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D30, $>100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D60, και $>140 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D90 και τη D180. Παρατηρήθηκε επίσης μια σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση με την αποκατάσταση των αιμοπεταλίων έως τη D60 καθώς και μια σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση με την αποκατάσταση των

αιμοπεταλίων έως τη D90 και τη D180· αύξηση των ασκών σχετίστηκε με μείωση του ποσοστού των ασθενών με μακροπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων, ενώ μεταξύ των ασθενών στους οποίους εγχύθηκαν ≤ 3 και > 3 ασκοί κυτταρικού προϊόντος, υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $> 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D60 και στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων $> 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D90 και D180. Με στατιστικά σημαντικές διαφορές, το 96,9% των ασθενών που έλαβαν $> 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό έναντι του 75,9% των ασθενών που έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό είχε $> 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D60 και το 93,8% έναντι του 62,1% είχε $> 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ αιμοπετάλια έως την D90 και την D180, διαφορές στατιστικά σημαντικές.

Συμπερασματικά, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, προέκυψε ότι από τους παράγοντες που εξετάστηκαν, το φύλο, η κατάσταση της νόσου στη AMMO και η διάρκεια της κρυσυντήρησης δεν είχαν καμία επίδραση στην αιματολογική αποκατάσταση των υπό μελέτη ασθενών. Η αύξηση της ηλικίας σχετίστηκε με παράταση της ουδετεροπενίας και της θρομβοπενίας αλλά και με υστέρηση στην μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων. Το πολλαπλό μύελωμα σχετίστηκε επίσης με παράταση της ουδετεροπενίας και της θρομβοπενίας, αλλά όχι με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση· φυσικά η ηλικία και το νόσημα έχουν ισχυρή συσχέτιση. Η δυναμική της κινητοποίησης σχετίστηκε με τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση μόνο των αιμοπεταλίων, όμως οι σημαντικές διαφορές ήταν μεταξύ των πολύ καλών κινητοποιητών και των μη πολύ καλών κινητοποιητών, και όχι μεταξύ των πτωχών κινητοποιητών και των υπολοίπων· ενδεχομένως λοιπόν οι διαφορές να αντανακλούν τις αντίστοιχες διαφορές μεταξύ των ασθενών που έλαβαν υψηλές ή χαμηλότερες δόσεις CD34+/Kg. Η μεθεταπεία με Tri-alkylator σχετίστηκε με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων. Ο συνολικός όγκος του κυτταρικού προϊόντος και ο αριθμός των ασκών, που αποψύχθηκαν και εγχύθηκαν, συσχετίστηκαν με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων αλλά και με τη συνολική μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση. Ο αριθμός των CD34+/Kg, ανά ασκό σχετίστηκε με τη συνολική αιματολογική αποκατάσταση, βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη, τόσο των ουδετερόφιλων όσο και των αιμοπεταλίων.

Έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες αναφορικά με παράγοντες που επηρεάζουν την αποκατάσταση της αιμοποίησης μετά την ΑΜΜΟ. Οι περισσότερες αναφέρονται στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων, κυρίως των αιμοπεταλίων, και αρκετά λιγότερες αναφέρονται στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση. Οι Rosenthal και συν. εντόπισαν σε ασθενείς με καθυστερημένη αιματολογική αποκατάσταση ή ακόμα και με αποτυχία εγκατάστασης του μοσχεύματος μετά την ΑΜΜΟ, ένα διακριτό μορφολογικό εύρημα του μυελού των οστών, ένα διάχυτο πολλαπλασιασμό των ιστιοκυττάρων (85). Οι Bentley και συν. περιγράφουν πώς η βλάβη του μυελού των οστών, που οφείλεται σε νεοπλασματική διήθηση, χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία, δεν οδηγεί μόνο στην κινητοποίηση και συλλογή περιορισμένου αριθμού CD34+ κυττάρων αλλά επίσης οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού να υποστηρίξει την εγκατάσταση των μεταμοσχευμένων ΑΑΚ (86). Καθυστερημένη αιματολογική αποκατάσταση διαπίστωσαν και οι Tricot και συν., σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα που έλαβαν θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες διάρκειας μεγαλύτερης από 6 μήνες (87). Αργή αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων αναφέρεται από τους Watts και συν. σε ασθενείς με πρότερη θεραπεία με το ισχυρά τοξικό για τα αρχέγονα κύτταρα mini-BEAM. Θεωρούν πως, εφόσον η θεραπεία με mini-BEAM δεν είχε καμία επίδραση στη κινητοποίηση των ΑΑΚ, η προηγηθείσα έκθεση σε συγκεκριμένα μυελοτοξικά σκευάσματα, είτε οδηγεί σε βλάβη των αναγεννητικών προγονικών κυττάρων χωρίς εμφανή επίδραση στο συνολικό αριθμό των CD34+ κυττάρων ή επηρεάζει αρνητικά το μικροπεριβάλλον του μυελού (82). Στατιστικά σημαντικά αρνητικά αποτελέσματα στην ταχεία αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων διαπίστωσαν και οι Gertz και συν. σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα οι οποίοι έλαβαν μελφαλάνη από του στόματος πριν τη συλλογή των ΑΑΚ (88). Οι Klaus και συν. θεωρούν πως σημαντικοί παράγοντες για την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων είναι η προγενέστερη θεραπεία με ακτινοβολία, το χρονικό διάστημα θεραπείας με αλκυλιωτικούς παράγοντες και οι κύκλοι χημειοθεραπείας (89). Οι Ungerstedt και συν. θεωρούν ως το σημαντικότερο παράγοντα για την αποκατάσταση της θρομβοπενίας το νόσημα. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, οι ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα χρειάζονται σημαντικά λιγότερο χρόνο για τη αποκατάσταση του αριθμού

των αιμοπεταλίων τους, παρότι έχουν μεγαλύτερη ηλικία συγκριτικά με ασθενείς με λεμφώματα, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στο ότι δεν είναι βαριά πολυθεραπευμένοι πριν την AMMO και στο ότι η μελφαλάνη που λαμβάνουν ως μεγαθεραπευτικό σχήμα είναι λιγότερο μυελοτοξικό από το BEAM, που λαμβάνουν οι ασθενείς με λεμφώματα (Ungerstedt 2012 an analysis of factors influencing stem). Στη μελέτη των Weaver και συν. οι ασθενείς που έλαβαν υψηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης, thiopera, και καρβοπλατίνη είχαν στατιστικά σημαντικά ταχύτερη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων από τους ασθενείς, που έλαβαν άλλα σχήματα (90).

Στα συμπεράσματά τους οι Yamaguchi και συν. και οι Watts και συν. αναφέρουν πως ο μεγάλος αριθμός των απαραίτητων συλλογών για τη συλλογή του ελάχιστου απαιτούμενου αριθμού CD34+ κυττάρων (>3ημέρες), σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με μεγαλύτερο χρόνο για τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων (82, 91). Επίσης οι Weaver και συν. έπειτα από ανάλυση της κινητικής της αιματολογικής αποκατάστασης 692 ασθενών, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι ασθενείς, που χρειάστηκαν πάνω από έναν κύκλους κινητοποίησης, προκειμένου να επιτύχουν το στόχο των $2,5 \times 10^6$ CD34+/Kg, σημείωσαν στατιστικά σημαντική πιο αργή αποκατάσταση των αιμοπεταλίων (90). Η συσχέτιση της αιματολογικής αποκατάστασης με τη δυναμική της κινητοποίησης των AAK από τους Jiang και συν. έδειξε πως μεταξύ των κακών και καλών κινητοποιητών δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, όμως υπήρξε στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων, αφού οι καλοί κινητοποιητές είχαν προβάδισμα μιας ημέρας από τους κακούς κινητοποιητές. Βέβαια, όπως και οι ίδιοι αναφέρουν, στην κλινική πράξη η διαφορά της μίας ημέρας δεν έχει ουσιαστική σημασία ενώ η διαφορά πιθανότατα να ήταν αποτέλεσμα των μικρότερων δόσεων CD34+/Kg, που συνήθως συλλέγονται από τους κακούς κινητοποιητές (92). Αυτή η διαπίστωση προκύπτει και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Μεταξύ των πτωχών, των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν παρατηρήθηκαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές στη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, αλλά αντίθετα, παρατηρήθηκαν στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων. Οι πολύ καλοί κινητοποιητές είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$

δύο ημέρες νωρίτερα από τους καλούς κινητοποιητές και τρεις ημέρες νωρίτερα από τους πτωχούς κινητοποιητές, ενώ η μεταξύ των πτωχών και των καλών κινητοποιητών διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική· οι πολύ καλοί κινητοποιητές όμως έλαβαν σχεδόν διπλάσιες δόσεις CD34+/Kg από τους υπολοίπους. Όσο αφορά την κινητοποίηση των AAK, οι Gertz και συν. αναφέρουν πως η κινητοποίηση με κυκλοφωσφαμίδη και G-CSF σε αντίθεση με την κινητοποίηση μόνο με G-CSF έχει στατιστικά σημαντικά πιο θετικά αποτελέσματα στην αιματολογική αποκατάσταση (88). Σύμφωνα με τους Duggan και συν. ο αριθμός των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την πρώτη ημέρα συλλογής μπορεί να είναι η πιο σημαντική παράμετρος στην πρόβλεψη της μακροπρόθεσμης αιματολογικής αποκατάστασης (93). Αλλά και η μέση απόλυτη τιμή των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής ($<1,0 \times 10^9/L$) σχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με μεγαλύτερο χρόνο για τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων στη μελέτη των Yamaguchi και συν. (91).

Η απομάκρυνση του DMSO μετά την απόψυξη έχει αναφερθεί ως παράγοντας με αρνητική επίδραση στην αιματολογική αποκατάσταση. Στη μελέτη των Wandelej de oliveira felix και συν. οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν αποψυγμένα προϊόντα χωρίς πρότερη απομάκρυνση του DMSO σημείωσαν στατιστικά σημαντική ταχύτερη αιματολογική αποκατάσταση κατά μια ημέρα (D11, εύρος 8-16 ημέρες) συγκριτικά με τους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν προϊόντα τα οποία υποβλήθηκαν σε πλύση από το DMSO (D12, εύρος 8-22 ημέρες), χωρίς αυτή η διαφορά να οφείλεται σε απώλεια CD34+ κυττάρων μέσω της διαδικασίας της πλύσης (94). Ομοίως στη μελέτη των Reich-Slotky και συν. η απευθείας χορήγηση των αποψυγμένων προϊόντων χωρίς απομάκρυνση του DMSO οδήγησε σε στατιστικά σημαντική ταχύτερη αιματολογική αποκατάσταση, κατά 1,07 ημέρα όσο αφορά τα ουδετερόφιλα και κατά 2,27 ημέρες όσο αφορά τα αιμοπετάλια (95). Οι Rohner και συν. παρατήρησαν επίσης ανάλογη καθυστέρηση στην αιματολογική αποκατάσταση μετά τη χορήγηση πλυμένων κυτταρικών προϊόντων DMSO, χωρίς αυτή να δικαιολογείται από σημαντική απώλεια CD34+/Kg, ενώ ταυτόχρονα η απομάκρυνση του DMSO δεν προσέφερε κανένα πλεονέκτημα στην ελάττωση των ανεπιθύμητων συμβάντων (96).

Σύμφωνα με τους Besinger και συν. η συστηματική χορήγηση αυξητικού παράγοντα μετά την έγχυση των AAK έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων, με ελάττωση των απαιτούμενων ημερών κατά 1-2 ημέρες, ανεξαρτήτως της δόσης των AAK. Όσο αφορά όμως στην αποκατάσταση της θρομβοπενίας, η επίδραση του αυξητικού παράγοντα είναι αρνητική, ειδικά για τους ασθενείς που λαμβάνουν δόσεις CD34+ κυττάρων χαμηλότερες των $5 \times 10^6/\text{kg}$, οι οποίοι σημειώνουν σημαντικές καθυστερήσεις στην αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων (97). Σύμφωνα με τους Weaver και συν. οι ασθενείς που λαμβάνουν αυξητικό παράγοντα μετά την έγχυση των AAK έχουν προβάδισμα 3-6 ημερών στην αποκατάσταση των ουδετερόφιλων σε σχέση με εκείνους που δε λαμβάνουν, και έχουν επίσης αντίθετα αποτελέσματα όσο αφορά στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων (90). Στη μελέτη των Watts και συν. η μέση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων στους ασθενείς που έλαβαν G-CSF ήταν η D10, στατιστικά σημαντικά ταχύτερη σε σύγκριση με τη D13 των ασθενών που δεν έλαβαν G-CSF· η μέση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων (D11) δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση G-CSF (82). Η διαφορετική επίδραση του αυξητικού παράγοντα στην αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων πιθανότατα αντικατοπτρίζει τη διαφορετική ικανότητα του παράγοντα να επιδρά στα προγονικά κύτταρα που θα εξελιχθούν είτε σε ουδετερόφιλα είτε σε αιμοπετάλια, ενώ η αρνητική επίδραση του στην αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων πιθανότατα να οφείλεται σε αυξημένη κατανάλωση των αιμοπεταλίων από ενεργοποιημένα μυελογενή κύτταρα (82, 90, 97, 98).

Οι Nagayama και συν. αναφέρουν πως ο υψηλός πυρετός $>39^\circ\text{C}$ μεταξύ της D1-D5 μετά την έγχυση των AAK μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα καθυστέρησης της αποκατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων (99). Οι λοιμώξεις και η χρήση αντιβιοτικών μπορούν να καταστείλουν την αποκατάσταση της αιμοποίησης σε ορισμένους ασθενείς (100).

Οι Hoffman και συν. συσχέτισαν την ομάδα αίματος ABO με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων μετά την AMMO. Συγκεκριμένα πρότειναν ότι η ομάδα αίματος μπορεί να σχετίζεται με την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων στους ασθενείς, που λαμβάνουν χαμηλές δόσεις CD34+/Kg και

ειδικότερα, ότι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα καθυστερημένης αποκατάστασης της θρομβοπενίας μεταξύ των ασθενών με ομάδα αίματος 0, οι οποίοι λαμβάνουν δόσεις μεταξύ 2×10^6 - 3×10^6 /Kg (101).

Στις περισσότερες από τις προαναφερθείσες μελέτες, βασικός παράγοντας για την επιτυχή αιματολογική αποκατάσταση, μεταξύ των άλλων παραγόντων, ήταν η δόση των CD34+/Kg (82, 87, 89-91, 93, 97, 99). Βέβαια στη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών, η δόση των CD34+/Kg αποτέλεσε το μοναδικό, καθοριστικό παράγοντα για την ταχεία και επιτυχή αιματολογική αποκατάσταση (102-104). Στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των CD34+/Kg είχε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων εφόσον ελάττωση του αριθμού των CD34/Kg σχετίστηκε με παράταση της ουδετεροπενίας και της θρομβοπενίας πέραν της ιδανικής ημέρας αποκατάστασής τους. Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων ≥ 500 /μl στους δυο ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν $< 3 \times 10^6$ CD34+/Kg, ήταν η D15, στους ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν 3×10^6 - 6×10^6 CD34+/Kg, ήταν η D11, και στους ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν $\geq 6 \times 10^6$ CD34+ κύτταρα/Kg βάρους σώματος, ήταν η D10. Η πρώτη ομάδα ασθενών χρειάστηκε πέντε ημέρες περισσότερες από τη διάμεση ημέρα του συνόλου των ασθενών και την ιδανική ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων, η δεύτερη μόλις μια ημέρα περισσότερη, ενώ η τρίτη αποκατέστησε την ιδανική ημέρα. Παρόλα αυτά, οι παραπάνω διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων $\geq 20 \times 10^3$ /μl στους δυο ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν $< 3 \times 10^6$ CD34+/Kg ήταν η D18, στους ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν 3×10^6 - 6×10^6 CD34+/Kg, ήταν η D15, και στους ασθενείς, στους οποίους εγχύθηκαν $\geq 6 \times 10^6$ CD34+/Kg, ήταν η D13. Η πρώτη ομάδα χρειάστηκε τέσσερις ημέρες περισσότερες από τη διάμεση ημέρα του συνόλου των ασθενών και την ιδανική ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων, η δεύτερη χρειάστηκε μόλις μια ημέρα περισσότερη, ενώ η τρίτη αποκατέστησε μια ημέρα νωρίτερα από την ιδανική ημέρα. Σε αντίθεση με τις διαφορές στην αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων, οι παραπάνω διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές. Ο αριθμός των CD34+/Kg δεν είχε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων και οι

διαφορές στα ποσοστά των ασθενών, που πέτυχαν μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση της δόσης των CD34+/Kg με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων περιγράφεται σε αρκετές μελέτες (82, 89, 105-110). Οι Nath και συν. σε μια μελέτη 112 ασθενών, διαπίστωσαν πως η αύξηση της δόσης των CD34+/Kg κατά $1 \times 10^6/\text{kg}$ ελαττώνει το χρόνο, που απαιτείται για την αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων, κατά 3 ώρες και 50 λεπτά (105). Οι Limat και συν. διαπίστωσαν μια μέση μείωση των απαραίτητων ημερών για αποκατάσταση της ουδετεροπενίας κατά 1,4 ημέρες στους ασθενείς, που έλαβαν $>5 \times 10^6$ CD34+/Kg (111). Στις μελέτες των Schulman και συν., των Weaver και συν., των Tricot και συν., των Besinger και συν. και των Kiss και συν., μετά την ανάλυση της κινητικής της αιματολογικής αποκατάστασης 1317, 692, 225, 243 και 27 ασθενών, αντίστοιχα, διαπιστώθηκε ταχύτερη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων κατά μία ημέρα στους ασθενείς, που έλαβαν $>5 \times 10^6/\text{Kg}$ CD34+ κύτταρα σε σχέση με εκείνους, που έλαβαν λιγότερα (87, 90, 97, 112, 113). Οι Faucher και συν. θεωρούν πως η έγχυση $\geq 3 \times 10^6$ CD34+/Kg οδηγεί σε στατιστικά σημαντικά ταχύτερη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων κατά μία ημέρα (την D11 έναντι της D12) (104). Οι Stewart και συν. αναφέρουν πως οι ασθενείς, που έλαβαν δόσεις CD34+ κυττάρων $1-5 \times 10^6/\text{Kg}$, $5-10 \times 10^6/\text{Kg}$ και $>10 \times 10^6/\text{Kg}$ αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων έως τη D11 σε ποσοστό 30%, 65% and 89%, αντίστοιχα (114). Η στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση της δόσης των CD34+/Kg με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων, που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη, αναφέρεται επίσης σε αρκετές μελέτες (82, 89, 106-110). Οι Limat και συν. διαπίστωσαν μια μέση μείωση των απαραίτητων ημερών για αποκατάσταση της θρομβοπενίας κατά 2,5 ημέρες στους ασθενείς, που έλαβαν $>5 \times 10^6$ CD34+/Kg (111). Οι Schulman και συν., οι Weaver και συν., οι Tricot και συν., και οι Besinger και συν. διαπίστωσαν ταχύτερη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων κατά τρεις ημέρες στους ασθενείς, που έλαβαν $>5 \times 10^6/\text{Kg}$ CD34+ κύτταρα σε σχέση με εκείνους που έλαβαν λιγότερα (87, 90, 97, 112). Οι Kiss και συν. διαπίστωσαν σημαντική συσχέτιση της αποκατάστασης των αιμοπεταλίων με τη δόση των CD34+ κυττάρων και οι ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον $5 \times 10^6/\text{Kg}$ είχαν αιμοπετάλια $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ και $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ αρκετές

ημέρες νωρίτερα από τους υπολοίπους (την D9 έναντι της D21 και την D10 έναντι της D26, αντίστοιχα) (113). Σύμφωνα με τους Ergene και συν. οι ασθενείς, που έλαβαν $>7 \times 10^6/\text{Kg}$ CD34+ κύτταρα, είχαν στατιστικά σημαντικά ταχύτερη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων (102). Οι Stewart και συν. αναφέρουν πως οι ασθενείς, που έλαβαν δόσεις CD34+ κυττάρων $1-5 \times 10^6/\text{Kg}$, $5-10 \times 10^6/\text{Kg}$ και $>10 \times 10^6/\text{Kg}$, είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D11 σε ποσοστό 30%, 47% and 76%, αντίστοιχα και αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D16 σε ποσοστό 10%, 47%, και 66%, αντίστοιχα (114). Οι Faucher και συν. διαπίστωσαν πως ο σημαντικότερος παράγοντας για την ταχεία αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων είναι η έγχυση $\geq 3 \times 10^6 \text{CD34+}/\text{Kg}$, με στατιστικά σημαντικά ταχύτερη αποκατάσταση κατά περίπου 8 ημέρες (D14 έναντι D22) (104). Οι Stiff και συν. σε αναδρομική μελέτη 439 ασθενών δε διαπίστωσαν καμία συσχέτιση της δόσης των CD34+/kg με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση είτε των ουδετερόφιλων είτε των αιμοπεταλίων. Αντίθετα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, διαπίστωσαν μια στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση της δόσης των CD34+/Kg με το ποσοστό ασθενών με μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων, και συγκεκριμένα, με το ποσοστό των ασθενών με NHL και MM που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 150 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D100 και με το ποσοστό των ασθενών με NHL που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 150 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D180 και τη D360 (115). Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της δόσης των CD34+/Kg με το ποσοστό των ασθενών, που πέτυχαν μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση αναφέρεται σε αρκετές μελέτες (89, 113). Οι Klaus και συν. σε μελέτη 390 ασθενών με MM, εκ των οποίων οι 86 έλαβαν $>6,5 \times 10^6$ CD34+/Kg, οι 188 έλαβαν $3 \times 10^6-6,5 \times 10^6$ CD34+/Kg και οι 116 έλαβαν $\leq 3 \times 10^6$ CD34+/Kg, αναφέρει σημαντική συσχέτιση της δόσης των CD34+/Kg με την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων $\geq 150 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D360 και οριακά μη σημαντική συσχέτιση με την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων $\geq 150 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D180· δεν υπήρξε αντίστοιχη σημαντική συσχέτιση της δόσης των CD34+/Kg με τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων κυττάρων (89).

Κάποιες, λιγότερες μελέτες, δεν κατέληξαν σε καμία συσχέτιση της δόσης των CD34+/Kg και της βραχυπρόθεσμης ή της μακροπρόθεσμης αιματολογικής αποκατάστασης μετά την AMMO (116-119).

Επαρκής ελάχιστη δόση για επιτυχή αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO, θεωρούνται κατά κανόνα τα 2×10^6 CD34+/Kg βάρους σώματος (89, 102, 107, 109, 120-122). Ωστόσο αρκετοί θεωρούν πως επαρκής αιματολογική αποκατάσταση είναι δυνατή με τη έγχυση μόλις $0,75 \times 10^6 - 1 \times 10^6$ CD34+/Kg (82, 118, 119, 123). Για την εξασφάλιση, όμως, εκτός από επαρκούς, και ταχείας αποκατάστασης, η χορήγηση τουλάχιστον $2,5 - 5 \times 10^6$ CD34+/Kg είναι μάλλον απαραίτητη (82, 90, 104, 119, 124). Σύμφωνα με τους Tricot και συν. η δόση των 2×10^6 CD34+/Kg είναι επαρκής μόνο για τους ασθενείς, οι οποίοι προ της μεταμόσχευσης λαμβάνουν χημειοθεραπεία για λιγότερο από 24 μήνες· η εξασφάλιση ταχείας αποκατάστασης των ασθενών που λαμβάνουν χημειοθεραπεία για μεγαλύτερο διάστημα απαιτεί τη χορήγηση τουλάχιστον 5×10^6 CD34+/Kg (87). Η ιδανική δόση που αποτελεί το στόχο των περισσότερων κέντρων μεταμόσχευσης είναι τα $5 \times 10^6 - 8 \times 10^6$ CD34+/Kg βάρους σώματος (103, 120, 125-127). Σύμφωνα με τους Siena και συν., ιδανικά πρέπει να εγχύονται τουλάχιστον 8×10^6 CD34+/Kg βάρους σώματος (78). Γενικότερα, η δόση των 8×10^6 CD34+/Kg βάρους σώματος αποτελεί το ανώτερο όριο για τα περισσότερα κέντρα (103).

Καθώς σε πολυάριθμες μελέτες περιγράφεται πως, μόνο ένα μικρό ποσοστό ασθενών, στο οποίο εγχύονται δόσεις μικρότερες από 2×10^6 CD34+/Kg, τελικά δεν επιτυγχάνει επαρκή αιματολογική αποκατάσταση, φαίνεται πως σημασία δεν έχει μόνο ο αριθμός του συνόλου των CD34+ κυττάρων αλλά και ο αριθμός υποπληθυσμών CD34+ κυττάρων, που ευθύνονται είτε για την ταχεία είτε για τη μακρά αποκατάσταση της αιμοποίησης (82). Μελέτες έχουν εστιάσει στον υποπληθυσμό των CD34+/CD38- αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, τα οποία θεωρούνται πως έχουν σημαντικά μεγαλύτερη αντοχή στην κρυσυντήρηση από τα CD34+/CD38+ κύτταρα ενώ ευθύνονται τόσο για την βραχυπρόθεσμη όσο και για τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση της αιμοποίησης στην AMMO (128-130). Η δόση των $0,14 \times 10^6$ CD34+CD38- κυττάρων/kg έχει θεωρηθεί ως η ελάχιστη απαιτούμενη για ταχεία αποκατάσταση των αιμοπεταλίων από τους Robinson και συν. (130). Οι Ojeda-Uribe και συν. και οι Hénon και συν. όρισαν ως ελάχιστη δόση για ταχεία και ολοκληρωμένη αιματολογική αποκατάσταση τα $0,05 \times 10^6$ CD34+CD38- κύτταρα/kg (128, 129). Δεδομένα μελετών υποδεικνύουν πως ο αριθμός των CD34+/CD33- κυττάρων στο προϊόν συλλογής μπορεί να αποτελέσει δείκτη ποιότητας του

μοσχεύματος όσο αφορά στη βραχυπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση και τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων· δεδομένου ότι μεταξύ των ασθενών ο αριθμός των CD34+/CD33- κυττάρων που συλλέγεται μετά από κινητοποίηση ποικίλει αρκετά, ο προσδιορισμός του ίσως έχει μεγαλύτερη αξία στις περιπτώσεις των πτωχών κινητοποιητών, και κυρίως όσων δεν πετυχαίνουν να συλλέξουν $>2 \times 10^6$ CD34+/kg (126, 127, 131). Στη μελέτη των Miller και συν. η αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων $>50 \times 10^3/\mu\text{l}$ και $>100 \times 10^3/\mu\text{l}$ καθυστέρησε στατιστικά σημαντικά στους ασθενείς που έλαβαν $<1,38 \times 10^6$ CD34+CD33-/Kg (131). Στη μελέτη των Dercksen και συν. οι ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον $2,79 \times 10^6$ CD34+CD33-/kg είχαν στατιστικά σημαντική ταχύτερη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων (διάμεση τιμή 10 ημέρες, εύρος 8-17 ημέρες) σε σχέση με όσους έλαβαν σημαντικά μικρότερο αριθμό (12 ημέρες, εύρος 10-28 ημέρες) (127). Στην ίδια μελέτη, το αριθμός των CD34+CD41+ κυττάρων σχετίστηκε δυναμικά με την απαίτηση μετάγγισης αιμοπεταλίων έως και 14 ημέρες μετά την AMMO (ελάχιστη δόση $0,54 \times 10^6$ CD34+CD41+/Kg)· οι ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον $0,54 \times 10^6$ CD34+CD41+/Kg αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους στατιστικά σημαντικά πιο γρήγορα (διάμεση τιμή 11 ημέρες, εύρος 7-16 ημέρες) συγκριτικά με όσους έλαβαν λιγότερα (διάμεση τιμή 19 ημέρες, εύρος 9-37 ημέρες) (127). Οι Feng και συν. προτείνουν επίσης τον αριθμό των CD34+/CD41a+ κυττάρων ως δείκτη πρόγνωσης αποκατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων, ορίζοντας ως ελάχιστη δόση τα 1×10^5 CD34+/CD41a+/Kg (132). Οι Hicks και συν. προτείνουν πως ο προσδιορισμός του αριθμού των βιώσιμων CD34+/CD133+ προγονικών κυττάρων στο μόσχευμα μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη πρόβλεψης της αποκατάστασης των ουδετερόφιλων μετά την AMMO, πιο χρήσιμο ίσως και από τον αριθμό των CD34+ κυττάρων· στη μελέτη τους οι ασθενείς που έλαβαν περισσότερα από $1,86 \times 10^6$ βιώσιμα CD34+/133+ κύτταρα/Kg είχαν στατιστικά σημαντικό πλεονέκτημα όσο αφορά στην μέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων (117, 133). Οι Camacho-Villa και συν. διαπίστωσαν πως τα CD34+/CD133+ κύτταρα και τα CD133+CD38+ κύτταρα, κινητοποιούνται σε μεγάλους αριθμούς στο περιφερικό αίμα με τη χορήγηση του G-CSF και σχετίζονται σημαντικά με την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων (133). Στη μελέτη των Sartor και συν. η δόση των CD34+/CD110+ κυττάρων φάνηκε να αποτελεί

σημαντικό προγνωστικό παράγοντα των ασθενών με καθυστερημένη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων· οι ασθενείς με καθυστερημένη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων έλαβαν μια διάμεση δόση $5,2 \times 10^4$ CD34+ CD110+/Kg, στατιστικά σημαντικά μικρότερη από τη δόση των $16,4 \times 10^4$ CD34+ CD110+/Kg που έλαβαν οι ασθενείς στους οποίους αποκαταστάθηκε ο αριθμός των αιμοπεταλίων μέχρι τη D21, ενώ περαιτέρω ανάλυση έδειξε πως δόσεις πάνω ή κάτω από 6×10^4 CD34+ CD110+/Kg σχετίζονται ισχυρά με την ανάγκη για μεταγγίσεις αιμοπεταλίων τις πρώτες 21 ημέρες (134). Οι Shimazaki και συν. πρότειναν ως ελάχιστη δόση για επαρκή αιματολογική αποκατάσταση τα 80×10^4 CD34+CD90+/kg, αφού στη μελέτη τους περισσότεροι από το 60% των ασθενών που έλαβαν $< 80 \times 10^4$ CD34+CD90+/kg δεν είχαν πάνω από $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως τη D90, σε αντίθεση με όσους έλαβαν $> 80 \times 10^4$ CD34+CD90+/kg (135).

Νέκρωση και απόπτωση κρυοσυντηρημένων κυττάρων

Γενικά

Ως νέκρωση χαρακτηρίζεται ο «ξαφνικός», μη αναστρέψιμος, και μη ελεγχόμενος θάνατος του κυττάρου, με τη μορφή της αδιάτακτης αποδόμησης της πλασματικής μεμβράνης και της διάχυσης του κυτταρικού περιεχομένου (29-32). Το κύτταρο αποτελεί παθητικό δέκτη μιας ενεργειακά ανεξάρτητης διαδικασίας κατά την οποία, έπειτα από έκθεσή του σε έντονα διαφοροποιημένες από τις φυσιολογικές συνθήκες, όπως η υποξία, η ακραία αυξημένη ή ελαττωμένη θερμοκρασία και η μηχανική καταπόνηση, και εξαιτίας της αδυναμίας του να διατηρήσει την ομοιόσταση του και τη συνοχή της πλασματικής του μεμβράνης, καταλήγει σε εισροή ύδατος και εξωκυτταρικών ιόντων και τελικά σε λύση (28, 33). Ως απόπτωση χαρακτηρίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που συνιστά για όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς ένα φυσιολογικό μηχανισμό της ανάπτυξης των ιστών, βασικό για την ομαλή ανάπτυξη, λειτουργία και την ομοιόσταση τους (29, 34, 36, 37). Η απόπτωση συντελείται με την ενεργό συμμετοχή του ίδιου του κυττάρου στη επικείμενη «αυτοκτονία» του. Τα νεκρωτικά κύτταρα παρουσιάζουν κυτταροπλασματικά κενοτόπια, διόγκωση του πυρήνα, και διάρρηξη τόσο της

κυτταρικής όσος και της πυρηνικής μεμβράνης, σε αντίθεση με τα αποπτωτικά κύτταρα, που παρουσιάζουν συρρίκνωση, συμπύκνωση της χρωματίνης και διάσπαση του DNA (70). Η ρήξη ή η διατήρηση της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης θεωρούνται βασικά διακριτικά χαρακτηριστικά της νέκρωσης και της απόπτωσης, αντίστοιχα (34). Η κυτταρική λύση κατά τη νέκρωση είναι απότομη και ολοκληρωτική, ενώ αντίθετα οι μεταβολές της πλασματικής μεμβράνης κατά την απόπτωση, αφορούν κατά κύριο λόγο βιοχημικές παρά μορφολογικές μεταβολές, που πιθανότατα είναι σημαντικές για την φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων (33). Σημαντική αλλαγή στη πλασματική μεμβράνη των αποπτωτικών κυττάρων αποτελεί η μεταστροφή της αρνητικά φορτισμένης φωσφολιπιδικής φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική πλευρά της λιπιδικής διπλοστιβάδας της πλασματικής μεμβράνης, όπου εντοπίζεται αποκλειστικά υπό φυσιολογικές συνθήκες, προς την εξωτερική πλευρά (38, 70). Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης αποτελεί πρώιμο χαρακτηριστικό της απόπτωσης και προηγείται άλλων, όπως η αύξηση της διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης, η συρρίκνωση του κυττάρου και η πύκνωση του πυρήνα (48, 68).

Μέθοδοι ανάλυσης βιωσιμότητας και απόπτωσης κρυοσυντηρημένων κυττάρων

Αναφορές στη μελέτη της βιωσιμότητας των αποψυγμένων CD34+ κυττάρων εντοπίζονται σε πολυάριθμες μελέτες. Η κυτταρική βιωσιμότητα αναλύεται με δυο βασικές τεχνικές μεθόδους: α) με καταμέτρηση νεκρών/ζωντανών κυττάρων κάτω από οπτικό μικροσκόπιο μετά χρώσης των νεκρών κυττάρων με Trypan blue (TB) και β) με κυτταρομετρία ροής (FACS) με χρώση των νεκρών κυττάρων με τη χρωστική 7-ADD. Η μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων και της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων περιγράφεται σε αρκετά λιγότερες βιβλιογραφικές αναφορές. Η βασική δε μέθοδος προσδιορισμού της είναι η κυτταρομετρία ροής με συνδυαστική χρήση του αντισώματος Annexin-V και της χρωστικής 7-ADD. Με τον αποκλεισμό των αποπτωτικών κυττάρων από τον πληθυσμό των βιώσιμων κυττάρων, προσδιορίζεται ο αριθμός των «πραγματικά» βιώσιμων (βιώσιμων μη αποπτωτικών) κυττάρων.

Μέθοδος με Trypan Blue

Η μέθοδος με τη χρωστική TB χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιωσιμότητας κυτταρικών πληθυσμών εδώ και πολλές δεκαετίες. Βασίζεται στην αρχή ότι, τα ζωντανά κύτταρα διατηρούν άθικτη την κυτταρική μεμβράνη τους, η οποία απομακρύνει χρωστικές όπως η Trypan Blue, με αποτέλεσμα να φαίνονται διαφανή κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο, σε αντίθεση με τα νεκρά, τα οποία βάφονται μπλε. Επιτρέπει τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού με καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων με «διαφανές» κυτταρόπλασμα έναντι των κυττάρων με μπλε κυτταρόπλασμα, κάτω από οπτικό μικροσκόπιο και του υπολογισμού του κατά αναλογία ποσοστού των ζωντανών κυττάρων ως προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων (64, 136). Ως μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι είναι απλή, γρήγορη και οικονομική, καθώς για την εκτέλεσή της απαιτούνται μικροποσότητα χρωστικής trypan blue, ένα αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και ένα οπτικό μικροσκόπιο ενώ ολοκληρώνεται σε 5'. Μειονέκτημα θεωρείται, ο έμμεσος προσδιορισμός της βιωσιμότητας μέσω της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα, την υπερεκτίμηση της βιωσιμότητας με την έννοια της δυνατότητας του πολλαπλασιασμού και της λειτουργικότητας, όταν η ακεραιότητα της μεμβράνης διατηρείται προσωρινά, και, αντίθετα, την υποεκτίμησή της, σε περιπτώσεις, όπου η διαπερατότητα της μεμβράνης είναι μη φυσιολογική, πλην όμως το κύτταρο είναι ικανό να επιδιορθώσει τη βλάβη και να παραμείνει λειτουργικό (136, 137). Επιπλέον, η χρωστική διαπερνά τελικά στο εσωτερικό και των ζώντων κυττάρων, μετά από το πέρας λίγων λεπτών από την ανάμειξή της με το κυτταρικό ελαιώρημα, με αποτέλεσμα την καταμέτρηση και ψευδώς νεκρών κυττάρων (138). Μειονέκτημα της μεθόδου θεωρείται επίσης το ότι βασίζεται στην υποκειμενική εκτίμηση και καταμέτρηση των ζώντων και νεκρών κυττάρων, η οποία επηρεάζεται εξαιρετικά από τις ρυθμίσεις του οπτικού μικροσκοπίου, την καθαρότητα του κυτταρικού ελαιωρήματος και της πλάκας Neubauer και το πάχος της καλυπτρίδας ενώ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία του εκτιμητή (139). Για το λόγο αυτό προτάθηκε η τροποποίηση της μεθόδου, με καταμέτρηση των ζώντων και νεκρών κυττάρων με κυτταρόμετρο αντί του οπτικού μικροσκοπίου (138). Άλλη μέθοδος, αντίστοιχη της μεθόδου με TB λόγω της καταμέτρησης κάτω από μικροσκόπιο, που

θεωρείται περισσότερο ακριβής, είναι η καταμέτρηση των ζώντων και των νεκρών κυττάρων με μικροσκοπία φθορισμού σκοτεινού πεδίου μετά χρώσης με δύο φθορίζουσες χρωστικές, όπως το πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange, AO) και το ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI) (139). Σε άλλη μελέτη αναφέρεται η χρήση του πορτοκαλί της ακριδίνης σε συνδυασμό με βρωμιούχο αιθίδιο (AO/EB) στην οποία τα ζωντανά κύτταρα διακρίνονται από το ανοικτό πράσινο φθορίζον χρώμα τους και τα νεκρά από το πορτοκαλί χρώμα τους (140).

Μέθοδος κυτταρομετρίας ροής με 7-ADD

Ο διαχωρισμός των νεκρών από τα ζώντα κύτταρα είναι επίσης δυνατός με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής. Δεδομένου ότι ο διαχωρισμός μόνο βάσει των σκεδαστικών ιδιοτήτων των κυττάρων, δεν είναι αξιόπιστος, είναι απαραίτητη η χρήση χρωστικών, οι οποίες διαπερνούν ελεύθερα τις διαρρηγμένες μεμβράνες των νεκρών κυττάρων και βάφουν το πυρηνικό DNA, όπως η 7AAD (7-amino actinomycin D) (63). Οι Keeney και συν. το 1998 πρότειναν το ποσοτικό προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού των βιώσιμων CD34+ κυττάρων σε κρουκατεψυγμένα προϊόντα AAK μετά από απόψυξη, με κυτταρομετρία ροής, με την προσθήκη της χρωστικής 7AAD στο μίγμα των αντισωμάτων CD34 και CD45 (66, 67). Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν πως ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας με FACS αντί της TB έχει ως μοναδικό μειονέκτημα το κόστος και τη δυνατότητα πρόσβασης σε κυτταρομετρητή (140). Ως μέθοδος έχει βασικά πλεονεκτήματα, όπως το ότι με τη μέθοδο FACS μπορεί να αναλυθεί πολύ μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων, ότι μπορεί να αναλυθεί συγκεκριμένος υποπληθυσμός κυττάρων όπως τα CD34+ κύτταρα και όχι μόνο τα εμπύρνηνα κύτταρα συνολικά, και ότι δε βασίζεται στην υποκειμενική καταμέτρηση και στην εμπειρία (72, 141). Οι Vagan και συν. πρότειναν τη χρήση δυο διαφορετικών πυρηνικών χρωστικών (πορτοκαλί της ακριδίνης, AO και βρωμιούχο αιθίδιο, EB), οι οποίες προσφέρουν καθαρότερη, ταχύτερη και ευκολότερη διάκριση μεταξύ ζώντων και νεκρών κυττάρων, δεδομένου ότι οι διαφορετικοί πληθυσμοί βάφονται με διαφορετικές χρωστικές, και επιπλέον προσφέρουν ασφαλέστερα αποτελέσματα, εφόσον είναι μη τοξικές για τα κύτταρα με το πέρας του χρόνου σε αντίθεση με την 7-ADD (140).

Μέθοδος κυτταρομετρίας ροής με 7-ADD και Annexin-V

Η χρωστική 7-ADD διαπερνά τη πλασματική μεμβράνη μόνο των νεκρών κυττάρων ή των αποπτωτικών κυττάρων τελικού σταδίου αλλά όχι των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων, αφού αυτά διατηρούν άθικτη την κυτταρική μεμβράνη τους. Επομένως τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα δε μπορούν να διακριθούν με τεχνικές που χρησιμοποιούν χρωστικές όπως η TB ή η 7-ADD (142). Εξαιτίας των μορφολογικών τους αλλαγών, τα αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να διακριθούν από τα νεκρωτικά με κυτταρομετρία ροής βάσει των σκεδαστικών τους ιδιοτήτων. Τα αποπτωτικά κύτταρα, λόγω συρρίκνωσης, έχουν μικρότερο μέγεθος από τα φυσιολογικά ζωντανά κύτταρα και αρκετά μικρότερο μέγεθος από τα νεκρά κύτταρα. Τα νεκρά κύτταρα με τη σειρά τους, λόγω διόγκωσης, έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα φυσιολογικά ζωντανά κύτταρα. Επομένως, η πρόσθια σκέδαση (FSC), που σχετίζεται με τη διάμετρο, σε σχέση με τα ζωντανά κύτταρα, είναι ελαττωμένη στα αποπτωτικά κύτταρα ενώ είναι αυξημένη στα νεκρά κύτταρα. Η πλάγια σκέδαση (SSC), που σχετίζεται με την κοκκίωση, αυξάνεται ή παραμένει σταθερή όσο αφορά τα αποπτωτικά κύτταρα και ελαττώνεται όσο αφορά τα νεκρά κύτταρα (65). Αν και με τον τρόπο αυτό ο πληθυσμός των αποπτωτικών κυττάρων αναγνωρίζεται μεταξύ των πληθυσμών των νεκρών και των ζωντανών κυττάρων, η συνδυαστική χρήση του αντισώματος Annexin-V, δίνει τη δυνατότητα σαφέστερης διάκρισης μεταξύ βιώσιμων (7-ADD-/Annexin-V-), αποπτωτικών (7-ADD-/ Annexin-V+) και νεκρών (7-ADD+/Annexin-V-) κυττάρων (142, 143). Η χρήση του αντισώματος Annexin-V βασίζεται στο ότι α) ενώ οι μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων παρουσιάζουν φωσφολιπιδική ασυμμετρία, με τη φωσφατιδυλοχολίνη και την σφιγγομυελίνη να επικρατούν στην εξωκυτταρική μεμβρανική επιφάνεια και τη φωσφατιδυλεθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλοσερίνη να επικρατούν στην ενδοκυτταρική μεμβρανική επιφάνεια, κατά την αποπτωτική διαδικασία η φωσφολιπιδική ασυμμετρία χάνεται με βασικό χαρακτηριστικό την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης, β) στην εκλεκτική σύνδεση της Annexin-V σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλοσερίνη (68, 69). Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης αποτελεί χαρακτηριστικό των αποπτωτικών κυττάρων αλλά λαμβάνει χώρα και κατά τη νέκρωση. Επιπροσθέτως, στα νεκρωτικά κύτταρα, η Annexin-V μπορεί, λόγω της

διάρρηξης της μεμβράνης, να προσδεθεί στην φωσφατιδυλοσερίνη και της ενδοκυτταρικής επιφάνειας. Σε κάθε περίπτωση, όμως, υπάρχει διάρρηξη της μεμβράνης και άρα η σαφής διάκριση των νεκρωτικών και αποπτωτικών κυττάρων είναι δυνατή με την ταυτόχρονη χρήση των δυο χρωστικών, της 7-ADD και της Annexin-V (48, 68, 70). Ο έλεγχος μορφολογικών αλλαγών του πυρήνα με οπτικό μικροσκόπιο ή μικροσκόπιο φθορισμού, με χρώσεις όπως το ιωδιούχο προπίδιο (PI), η Hoechst 33342 ή το πορτοκαλί της ακριδίνης (AO), παραμένει η καλύτερη μέθοδος πιστοποίησης της απόπτωσης (65). Η πρόσδεση της Annexin-V μπορεί επίσης μέσω της μικροσκοπίας να αποκαλύψει μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης όπως ο κατακερματισμός του πυρήνα και η δημιουργία προεκβολών της πλασματικής μεμβράνης (144). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει πως η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης αποτελεί χαρακτηριστικό των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (48, 69). Σύμφωνα με τους Koorman και συν. τα αποπτωτικά κύτταρα φαίνονται Annexin-V-θετικά αφού η πυρηνική συμπύκνωση έχει ξεκινήσει και πριν τα κύτταρα γίνουν διαπερατά από τη χρωστική EB (βρωμιούχο αιθίδιο) (69). Οι Martin και συν. έδειξαν πως η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης αυξάνεται δραματικά με την επαγωγή της απόπτωσης ενώ προηγείται αρκετές ώρες πριν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές της, αφού με συνδυαστική αξιολόγηση των σκεδαστικών ιδιοτήτων των αποπτωτικών κυττάρων και της πρόσδεσης της Annexin-V, διέκριναν Annexin-V θετικά κύτταρα τα οποία ακόμα διατηρούσαν τη φυσιολογική μορφολογία τους (48). Μειονέκτημα της εκτίμησης της απόπτωσης με FACS αποτελεί το γεγονός ότι απαιτούνται χειρισμοί οι οποίοι πιθανόν επάγουν «αποπτωτικές» διαφοροποιήσεις, ενώ σύμφωνα με τους Martin και συν. η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης ως χαρακτηριστικό της απόπτωσης δεν εξαρτάται από τον παράγοντα που οδήγησε στην επαγωγή της (48). Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η ταχύτητα, η ακρίβεια και η αξιοπιστία (144).

Μελέτες έχουν αναδείξει και άλλες χρωστικές που μπορούν να διακρίνουν τα αποπτωτικά από τα ζωντανά και τα νεκρά κύτταρα, όπως η Syto^R16 σε συνδυασμό με την 7-ADD. Με τη Syto^R16 θεωρείται πως είναι δυνατός ο προσδιορισμός αποπτωτικών κυττάρων σε ακόμα πιο πρώιμο, αλλά ταυτόχρονα μη αντιστρεπτό στάδιο από ότι με την Annexin-V (145, 146). Ομοίως, το FLICA test περιγράφεται ως

μέθοδος με το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί η δράση των κασπασών στα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, ένα στάδιο πριν την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (40).

Βιωσιμότητα και απόπτωση κυτταρικών πληθυσμών αποψυγμένων προϊόντων

Στα 61 δείγματα που αναλύθηκαν, η διάμεση τιμή του ποσοστού βιωσιμότητας των CD45+ κυττάρων ήταν 61,7% (εύρος: 7,5-81,4%, μέτρηση με FACS) και των CD34+ κυττάρων 45,9% (εύρος: 0,6-88%, μέτρηση με FACS). Η διάμεση τιμή της % βιωσιμότητας των TNC κυττάρων στα αντίστοιχα δείγματα, ήταν 55,3% (εύρος: 10-73%, μέτρηση με TB). Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει πως τα ποσοστά βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων της παρούσας μελέτης, όπως μετρήθηκαν με FACS, ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με εκείνα αντίστοιχων μελετών, όπως των Abrahamsen και συν. (79%, εύρος 44%-97%), των Lee και συν. (71%, εύρος 31-89%), των Busilacchi και συν (58.6%, εύρος 54.2-63%) (81, 147, 148). Η διάμεση τιμή του ποσοστού απόπτωσης των CD45+ κυττάρων στα δείγματα της μελέτης, ήταν 8,4% (εύρος: 0,5-34,3%) και των CD34+ κυττάρων 4,3% (εύρος: 0-44,9%). Τα ποσοστά απόπτωσης των CD45+ και των CD34+ κυττάρων της παρούσας μελέτης ήταν ανάλογα με εκείνα αντίστοιχων μελετών, όπως των Abrahamsen και συν. (7%, εύρος 1-15%) και των Wu και συν. (3-30%) (143, 149). Με την εξαίρεση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων από το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων προσδιορίστηκε το ποσοστό «πραγματικής» βιωσιμότητας με διάμεση τιμή 52,9% (εύρος: 75,4-80,9%) για τα CD45+ κύτταρα και 32,2% (εύρος: 0,5-79,5%) για τα CD34+ κύτταρα. Παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση των ποσοστών βιωσιμότητας είτε για τα CD34+ κύτταρα είτε για τα CD45+ κύτταρα μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Παρόμοια διακύμανση αναφέρεται στις περισσότερες αντίστοιχες μελέτες (72, 81, 100, 117, 143, 146, 150).

Παρατηρήθηκε συσχέτιση των ποσοστών βιωσιμότητας των TNC και CD45+ όπως και των ποσοστών βιωσιμότητας των TNC και CD34+, οι οποίες ήταν στατιστικώς σημαντική, γραμμική, θετική και μετρίως ισχυρή στη πρώτη περίπτωση, και σημαντική, θετική αλλά μη γραμμική, και μικρότερης ισχύος στη δεύτερη περίπτωση. Η συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών βιωσιμότητας των CD34+ και CD45+ κυττάρων ήταν στατιστικώς σημαντική, μη γραμμική, θετική, μέτριας ισχύος, όπως

επίσης και η συσχέτιση των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων και των αποπτωτικών CD45+ κυττάρων αλλά και η συσχέτιση των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ και CD45+ κυττάρων. Το % βιωσιμότητας των TNC (μέτρηση με TB) ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σχέση με των CD45+ κυττάρων (μέτρηση με FACS) κατά 4,8%, και ταυτόχρονα το % βιωσιμότητας των CD34+ (μέτρηση με FACS) ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σχέση με των TNC και των CD45+ κυττάρων κατά 5,9% και 12,6%, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε επίσης μια στατιστικά μη σημαντική μειωμένη απόπτωση των CD34+ κυττάρων σε σχέση με των CD45+ κυττάρων. Τελικά, το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σχέση με των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ κυττάρων κατά 12,7%. Το % βιωσιμότητας των TNC σε σχέση με των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ κυττάρων και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων, ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένο κατά 5,2% και 19,2%, αντίστοιχα. Στις περισσότερες μελέτες αποδεικνύεται πως τα CD34+ κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην κρυοσυντήρηση συγκριτικά με τα CD45+ κύτταρα (72, 73, 143, 151). Αυτό δεν αποδεικνύεται στην παρούσα μελέτη. Μόλις στο 18% των δειγμάτων η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων ήταν καλύτερη έναντι των CD45+ κυττάρων έως και 56,9% ενώ στην πλειοψηφία τους ήταν χειρότερη έως και 26%. Ίσως αυτή η διαφοροποίηση να οφείλεται στη περιεκτικότητα των κυτταρικών προϊόντων σε πολυμορφοπύρρηνα και λεμφοκύτταρα καθώς υπάρχει γενικότερα η διαπίστωση πως τα πολυμορφοπύρρηνα είναι τα λιγότερο ανθεκτικά κύτταρα στην κρυοσυντήρηση (151). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κοινή πρακτική από τα κέντρα κρυοκατάψυξης όσο αφορά στα πρωτόκολλα κρυοκατάψυξης και πολύ περισσότερο στα πρωτόκολλα ελέγχου της ποιότητας των μοσχευμάτων. Θεωρούμε επομένως ότι δε μπορεί να υπάρξει ευθεία σύγκριση των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών μελετών.

Σύγκριση μεθόδων προσδιορισμού βιωσιμότητας

Δεδομένης της διαφορετικής μεθοδολογίας είναι αναμενόμενη μια διαφορά μεταξύ των μετρήσεων με TB και FACS. Όμως, θα ανέμενε κανείς να προκύψουν σταθερά μικρότερες ή μεγαλύτερες τιμές βιωσιμότητας από τη μία μέθοδο σε σχέση με την άλλη, και με σχετικά σταθερές αποκλίσεις με μικρό εύρος. Αντίθετα, οι τιμές με TB ήταν άλλοτε μικρότερες και άλλοτε μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές με FACS,

ενώ οι διαφορές τους ήταν άλλοτε πολύ μικρές και άλλοτε πολύ μεγάλες. Συγκεκριμένα, στο 75,4% των περιπτώσεων το ποσοστό των ζωντανών TNC ήταν μικρότερο έναντι των βιώσιμων CD45+ κυττάρων, ενώ στο 25,6% ήταν μεγαλύτερο, με διαφορές από 0,2% έως και 32,9%, και στο 68,8% των περιπτώσεων το ποσοστό των ζωντανών TNC ήταν μεγαλύτερο έναντι των βιώσιμων CD34+ κυττάρων ενώ στο 31,2% ήταν μικρότερο με διαφορές από 0,1% έως και 50,1%. Αντίστοιχες φυσικά διαφορές παρατηρήθηκαν και κατά τη σύγκριση των τιμών βιωσιμότητας, που μετρήθηκαν με TB και των τιμών «πραγματικής» βιωσιμότητας. Περαιτέρω σύγκριση με μη παραμετρική ανάλυση κατέληξε σε μια στατιστικά σημαντική μετρίως ικανοποιητική συμφωνία των μεθόδων ανάλυσης βιωσιμότητας με TB και ανάλυσης της βιωσιμότητας ή της “πραγματικής» βιωσιμότητας των CD45+ κυττάρων με FACS. Αντίθετα, η συμφωνία των μεθόδων ανάλυσης βιωσιμότητας με TB και ανάλυσης της βιωσιμότητας ή της “πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με FACS ήταν στατιστικά σημαντικά μη ικανοποιητική.

Οι μέθοδοι με TB και FACS συγκρίθηκαν με ανάλυση κατά Bland και Altman. Η μέση διαφορά μεταξύ της % βιωσιμότητας των TNC (με τη μέθοδο TB) και της % βιωσιμότητας των CD45+ (με τη μέθοδο FACS) ήταν ίση με $-5,64 \pm 8,18\%$, με όρια συμφωνίας μεταξύ $-21,6\%$ και $10,4\%$. Θεωρητικά, τα TNC και τα CD45+, αντιπροσωπεύουν τον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό, και οι δυο μέθοδοι θα έπρεπε να καταλήγουν σε όμοια αποτελέσματα ή τουλάχιστον, επί διαφορετικών αποτελεσμάτων, η σταθερή απόκλιση να είναι μικρότερη από 1-2% και με όρια συμφωνίας που δεν ξεπερνούν το $\pm 10\%$. Με αυτή την προϋπόθεση ίσως οι δυο μέθοδοι να μπορούσαν να θεωρηθούν σύμφωνες, δεδομένου ότι μια σταθερή διαφορά $\pm 10\%$ δε θα είχε κλινική σημασία. Αντίθετα, στη συγκεκριμένη μελέτη, στο 29,5% των περιπτώσεων, η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από $\pm 10\%$: η μέθοδος TB είχε υποτιμήσει την % βιωσιμότητα (σε σχέση με τη βιωσιμότητα με FACS) στο 94,4% αυτών των περιπτώσεων. Οι Varan και συν. εντόπισαν την ίδια ασυμφωνία μεταξύ των δυο μεθόδων ως προς την εκτίμηση της βιωσιμότητας των CD45+ κυττάρων (μέση διαφορά 7,5% με όρια συμφωνίας μεταξύ -43% και 28%) (140). Όσο αφορά στην απόκλιση της μέτρησης με TB από την «πραγματική» βιωσιμότητα των CD45+ κυττάρων, η μέση διαφορά μεταξύ τους ήταν ίση με $4,4 \pm 11,2\%$, με όρια συμφωνίας μεταξύ $-17,45\%$ και $26,38\%$. Στο 42,6% των περιπτώσεων η διαφορά ήταν

μεγαλύτερη από $\pm 10\%$ και η μέθοδος TB είχε υπερεκτιμήσει την % «πραγματική» βιωσιμότητα (σε σχέση με τη βιωσιμότητα με FACS) στο 76,9% αυτών των περιπτώσεων. Στην κλινική πράξη βέβαια ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων και όχι συνολικά των CD45+ κυττάρων έχει σημασία. Οι διαφορές και οι αποκλίσεις των μετρήσεων με TB όμως ήταν ακόμη μεγαλύτερες στην περίπτωση των CD34+ κυττάρων. Η μέση διαφορά μεταξύ της % βιωσιμότητας των TNC (με τη μέθοδο TB) και της % βιωσιμότητας των CD34+ (με τη μέθοδο FACS) ήταν ίση με $8,4 \pm 21,5\%$, με όρια συμφωνίας μεταξύ $-33,74\%$ και $50,54\%$. Στο 60,6% των περιπτώσεων η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από $\pm 10\%$ και η μέθοδος με TB είχε υπερεκτιμήσει την % βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο 70,3% αυτών των περιπτώσεων. Ομοίως, η μέση διαφορά μεταξύ της % βιωσιμότητας των TNC (με τη μέθοδο TB) και της % «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ (με τη μέθοδο FACS) ήταν ίση με $18,3 \pm 19,9\%$, με όρια συμφωνίας μεταξύ $-20,69\%$ και $57,27\%$. Στο 87,5% των περιπτώσεων η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από $\pm 10\%$ και η μέθοδος TB είχε υπερεκτιμήσει την % «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο 83,3% αυτών των περιπτώσεων. Οι Reich-Slotky και συν. συμφωνούν ότι η μέθοδος με TB υπερεκτιμά τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων, με στατιστικά σημαντική διαφορά ($74 \pm 9,9\%$ έναντι $57 \pm 16,4\%$) (151). Σύμφωνα με τους Mascotti και συν. η μέθοδος με TB υπερεκτιμά τη λειτουργικότητα των AAK σε σύγκριση με τη λειτουργικότητα που εκτιμάται με καλλιέργεια των CFU-GM (139). Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού βιωσιμότητας έχουν αναφερθεί πως έχουν μεγαλύτερη συμφωνία με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής από ότι η μέθοδος με TB, όπως για παράδειγμα η μέθοδος καταμέτρησης ζώντων και νεκρών κυττάρων κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού μετά χρώσης με πορτοκαλί της ακριδίνης και βρωμιούχου αιθιδίου (140).

Δεδομένου ότι η βιωσιμότητα των CD34+ και όχι των CD45+ κυττάρων είναι η σημαντική παράμετρος για την έκβαση της AMMO, συμπεραίνουμε, και εμείς όπως και άλλοι, ότι η μέθοδος με TB δε μπορεί να αποτελεί ασφαλή μέθοδο εκτίμησης του απόλυτου αριθμού βιώσιμων και «πραγματικά» βιώσιμων AAK (72, 140). Θεωρούμε όμως ότι, εξαιτίας της ευκολίας και της ταχύτητας της μεθόδου, θα μπορούσε να χρησιμοποιείται ως «αρνητικός» ή «θετικός» δείκτης βιωσιμότητας, σε ένα πρωταρχικό στάδιο ελέγχου της ποιότητας ενός μοσχεύματος. Και αυτό

γιατί, οπωσδήποτε, ένα μηδενικό ή εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό βιωσιμότητας με TB δεν τίθεται σε αμφισβήτηση και μπορεί αυτομάτως να θέσει ένα προϊόν ως ακατάλληλο για επανέγχυση ή ένα ποσοστό υψηλότερο ίσως του 70% μπορεί να θέσει ένα προϊόν ως ασφαλές για έγχυση, αναλόγως του αριθμού των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν, χωρίς περαιτέρω έλεγχο με FACS.

Η μεγάλη διακύμανση τιμών τόσο της % βιωσιμότητας ανά κυτταρικό πληθυσμό μεταξύ των δειγμάτων όσο και μεταξύ της % βιωσιμότητας των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών ανά δείγμα, αλλά και η επίσης μεγάλη διακύμανση τιμών μεταξύ της % απόπτωσης των AAK και μεταξύ της % «πραγματικής» βιωσιμότητας των AAK, οδήγησαν στην αναζήτηση των παραγόντων εκείνων, που πιθανόν να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα και των κυττάρων.

Παράγοντες που επηρέασαν τον προσδιορισμό βιωσιμότητας και απόπτωσης

Ένας από τους παράγοντες που πιθανόν επηρέασε τις πειραματικές μετρήσεις της βιωσιμότητας και της απόπτωσης των AAK στα κρυσυντηρημένα προϊόντα, ήταν το ότι πραγματοποιήθηκαν με την απόψυξη και ανάλυση των δειγμάτων στα δορυφόρα κρυσφιαλίδια, τα οποία είχαν αποκοπεί από τους ασκούς κρυσκατάψυξης την ημέρα της έγχυσης των AAK, και είχαν έκτοτε συντηρηθεί σε ίδιες συνθήκες. Στα περισσότερα κέντρα, δείγματα από τους ασκούς κρυσκατάψυξης φυλάσσονται σε κρυσφιαλίδια που αποθηκεύονται είτε μαζί με τους ασκούς είτε στις ίδιες συνθήκες (152). Αρκετοί ερευνητές όμως έχουν υποστηρίξει πως οι συνθήκες βαθμιαίας κρυσκατάψυξης στα κρυσφιαλίδια διαφοροποιούνται από τις συνθήκες στον ασκό κρυσκατάψυξης, λόγω διαφορετικής χωρητικότητας και υλικού κατασκευής του κρυσφιαλιδίου, και ότι οι τιμές βιωσιμότητας των προϊόντων στα κρυσφιαλίδια πιθανόν να προκύπτουν χαμηλότερες από τις τιμές, που θα προέκυπταν εάν οι μετρήσεις γίνονταν σε προϊόντα ασκών κρυσκατάψυξης (148, 153-155). Σύμφωνα με τους Abbruzzesse και συν., οι οποίοι στη μελέτη τους συνέκριναν τη βιωσιμότητα των CD34+ και των TNC κυττάρων σε ασκούς κρυσκατάψυξης από EVA και σε κρυσφιαλίδια από πολυπροπυλένιο, μόνο η βιωσιμότητα των TNC ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη στα δείγματα των κρυσφιαλιδίων ενώ η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων δε διέφερε στατιστικά σημαντικά (154). Οι Marinelli Busilacchi και συν.

πρότειναν τη χρήση μικρών ασκών αντί των κρυοφιαλιδίων για τη φύλαξη δειγμάτων, θεωρώντας πως συγκριτικά με τα κρυοφιαλίδια, οι μικροί ασκοί αντιπροσωπεύουν καλύτερα τις συνθήκες κρυσσοσυντήρησης στους «μητρικούς» ασκούς κρυοκατάψυξης. Στα πειράματά τους εξάλλου παρατήρησαν πως τα ποσοστά βιωσιμότητας στα κρυοφιαλίδια ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα (58,6%) συγκριτικά με εκείνα στους «μητρικούς» και τους μικρούς ασκούς (72,3% και 73,7%, αντίστοιχα), μεταξύ των οποίων δεν υπήρχε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (148). Δεδομένου ότι η σύσταση των προϊόντων στους «μητρικούς» ασκούς και στα κρυοφιαλίδια, όπως και το υλικό κατασκευής τους ήταν ταυτόσημα, υποθέτουν πως ο μικρός όγκος ή το σχήμα του φιαλιδίου μπορεί να επηρεάζει αρνητικά τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων· οι Douay και συν. επισήμαιναν στη μελέτη τους πως το περιεχόμενο των κρυοφιαλιδίων πιθανόν να παγώνει με ταχύτερο ρυθμό από το περιεχόμενο των ασκών (148). Βέβαια, η κατάψυξη σε μικρούς ασκούς απαιτεί την παρακράτηση σχεδόν 10πλάσιας ποσότητας προϊόντος συλλογής από ότι η κατάψυξη σε κρυοφιαλίδια (5ml έναντι 0,5ml για κάθε δείγμα ασκού κρυοκατάψυξης) το οποίο, ειδικά σε περιπτώσεις συλλογών με μικρό αριθμό CD34+/Kg, δεν είναι δόκιμο (148). Υπάρχουν βέβαια και μελέτες που υποστηρίζουν πως δεν υπάρχει καμία διαφορά στη βιωσιμότητα των κυτταρικών προϊόντων που φυλάσσονται σε ασκούς ή φιαλίδια (110). Επιπροσθέτως, δε μπορούμε να γνωρίζουμε εάν τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα των κρυοφιαλιδίων υφίστανται μεταβολές στο σύντομο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αποκοπή τους και τη μεταφορά τους σε άλλη δεξαμενή ή δοχείο φύλαξης, διαδικασία κατά την οποία παραβιάζεται η σταθερότητα του θερμοκρασιακού περιβάλλοντος. Τα κρυοφιαλίδια της συγκεκριμένης μελέτης φυλάσσονται σε ειδικά κουτιά φύλαξης στην επιφάνεια των δεξαμενών υγρού αζώτου· δε μπορούμε να γνωρίζουμε αν η άνοδος της θερμοκρασίας <-140°C, που συμβαίνει συχνά με το άνοιγμα της δεξαμενής για την εισαγωγή ή την εξαγωγή ασκών, προκαλεί μεταβολές στα κύτταρα (π.χ. σχηματισμό κρυσταλλικών πυρήνων πάγου), οι οποίες οδηγούν σε μείωση της βιωσιμότητάς τους μετά την απόψυξη (52, 156). Θεωρούμε αρκετά πιθανό, τα χαμηλά ποσοστά βιωσιμότητας να οφείλονται εν μέρει στην έκθεση των δειγμάτων σε τέτοιες μεταβολές, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (156). Βέβαια, η χρήση των ίδιων των ασκών αντί των κρυοφιαλιδίων θα μπορούσε να γίνει μόνο σε

αναδρομικούς ελέγχους με ασκούς, που δεν είναι πλέον απαραίτητοι για AMMO. Επομένως, η χρήση δορυφόρων κρυσφαιλιδίων είναι ο πλέον κατάλληλος τρόπος φύλαξης δειγμάτων για τον έλεγχο της βιωσιμότητας πριν την απόψυξη του προς έγχυση προϊόντος και επομένως, εφόσον έχουν αποθηκευτεί σε ιδανικές συνθήκες, είναι απαραίτητη η συσχέτιση της βιωσιμότητας, που προκύπτει από τον περιοδικό έλεγχό τους, με την αποκατάσταση της αιμοποίησης, ώστε να μπορεί να αποτελεί ασφαλές εργαλείο σε ένα εργαστήριο κρυσκατάψυξης (96, 108, 152, 153).

Διαφορετικά ποσοστά βιωσιμότητας έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες, γεγονός που θεωρούμε πως οφείλεται κατά κύριο λόγο στο διαφορετικό τρόπο διαχείρισης των δειγμάτων ή στη διαφορετική μεθοδολογία προσδιορισμού της βιωσιμότητας παρά στα διαφορετικά πρωτόκολλα βαθμιαίας κρυσκατάψυξης και τις συνθήκες κρυσσοσυντήρησης (157). Για παράδειγμα, οι Abrahamsen και συν. στα πειράματά τους, αραιώσαν το αποψυγμένο κυτταρικό εναιώρημα με PBS σε αναλογία 1:20, σε αντίθεση με το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης, όπου η αραιώση ήταν 1:10 (143). Πιθανόν η αραιώση 1:20 να εξασφαλίζει μικρότερη κυτταροτοξικότητα του DMSO μεταξύ απόψυξης και καταμέτρησης. Σύμφωνα με τους Abrahamsen και συν., η αραιώση 1:20 προσομοιάζει περισσότερο στην αραιώση, την οποία υφίσταται το κυτταρικό εναιώρημα μετά την έγχυσή του στο ανθρώπινο σώμα (143). Όμως, δεν εγχύονται πάντα μόνο 200ml προϊόντος σε 5 lt συνολικού όγκου περιφερικού αίματος· αντίθετα, στις περισσότερες περιπτώσεις ο όγκος του προϊόντος που εγχύεται είναι τουλάχιστον 360ml, στα περισσότερα πλέον κέντρα δεν απομακρύνεται το DMSO πριν την έγχυση, και τέλος, στο χρονικό διάστημα των περίπου 10 λεπτών μεταξύ απόψυξης και ολοκλήρωσης της έγχυσης, το προϊόν δεν υφίσταται αραιώση. Για τους παραπάνω λόγους θεωρούμε ότι η αραιώση 1:10 προσομοιάζει περισσότερο με τις πραγματικές συνθήκες κατά την επανέγχυση των AAK. Θεωρούμε επίσης πως διαφορετικά πρωτόκολλα με διαφορετικές ποσότητες αντισωμάτων και διαλυμάτων, διαφορετικούς χρόνους επώασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικές πρακτικές πλύσης των δειγμάτων οδηγούν και σε διαφορετικά αποτελέσματα. Οι Kim και συν. στο πειραματικό τους πρωτόκολλο, επώασαν τα δείγματα με CD34-PE και CD45-FITC για 20min και έπειτα από το στάδιο λύσης (15 min) και φυγοκέντρηση πρόσθεσαν Annexin-V binding buffer, Annexin V-APC και 7-AAD για επώαση 15 λεπτών πριν την

καταμέτρηση (73). Οι Abrahamsen και συν. μετά από επώαση του κυτταρικού ελαιωρήματος με 20μL αντισώματος CD34-PE στον πάγο στο σκοτάδι για 30min, πλύση και επανασύσταση του διαλύματος με 800μL binding buffer, πρόσθεσαν 7μL Annexin V-FITC και 25μL 7-AAD για επώαση 15min πριν τη καταμέτρηση (147). Σε άλλο πείραμα των Abrahamsen και συν. προηγήθηκε πλύση των κυττάρων με PBS και φυγοκέντρηση στα 400g για 10min πριν τη προσθήκη 20μL αντισώματος CD34-PE και επώαση στο πάγο και το σκοτάδι για 30min. Μετά από δεύτερη πλύση και επανασύσταση του ιζήματος με 800μL binding buffer, προστέθηκαν 5μL Annexin-V-FITC με 25 μL 7-ADD για επώαση στον πάγο και το σκοτάδι επί 15min πριν τη καταμέτρηση στο κυτταρόμετρο (143). Οι Duggleby και συν. μετά την επώαση των κυτταρικών ελαιωρημάτων με τα αντισώματα CD34-PE και CD45-APC, το στάδιο λύσης, φυγοκέντρηση στα 800g για 5min στους 4°C, επανασύσταση του κυτταρικού ιζήματος με Annexin-V binding buffer σε συγκέντρωση κυττάρων περίπου 1×10^6 /mL, πρόσθεσαν Annexin-V-FITC και 7AAD για επώαση 10min σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη καταμέτρηση (76). Στα προκαταρκτικά πειράματα, που προηγήθηκαν του τελικού πρωτοκόλλου καταμέτρησης της βιωσιμότητας και της απόπτωσης της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκαν σχεδόν διπλάσια ποσοστά απόπτωσης, όταν αναμείχθηκαν διπλάσιες ποσότητες αντισώματος Annexin-V (20μl) σε σχέση με τα αντισώματα των CD34+ και CD45+ (10μl) (158). Πράγματι, η ποσότητα της Annexin-V παίζει καθοριστικό ρόλο στην ορθή διάκριση μεταξύ ζωντανών και αποπτωτικών πληθυσμών (144). Σε συνέχεια των προκαταρκτικών πειραμάτων, υιοθετήσαμε τροποποιήσεις ώστε να ελαχιστοποιήσουμε τους τεχνικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα και την απόπτωση μετά την απόψυξη. Η πλύση του προϊόντος από το DMSO εγκαταλείφθηκε, εφόσον, και εμείς όπως και άλλοι, δεν παρατηρήσαμε καμία διαφοροποίηση στα ποσοστά βιωσιμότητας και απόπτωσης, ως αποτέλεσμα της κυτταροτοξικότητας του DMSO, όταν τα προϊόντα αραιώνονταν αμέσως μετά την απόψυξη και παρέμεναν στους 4°C σε όλα τα μετέπειτα βήματα (71-74). Σύμφωνα με τους Fritsch και συν. βέβαια η βιωσιμότητα των TNC και των CD34+ κυττάρων φαίνεται πως επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία κατά την επώαση με τα αντισώματα: στους 4°C ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη από ότι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (155). Ο χρόνος επώασης των αντισωμάτων μειώθηκε από 20min σε 10min ώστε να μειωθεί η

διάρκεια έκθεσης των κυττάρων στο DMSO, εφόσον και εμείς όπως και άλλοι δεν παρατηρήσαμε διαφοροποίηση του τελικού αποτελέσματος από την ελάττωση του χρόνου επώασης (72). Το στάδιο λύσης εγκαταλείφθηκε επίσης, καθώς έχει δειχθεί πως κατά τη λύση των ερυθρών ενδεχομένως απελευθερώνονται μόρια, τα οποία να προκαλούν εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων, γεγονός που τελικά θα οδηγούσε σε ψευδή αριθμό αποπτωτικών κυττάρων (72, 75, 76). Καταλήξαμε λοιπόν πως με την ταυτόχρονη ανάμειξη 20μl CD34-PE, 20μl CD45-FITC, 20μl 7-ADD-PerCP και 5μl Annexin-V-APC σε 100μl κυτταρικού εναιωρήματος αραιωμένου 1:10 με PBS (4°C), το οποίο δεν έχει υποστεί πλύση από το DMSO, τη προσθήκη 100 μl Annexin buffer και την επώαση για 10min στους 4°C στο σκοτάδι, χωρίς στάδιο λύσης, και τελικά τη καταμέτρηση μετά την προσθήκη 300μl Binding Buffer, μπορούμε να έχουμε ασφαλή αποτελέσματα.

Η απόπτωση αποτελεί ένα φαινόμενο δυναμικό, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στο στικτόγραμμα Annexin-V έναντι 7-ADD, με τη χαρακτηριστική εικόνα της «συνέχειας» των πληθυσμών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μη ακριβή οριοθέτηση μεταξύ του πληθυσμού των ζωντανών μη αποπτωτικών κυττάρων και του πληθυσμού των ζωντανών πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων και συνεπακόλουθα την υποκειμενική αξιολόγηση των ορίων των πληθυσμών. Ο συνδυασμός της παρατήρησης των στικτογραμμάτων Annexin-V έναντι 7-ADD, SSC έναντι 7-ADD και SSC έναντι FSC μπορεί να βοηθήσει αρκετά στην ασφαλέστερη οριοθέτηση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρών πληθυσμών.

Ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των αποψυγμένων CD34+ κυττάρων παραμένει δύσκολος για πολλά εργαστήρια κρυοκατάψυξης είτε για τεχνικούς λόγους (π.χ. πρόσβαση σε κυτταρόμετρο, δυνατότητα απόψυξης του δείγματος σε πολύ κοντινό χώρο με το εργαστήριο) είτε εξαιτίας αρκετών προαναλυτικών και αναλυτικών μεταβλητών (π.χ. κυτταρική θραύση, επαγωγή απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου, κυτταροτοξικότητα του DMSO ή άλλων αντιδραστηρίων) που ενδεχομένως επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα (96).

Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα και την απόπτωση των AAK

Η κρυοκατάψυξη των κυττάρων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο τόσο με τη μορφή της νέκρωσης όσο και με την μορφή της απόπτωσης (49). Ο κυτταρικός θάνατος κατά

την κρυοκατάψυξη οφείλεται στην αφυδάτωση και στον ενδοκυτταρικό σχηματισμό κρυστάλλων πάγου αναλόγως του ρυθμού ψύξης και της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών στο νερό (50, 51). Όταν η ψύξη είναι «ιδανικά» αργή, δίδεται η δυνατότητα στο κύτταρο να αφυδατωθεί τόσο ώστε να μην κρυσταλλωθεί ενδοκυτταρικά και όταν η απόψυξη είναι «ιδανικά» ταχεία δίδεται η δυνατότητα το κύτταρο να αποψυχθεί πριν οι ήδη σχηματισμένοι κατά την ψύξη μικροί ενδοκυτταρικοί κρύσταλλοι πάγου μεγαλώσουν ή συσσωματωθούν (51-53, 55). Από την άλλη, τα κύτταρα των θηλαστικών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις αλλαγές της συγκέντρωσης των διαλυμάτων, και γενικώς επιβιώνουν της αργής ψύξης μόνο παρουσία κρυοπροστατευτικού διαλύματος, το οποίο, δρώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα άλατος, προστατεύει το κύτταρο από το σχηματισμό εξωκυτταρικών κρυστάλλων πάγου (50, 51, 53, 55). Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα, βέβαια, είναι προστατευτικά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες κατάψυξης, ενώ σε διαφορετικές συνθήκες μετατρέπονται σε βλαπτικά για το κύτταρο και δύναται να προκαλέσουν τα ίδια μη αναστρέψιμες βλάβες στα κύτταρα, τόσο κατά την ψύξη όσο και κατά την απόψυξη, ανάλογα με την τελική συγκέντρωσή τους στο διαλύτη, το χρόνο και τη θερμοκρασία έκθεσης των κυττάρων σε αυτά, και κυρίως προκαλώντας διόγκωση μέσω όσμωσης (52). Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα μπορούν να προκαλέσουν επίσης και αναστρέψιμες δομικές αλλαγές στα κύτταρα, όπως αλλαγές στη λιπιδική στιβάδα ή άλλα δομικά στοιχεία των μεμβρανών (55). Η συγκέντρωση του κρυοπροστατευτικού διαλύματος παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της βιωσιμότητας του κρυοκατεψυγμένου προϊόντος καθώς, πολύ χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να είναι ανεπαρκής και πολύ υψηλή μπορεί να είναι κυτταροτοξική (159). Τα πρωτόκολλα κρυοκατάψυξης, που έχουν ως επί το πλείστον υιοθετηθεί, χρησιμοποιούν για τη παρασκευή κρυοπροστατευτικού διαλύματος DMSO, σε τελική συγκέντρωση μετά την ανάμειξη με το κυτταρικό προϊόν, 10%. Στη προσπάθεια ελάττωσης της ποσότητας του DMSO που εγχύεται στον ασθενή στην AMMO, έχει προταθεί ελάττωση της τελικής συγκέντρωσης του DMSO σε 7,5% ή 5% χωρίς ελάττωση της βιωσιμότητας ή αύξηση της απόπτωσης των CD34+ κυττάρων (147, 160). Η σύνθεση του κρυοπροστατευτικού διαλύματος πιθανότατα επηρεάζει επίσης τη ποιότητα του κρυοσυντηρημένου προϊόντος. Τα εργαστήρια κρυοκατάψυξης χρησιμοποιούν διαφορετικής σύνθεσης κρυοπροστατευτικά

διαλύματα με πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο το διάλυμα με 100% DMSO σε 5% ανθρώπινης αλβουμίνης σε 0,9% NaCl σε τελική συγκέντρωση 20%. Εναλλακτικά αντί της αλβουμίνης (ή σε συνδυασμό) χρησιμοποιείται αυτόλογο πλάσμα, η επίδραση της πρωτεϊνικής σύστασης του οποίου στα χαρακτηριστικά του κρυοπροστατευτικού διαλύματος και κατ' επέκταση στη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων δεν έχει εκτενώς εξεταστεί. Σε μελέτη τους οι Smagur και συν. δε βρήκαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων που καταψύχθηκαν είτε με αλβουμίνη είτε με αυτόλογο πλάσμα (161). Ο παράγοντας αυτός ελέγχθηκε επίσης στη παρούσα μελέτη (αποτελέσματα δεν αναφέρονται) και δε παρατηρήθηκε να έχει σημασία. Επιπροσθέτως, σε θερμοκρασίες >10°C το DMSO είναι κυτταροτοξικό (153). Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως στις συγκεντρώσεις 5-10% που χρησιμοποιείται για την κρυοκατάψυξη των AAK η θερμοκρασία παίζει το μικρότερο ρόλο στην κυτταροτοξικότητα του, ακόμα και όταν πρόκειται για θερμοκρασία περιβάλλοντος (162). Ο χρόνος που απαιτείται για τον χειρισμό των κυττάρων από τη στιγμή της προσθήκης του κρυοπροστατευτικού διαλύματος έως την έναρξη της κατάψυξης, επιτρέπει στο κρυοπροστατευτικό διάλυμα να εισέλθει στο κύτταρο. Όταν αυτός ο χρόνος είναι πολύς, είναι πιθανόν, κατά την ταχεία απόψυξη, να μην υπάρχει ο αντίστοιχα απαιτούμενος χρόνος ώστε η επιπλέον ποσότητα, που έχει εισέλθει στο κύτταρο κατά την αργή ψύξη, να διαχυθεί πάλι στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα διογκώνονται μέσω όσμωσης κατά την απότομη αραίωση του εξωκυττάρου διαλύματος με την τήξη του πάγου ή με τη διάλυσή τους σε φυσιολογικό διάλυμα και τελικά λύνονται (52). Για το λόγο αυτό ο χρόνος από τη στιγμή της προσθήκης του κρυοπροστατευτικού διαλύματος έως την έναρξη της κατάψυξης οφείλει να μην υπερβαίνει τα 15-20min. Η διαδικασία της βαθμιαίας κρυοκατάψυξης των AAK, μπορεί να επηρεάσει σε πολλά επίπεδα τη βιωσιμότητα τους. Η γεωμετρία του βαθμιαίου κρυοκαταψύκτη, η απόσταση μεταξύ των ασκών κρυοκατάψυξης και το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένοι, αποτελούν όλα σημαντικές παραμέτρους που μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό κατάψυξης (153). Αυξομειώσεις της θερμοκρασίας κατά τη βαθμιαία κατάψυξη είναι καταστρεπτικές για τα κυτταρικά οργανίδια και τη λειτουργικότητα του κυττάρου (153).

Μεταξύ κατάψυξης και απόψυξης μεσολαβεί ένα σύντομο ή μακρύ διάστημα κρυοσυντήρησης, κατά το οποίο το κύτταρο περιβαλλόμενο από ένα λεπτό στρώμα υαλοποιημένου κρυοπροστατευτικού διαλύματος διατηρείται σε μια υαλώδη μορφή εγκλωβισμένο σε μια μάζα πάγου. Η συνθήκη αυτή είναι σταθερή και μη επιβλαβής για το ήδη κατεψυγμένο κύτταρο μόνο εφόσον η θερμοκρασία συντήρησης διατηρείται κάτω από τους -140°C · η κρυοσυντήρηση σε θερμοκρασίες αρκετά υψηλότερες των -140°C πιθανόν να οδηγούν τόσο σε ελάττωση της βιωσιμότητας όσο και σε αύξηση της απόπτωσης (52, 57, 163). Οι μεγάλες μεταβολές της θερμοκρασίας κοντά στο όριο των -120°C , κατά τη κρυοσυντήρηση, μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολές του μεγέθους κρυστάλλων, οι οποίες κατά την απόψυξη θα μειώσουν την βιωσιμότητα των κυττάρων (50). Τέτοιες μεταβολές παρατηρούνται είτε από εξασθένηση της μόνωσης κενού αέρος του τοιχώματος των δεξαμενών φύλαξης, είτε από ανεπαρκή τροφοδοσία τους με υγρό άζωτο, είτε από συχνό άνοιγμα της δεξαμενής για αρκετή ώρα για την εισαγωγή ή την εξαγωγή ασκών κρυοκατάψυξης. Στη μελέτη τους οι Fernyhough και συν. θεωρούν πως η ελάττωση της βιωσιμότητας που παρατηρήθηκε στα δείγματα που είχαν κρυοσυντηρηθεί για μακρό χρονικό διάστημα έως και 19 έτη, οφειλόταν περισσότερο σε μεταβολές της θερμοκρασίας κατά τη κρυοσυντήρηση παρά στη μεταβολή του χρόνου (156). Υπάρχει πάντοτε το ερώτημα για το πόσο μεγάλο χρονικό διάστημα τα κύτταρα μπορούν να κρυοσυντηρηθούν χωρίς να κινδυνεύουν από βλάβες. Σε θερμοκρασίες -196°C , δε λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις ούτε υπάρχει πιθανότητα υγροποίησης με κίνδυνο τον σχηματισμό κρυσταλλικών πυρήνων (50, 164). Σύμφωνα με τους Mazur και συν. στους -196°C το κύτταρο ίσως να υφίσταται μόνο βλάβες στο DNA μέσω φωτοφυσικών γεγονότων, π.χ. σχηματισμό ελεύθερων ριζών, οι οποίες, εφόσον σε αυτές τις θερμοκρασίες καμία ενζυμική επιδιόρθωση δε λαμβάνει χώρα, δε μπορούν να διορθωθούν, και μπορούν να αποβούν θανατηφόρες για το κύτταρο μετά την αναθέρμανση σε φυσιολογικές θερμοκρασίες· βέβαια θα χρειαζόνταν αιώνες κρυοσυντήρησης ώστε η συσσώρευση αυτών των φυσικοχημικών γεγονότων να είναι αρκετή για να προκαλέσει βλάβη στο κύτταρο (52). Άρα η βιωσιμότητα των κυττάρων υπό κρυοσυντήρηση στους -196°C δε θα πρέπει να είναι χρονοεξαρτώμενη. Οι Abbruzzese και συν. δε διαπίστωσαν καμία διαφορά στη βιωσιμότητα των CD34+

κυττάρων που φυλάσσονταν σε κρυοφιαλίδια για σύντομο (5 εβδομάδες) ή για μακρό (9-10 έτη) χρονικό διάστημα (154). Οι Lee και συν. επίσης δε διαπίστωσαν μείωση της βιωσιμότητας των TNC ή των CD34+ κυττάρων σε αποψυγμένα δείγματα ομφαλίου λώρου σε σχέση με την αύξηση του χρόνου κρυοσυντήρησης. Ούτε οι Kim και συν. διαπίστωσαν αύξηση της νέκρωσης ή της απόπτωσης σε δείγματα ομφαλίου λώρου, που είχαν κρυοσυντηρηθεί έως και 8 έτη (73). Οι Kurita και συν., έπειτα από τον έλεγχο 120 μονάδων ομφαλίου λώρου που είχαν κρυοσυντηρηθεί για 11-12 έτη, δε διαπίστωσαν καμία διαφοροποίηση της λειτουργικότητας των AAK σε σχέση με το χρόνο κρυοσυντήρησης (165). Οι Mitchell και συν. σε αναδρομική μελέτη με 288 ασθενείς, που μεταμοσχεύθηκαν με AAK μονάδων ομφαλίου λώρου, οι οποίοι είχαν κρυοσυντηρηθεί για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0,08 έως 11,07 έτη) δε διαπίστωσαν καμία συσχέτιση της διάρκειας της κρυοσυντήρησης με τη βιωσιμότητα ή τον αριθμό των λειτουργικών CD34+ κυττάρων ή την αιματολογική αποκατάσταση μετά τη μεταμόσχευση (71). Στη μελέτη των Pavlū και συν., κατά την ανάλυση της αιματολογικής αποκατάστασης ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα που υπεβλήθησαν σε δεύτερη AMMO, με AAK που είχαν κρυοσυντηρηθεί από τη φάση της πρώτης AMMO, δε προέκυψε καμία διαφοροποίηση ή καθυστέρηση που να υποδεικνύει ελάττωση της βιωσιμότητας ή της λειτουργικότητας των AAK με το πέρασ του χρόνου (166). Στη μελέτη μας «The effect of cryopreservation on the viability and apoptosis of hematopoietic stem cells: reappraisal by a single center experience», η βιωσιμότητα των CD34+ και TNC κυττάρων δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων που κρυοσυντηρήθηκαν για χρονικό διάστημα μικρότερο του 1 έτους, για 1-5 έτη και για περισσότερο από 5 έτη (158). Σε κάποιες, λιγότερες, μελέτες έχει παρατηρηθεί ελάττωση της βιωσιμότητας των TNC και των CD34+ κυττάρων με την αύξηση του χρόνου κρυοσυντήρησης. Στη μελέτη των Fernyhough και συν., σε δείγματα με μέση διάρκεια κρυοσυντήρησης τα 15 έτη διαπιστώθηκε μια μέση βιωσιμότητα 58%, με στατιστικά σημαντική ελάττωση της βιωσιμότητας σε σχέση με τη διάρκεια κρυοσυντήρησης, με ρυθμό 0,282 ανά μήνα· όμως δε παρατηρήθηκε και αντίστοιχη ελάττωση των CFU-GM (156).

Η διαδικασία της απόψυξης και έγχυσης των AAK αποτελεί επίσης ένα κρίσιμο στάδιο για τη βιωσιμότητά τους. Η διακοπή της απόψυξης και η εξαγωγή του ασκού

από το υδατόλουτρο την «ιδανική» στιγμή, δηλαδή όταν στο κυτταρικό προϊόν υπάρχει ακόμα ένα μικρό κομμάτι πάγου, είναι καθοριστική για την επιβίωση των αποψυγμένων κυττάρων. Πρώτον, το κομμάτι πάγου διαλυόμενο με ανάδευση εκτός του υδατόλουτρου φέρνει το προϊόν σε μια θερμοκρασία αρκετά χαμηλότερη από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος αλλά ταυτόχρονα ανεκτή από τον ασθενή κατά την έγχυση, με αποτέλεσμα την μετρίαση της κυτταροτοξικότητας του DMSO. Δεύτερον, το κομμάτι πάγου αποτελώντας «δείκτη» εξόδου του κυτταρικού προϊόντος από το υδατόλουτρο, αποτρέπει τη παράταση της απόψυξης, που θα είχε ως αποτέλεσμα την υπερθέρμανση του προϊόντος με επακόλουθο την αύξηση της απόπτωσης και της νέκρωσης των κυττάρων (146). Η χρονική διάρκεια έγχυσης είναι επίσης εξαιρετικά σημαντική, επίσης εξαιτίας της κυτταροτοξικότητας του DMSO. Κάποια κέντρα εφαρμόζουν τη διαδικασία πλύσης από το DMSO πριν την έγχυση, όμως ιδιαίτερα σε μοσχεύματα με μικρό αριθμό CD34+ είναι προτιμότερο να αποφεύγεται, καθώς η απώλεια κυττάρων κατά την πλύση μπορεί να είναι αρκετά μεγάλη με αποτέλεσμα την εξαιρετική μείωση της δόσης των CD34+/Kg (153).

Συμπερασματικά, κατά την ψύξη ενός κυττάρου, οι φυσικές αλλαγές αφορούν είτε αφυδάτωση λόγω όσμωσης είτε ενδοκυτταρικό σχηματισμό πάγου, οι δε βιολογικές βλάβες, με βασικό δέκτη τις μεμβράνες, κυμαίνονται από αβλαβείς έως μη αναστρέψιμες, και είναι ανάλογες με τον τύπο του κυττάρου, τη ταχύτητα ψύξης και απόψυξης, την ελάχιστη θερμοκρασία ψύξης και το είδος και τη συγκέντρωση του κρυοπροστατευτικού διαλύματος (51). Διάφοροι μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένων του οξειδωτικού και οσμωτικού στρες, της μηχανικής τριβής από τους κρυστάλλους πάγου, της διαφοροποίησης των φυσικών ιδιοτήτων των κυτταρικών δομών, και της διατάραξης της ομοιόστασης των ιόντων, είναι υπεύθυνα για την κυτταρική βλάβη κατά τις διαδικασίες της βαθμιαίας κρυοκατάψυξης και απόψυξης (49, 58). Τη μεγαλύτερη δε δοκιμασία διατήρησης της βιωσιμότητας το κύτταρο την περνάει σε μια ενδιάμεση ζώνη θερμοκρασιών μεταξύ των -15 και -60°C, από την οποία πρέπει να περάσει δύο φορές, μία κατά την ψύξη και μία κατά την απόψυξη (52). Η βλάβη του κυττάρου κατά την ψύξη δεν αποτελεί όμως στιγμιαίο φαινόμενο. Στο διάστημα από την έναρξη της κατάψυξης μέχρι την επαναφορά στη φυσιολογική κατάσταση μετά την απόψυξη, το κύτταρο υπόκειται σε μια αλληλουχία φυσικοχημικών φαινομένων, καθένα από τα οποία

είναι δυνητικά θανατηφόρα και, για την επιβίωση του κυττάρου θα πρέπει καθένα από αυτά να αποφεύγεται ή να μετριάζεται (52). Μέχρι σήμερα έχουν σημειωθεί αρκετές προσπάθειες για την εξακρίβωση της επιρροής των διαφόρων σταδίων βαθμιαίας κρυοκατάψυξης και απόψυξης στην κυτταρική βιωσιμότητα και απόπτωση, όμως τα δεδομένα για τους παράγοντες και τους μηχανισμούς που τελικά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο κατά την κρυοκατάψυξη είναι λιγοστά (49). Μελέτες έχουν δείξει ότι η κρυοκατάψυξη, εκτός από τη νέκρωση, επάγει και την απόπτωση με κατάληξη τον κυτταρικό θάνατο (45, 58-60, 143). Σε μελέτες έχει άλλωστε δειχθεί πως η χαμηλότερη βιωσιμότητα και λειτουργικότητα των AAK μετά τη κρυοκατάψυξη ή η καθυστέρηση ή η αποτυχία στην αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO σχετίζεται περισσότερο με την απόπτωση παρά με τη νέκρωση (76, 149). Η διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης των κυττάρων φαίνεται πως συνδέεται με την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και, σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες, η απόπτωση ως φαινόμενο λαμβάνει χώρα, σε σημαντικό βαθμό, κυρίως κατά την απόψυξη (167). Φαίνεται επίσης πως είναι μια ταχύτατη διαδικασία, με μορφολογικές μεταβολές που παρατηρούνται εντός ωρών μετά την απόψυξη (40, 58-60). Άλλες μελέτες, όπως των Χυ και συν. έδειξαν πως η μείωση της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των κυττάρων προκαλείται κυρίως κατά την διαδικασία της κατάψυξης (45). Κάθε μια από τις οφειλόμενες στην κρυοκατάψυξη αλλαγές στο κύτταρο, είτε είναι βιοχημικές αλλαγές είτε μορφολογικές, μπορούν να πυροδοτήσουν και ένα διαφορετικό αποπτωτικό μηχανισμό (49). Τα αποτελέσματα της μελέτης των Stroh και συν. υπέδειξαν το μιτοχονδριακό μονοπάτι ως το βασικό αποπτωτικό μονοπάτι και τη κασπάση-3, ως τη βασική κασπάση, που ενεργοποιείται μετά από βλάβες του κυττάρου κατά την κρυοκατάψυξη-απόψυξη (58). Αντίθετα, σύμφωνα με τους Χυ και συν., η αναστολή των κασπασών-8 και -9 μέσω του αναστολέα ROCK δείχνει ότι η επαγωγή της απόπτωσης ακολουθεί τόσο το ενδογενές όσο και το εξωγενές μονοπάτι (45). Σε κάθε περίπτωση η διαδικασία της κρυοκατάψυξης και απόψυξης οδηγεί σε απώλεια ζωντανών CD34+ κυττάρων εξαιτίας πρώιμης αλλά μη αντιστρεπτής απόπτωσης (168). Τόσο εμείς όσο και άλλοι έχουμε διαπιστώσει πως και η διάρκεια της κρυοσυντήρησης σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την αύξηση της απόπτωσης των CD34+ κυττάρων. Στη μελέτη των Lee και συν. παρότι δε

παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού νέκρωσης με την αύξηση του χρόνου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της απόπτωσης· αντίστοιχη μείωση της κλωνογενικότητας των CD34+ κυττάρων όμως δε παρατηρήθηκε (157). Στη μελέτη μας «The effect of cryopreservation on the viability and apoptosis of hematopoietic stem cells: reappraisal by a single center experience», διαπιστώθηκε επίσης σημαντική αύξηση της απόπτωσης των CD34+ κυττάρων σε σχέση με την αύξηση της διάρκειας της κρυοσυντήρησης, ιδιαίτερα για τα κυτταρικά προϊόντα που είχαν κρυοσυντηρηθεί για πλέον των 5 ετών, παρότι δε παρατηρήθηκε αντίστοιχη ελάττωση της βιωσιμότητάς τους (158).

Θεωρητικά, κάτω από ιδανικές συνθήκες κρυοσυντήρησης, τα AAK διατηρούν τη βιωσιμότητά τους (71, 143, 154). Παρότι το πρωτόκολλο βαθμιαίας κρυοκατάψυξης, κρυοσυντήρησης και απόψυξης των προϊόντων τηρήθηκε αυστηρά σε όλες τις επεξεργασίες των υπό μελέτη προϊόντων, παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση τιμών τόσο της % βιωσιμότητας, όσο και της απόπτωσης και της % «πραγματικής» βιωσιμότητας μεταξύ των δειγμάτων. Εξετάσθηκε, κατά συνέπεια, το σύνολο εκείνων των παραγόντων, που θα μπορούσαν να επηρεάζουν «ενδογενώς» τις συνθήκες βαθμιαίας κρυοκατάψυξης και κρυοσυντήρησης, όπως τα χαρακτηριστικά των ασθενών ή τα χαρακτηριστικά των φρέσκων προϊόντων, ή να τροποποιούν «εξωγενώς» τη βιωσιμότητα και απόπτωση, όπως οι παράμετροι κρυοκατάψυξης. Οι παράγοντες που εξετάσθηκαν αφορούν α) στα χαρακτηριστικά των ασθενών, το φύλο, την ηλικία, το νόσημα, την κατάσταση νόσου κατά τη συλλογή AAK, β) στα χαρακτηριστικά της κινητοποίησης και της συλλογής των AAK, το σχήμα κινητοποίησης, τη χορήγηση Plerixafor, τη πτωχή κινητοποίηση, το ποσοστό CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα, τη βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα γ) στα χαρακτηριστικά της κρυοκατάψυξης των κυττάρων, τη συντήρηση προ κατάψυξης, τη βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων προ κατάψυξης, τη συγκέντρωση CD45+, CD34+, PLT και PMN στον ασκό κρυοκατάψυξης, τον όγκο του περιεχομένου του ασκού κρυοκατάψυξης, τη διάρκεια κρυοσυντήρησης.

Μεταξύ των ασθενών διαφορετικού φύλου και διαφορετικής ηλικίας δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά βιωσιμότητας ή απόπτωσης των TNC, των CD45+ και των CD34+ κυττάρων, παρά μόνο μία

στατιστικά σημαντική μέτρια πτωτική τάση της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD45+ κυττάρων σε σχέση με την ηλικία, χωρίς ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι ασθενείς με διαφορετικά νοσήματα δε παρουσίασαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα ποσοστά βιωσιμότητας, αν και συγκριτικά, οι ασθενείς με HL είχαν συνολικά καλύτερη βιωσιμότητα των TNC, των CD45+ και των CD34+ κυττάρων έναντι των ασθενών με NHL και των ασθενών με MM. Ενδιαφέρουσα, αν και μη στατιστικά σημαντική, ήταν η αρκετά μικρότερη βιωσιμότητα και το αισθητά υψηλότερο ποσοστό απόπτωσης των CD34+ κυττάρων των ασθενών με NHL, όπως επίσης και το αισθητά χαμηλότερο ποσοστό απόπτωσης ασθενών με HL. Το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των ασθενών με NHL, HL και MM (23%, 48% και 34,4% αντίστοιχα, $p=0,022$) και συγκεκριμένα μεταξύ των ασθενών με NHL και HL ($p=0,018$), ενώ μεταξύ των ασθενών με HL και MM διέφερε στατιστικώς σημαντικά το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ κυττάρων (56,3% και 42%, αντίστοιχα, $p=0,022$). Η κατάσταση νόσου κατά τη συλλογή των AAK δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα και απόπτωση των CD34+ κυττάρων με στατιστικά σημαντικό τρόπο αν και ήταν διακριτές οι διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μεταξύ των ασθενών, που βρίσκονταν ή όχι σε πλήρη ύφεση κατά τη συλλογή AAK. Αντίθετα, η βιωσιμότητα των TNC και των CD45+ κυττάρων των ασθενών, που δε βρίσκονταν σε πλήρη ύφεση, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με των υπολοίπων (51% έναντι 61%, $p=0,005$ και 58,3% έναντι 68,2%, $p=0,021$, αντίστοιχα).

Στατιστικά σημαντική ήταν η μεγαλύτερη % βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων και το μεγαλύτερο ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων των ασθενών, που κινητοποιήθηκαν με χημειοθεραπεία και G-CSF σε σχέση με εκείνων, που κινητοποιήθηκαν μόνο με G-CSF (48,9% έναντι 17,3%, $p=0,016$ και 33,6% έναντι 14,4%, $p=0,037$ αντίστοιχα). Στους ασθενείς, που χορηγήθηκε Plerixafor, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ελαττωμένη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων (31,4% έναντι 51,1%, $p=0,036$) και στατιστικά σημαντικό ελαττωμένο ποσοστό «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων (23,3% έναντι 35,6%, $p=0,026$). Μεταξύ όμως των πτωχών, των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις διάμεσες τιμές βιωσιμότητας

των CD34+ κυττάρων, αν και τόσο τα ποσοστά των βιώσιμων όσο και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ήταν διακριτά μεγαλύτερα στους πολύ καλούς κινητοποιητές (54% και 36,9%, αντίστοιχα), λιγότερο καλά στους καλούς κινητοποιητές (43,7% και 26,7%, αντίστοιχα), και ελαττωμένα στους πτωχούς κινητοποιητές (35,2% και 23%, αντίστοιχα). Αντίστροφη εικόνα παρατηρήθηκε για την % βιωσιμότητα των TNC και των CD45+, όπου οι πτωχοί κινητοποιητές είχαν καλύτερη βιωσιμότητα, οι καλοί κινητοποιητές λιγότερο καλή και οι πολύ καλοί κινητοποιητές τη λιγότερο καλή, χωρίς οι διαφορές μεταξύ τους να είναι στατιστικά σημαντικές. Στατιστικά σημαντική ήπια αύξηση της % βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων, όπως και το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων, παρατηρήθηκε με την αύξηση του ποσοστού των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής. Στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά βιώσιμων και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων είχαν οι ασθενείς, οι οποίοι είχαν ποσοστό CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής μεγαλύτερο από 0,46% (62,9% έναντι 32,7%, $p=0,002$ και 43% έναντι 23,3%, $p=0,001$, αντίστοιχα). Βέβαια από την ανάλυση προέκυψε πως το αυξημένο ή μειωμένο ποσοστό των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα σχετίζεται σημαντικά με την κινητοποίηση με ή χωρίς χημειοθεραπεία, τη χορήγηση Plerixafor και το νόσημα. Κανένας από τους ασθενείς, που κινητοποιήθηκε μόνο με G-CSF, δε παρήγαγε CD34+ κύτταρα σε ποσοστό $>0,46\%$, ενώ στους ασθενείς, που κινητοποιήθηκαν με χημειοθεραπεία και G-CSF και είχαν $>0,46\%$ CD34+ κύτταρα στο περιφερικό αίμα, η % βιωσιμότητα και η «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη (62,9% έναντι 40,9%, $p=0,008$ και 43% έναντι 25,6%, $p=0,004$, αντίστοιχα). Επίσης κανένας από τους ασθενείς που έλαβε Plerixafor δεν παρήγαγε CD34+ κύτταρα σε ποσοστό $>0,46\%$, ενώ στους ασθενείς, που δεν έλαβαν Plerixafor και είχαν $>0,46\%$ CD34+ κύτταρα στο περιφερικό αίμα, η % βιωσιμότητα και η «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη (62,9% έναντι 40,4%, $p=0,018$ και 43,1% έναντι 24,2%, $p=0,019$, αντίστοιχα). Στους ασθενείς με HL και $\leq 0,46\%$ ή $>0,46\%$ ποσοστό CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος η διαφορά της % βιωσιμότητας και της % «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, στους ασθενείς με BNL ή

MM και $\leq 0,46\%$ CD34+ κύτταρα περιφερικού αίματος η % βιωσιμότητα και η % «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερες (27% έναντι 60,9%, $p=0,02$ και 19,7% έναντι 43,2%, $p=0,013$, για τα NHL και 31,4% έναντι 63,2%, $p=0,07$ και 26,4% έναντι 41,8%, $p=0,02$ για τα MM). Οι ασθενείς των οποίων η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής ήταν $\leq 97,3\%$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων μετά τη απόψυξη (24,1% έναντι 51,5%, $p=0,009$) και στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων (21,5% έναντι 35,3%, $p=0,001$). Το ποσοστό βιώσιμων CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα δε σχετίζεται σημαντικά με την κινητοποίηση με ή χωρίς χημειοθεραπεία ή τη χορήγηση Plerixafor, αλλά σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με το νόσημα.

Η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων και το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη παρουσίασαν μείωση με την ελάττωση της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων στο προϊόν συλλογής πριν την κατάψυξη. Οι ασθενείς με % βιώσιμων CD34+ κυττάρων προ κατάψυξης $\leq 98,7\%$ είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας CD34+ κυττάρων και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη (40,9% έναντι 62,5%, $p=0,036$ και 22,9% έναντι 34,4%, $p=0,035$, αντίστοιχα). Σημαντική επίσης παράμετρος μπορεί να είναι η παρουσία αποπτωτικών κυττάρων σε φρέσκα προϊόντα ήδη πριν τη κατάψυξη, που διαπιστώθηκε από τους de Boer και συν. (146). Όπως προκύπτει από την ανάλυση, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής δε σχετίζεται με τη βιωσιμότητά τους στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής. Επίσης, τα προϊόντα, που συντηρήθηκαν στους 4-8°C για 20-24 ώρες πριν την κρυοκατάψυξη, δε παρουσίασαν διαφορές στα ποσοστά βιωσιμότητας σε σχέση με εκείνα, που κρυοκαταψύχθηκαν την ίδια ημέρα. Σύμφωνα και με άλλες μελέτες, η κρυοσυντήρηση στους 4°C για μικρό χρονικό διάστημα δε φαίνεται πως επηρεάζει τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων. Οι de Boer και συν. παρατήρησαν ελάχιστα και μη στατιστικά σημαντικά ποσοστά νέκρωσης και απόπτωσης σε φρέσκα προϊόντα που συντηρήθηκαν για 3 ημέρες στους 4°C (146). Οι Pettengell και συν. δε διαπίστωσαν καμία διαφοροποίηση στη λειτουργικότητα των AAK μετά από συντήρηση στους 4°C για έως και 5 ημέρες (169). Οι Ruiz-Arguelles και συν.

διαπίστωσαν πως τα κινητοποιημένα CD34+ κύτταρα, σε αντίθεση με τα μη κινητοποιημένα κύτταρα, επιβιώνουν της συντήρησης στους 4°C για τουλάχιστον 96 ώρες, με ελάχιστη μείωση της βιωσιμότητας (<10%) (170). Τα προϊόντα αφαίρεσης ιδανικά βέβαια πρέπει να καταψύχονται το συντομότερο δυνατό και η εν τω μεταξύ συντήρησή τους πρέπει να γίνεται υπό ανάδευση στους 4°C (171). Η ήπια ανάδευση κατά τη συντήρηση πριν τη κρυοκατάψυξη επιτρέπει την ομοιογένεια του κυτταρικού προϊόντος και την αποφυγή συσσώρευσης και συγκόλλησης των αιμοπεταλίων (172).

Η αυξημένη συγκέντρωση των CD45+ κυττάρων στον κρυοκατεψυγμένο ασκό επηρέασε στατιστικά σημαντικά αρνητικά τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη. Τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με συγκέντρωση CD45+ κυττάρων $\leq 132,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ είχαν βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από εκείνα με συγκέντρωση CD45+ κυττάρων $> 132,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ (51,6% έναντι 40%, $p=0,043$). Η συγκέντρωση των PMN στους κρυοκατεψυγμένους ασκούς επηρέασε στατιστικά σημαντικά μόνο την βιωσιμότητα των TNC· τα προϊόντα με $\text{PMN} > 24 \times 10^3/\mu\text{l}$ είχαν στατιστικά υψηλότερη βιωσιμότητα, όπως αυτή μετρήθηκε με TB (61% έναντι 50,2%, $p=0,001$). Αντίθετα, η αυξημένη συγκέντρωση των CD34+ κυττάρων στον κρυοκατεψυγμένο ασκό επηρέασε στατιστικά σημαντικά θετικά τόσο τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων όσο και το ποσοστό των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη. Τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με συγκέντρωση CD34+ κυττάρων $> 1354/\mu\text{l}$ είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων (58,2% έναντι 39,2%, $p=0,026$) και στατιστικά σημαντικά αυξημένο ποσοστό «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων (36% έναντι 26,4%, $p=0,046$). Φυσικά, η τελική συγκέντρωση των CD34+ στον ασκό σχετίζεται δυναμικά με το ποσοστό τους στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής. Παράλληλα, η αυξημένη συγκέντρωση των PLT στον κρυοκατεψυγμένο ασκό φαίνεται πως επιφέρει στατιστικά σημαντική μέτρια μείωση της βιωσιμότητας των TNC, των CD45+ κυττάρων και των CD34+ κυττάρων, όπως και του ποσοστού των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ και CD34+ κυττάρων. Τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με συγκέντρωση $\text{PLT} \leq 402/\mu\text{l}$ είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά βιωσιμότητας των TNC (58% έναντι 49,5% $p=0,038$), των CD45+ κυττάρων (67,6% έναντι 55,9%, $p=0,001$) και των CD34+ κυττάρων (60,7% έναντι 29,5%, $p=$

0,002). Τα ποσοστά απόπτωσης των CD34+ κυττάρων δεν επηρεάστηκαν από την συγκέντρωση των PLT σε αντίθεση με των CD45+ κυττάρων, τα οποία ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στα προϊόντα με $PLT \leq 402/\mu l$ (6,9% έναντι 15,4%, $p=0,029$). Τα ποσοστά των «πραγματικά» βιώσιμων CD45+ και CD34+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στα προϊόντα με $PLT \leq 402/\mu l$ (56% έναντι 38,5%, $p < 0,0005$ και 35,7% έναντι 26,4%, $p=0,010$ αντίστοιχα). Ο όγκος του περιεχομένου του κρυοκατεψυγμένου ασκού δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυτταρικών πληθυσμών.

Μελέτες αναφορικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων κατά τη κρυοσυντήρηση εστιάζουν κυρίως στη συγκέντρωση των κυτταρικών στοιχείων στον ασκό κρυοκατάψυξης (173-176). Σύμφωνα με μελέτες των Rowley και συν., Carpezudo και συν. και Alencar και συν. η υψηλή συγκέντρωση των εμπύρηνων κυττάρων στον ασκό κρυοκατάψυξης δεν έχει αρνητικό αντίκτυπο στη βιωσιμότητα ή τη λειτουργικότητα των AAK μετά την απόψυξη (173, 174, 176). Αντίθετα οι Martin-Henao και συν. παρατήρησαν μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας τόσο των TNC όσο και των CD34+ κυττάρων στα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με υψηλή κυτταρική συγκέντρωση, χωρίς όμως αντίστοιχη επίπτωση στην αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO. Θεωρούν πως η μικρή ανθεκτικότητα των ουδετερόφιλων κυττάρων στη κρυοσυντήρηση, δικαιολογεί υψηλότερα ποσοστά νέκρωσης σε προϊόντα με υψηλότερες συγκεντρώσεις ουδετερόφιλων (175). Οι Busilacchi και συν. παρατήρησαν επίσης μια αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης των WBC και των ουδετερόφιλων με τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων, την οποία αιτιολογούν με τη παραγωγή κυτοκινών ή την απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων και ελεύθερων ριζών από τα ουδετερόφιλα κύτταρα κατά τη κρυοκατάψυξη ή την απόψυξη (148). Στη μελέτη των Busilacchi και συν. δε παρατηρήθηκε καμία επίδραση της συγκέντρωσης των CD34+ κυττάρων στη βιωσιμότητα τους μετά την απόψυξη (148). Σύμφωνα με τους Rowley και συν. η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στον ασκό κρυοκατάψυξης δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων (148, 173). Ούτε ο αριθμός των ερυθροκυττάρων φαίνεται πως επηρεάζει τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων (173). Στη μελέτη μας «The effect of cryopreservation on the viability and apoptosis of hematopoietic stem cells: reappraisal by a single center experience»,

παρατηρήσαμε πως κυτταρικά προϊόντα που είχαν καταψυχθεί με συγκεντρώσεις WBC χαμηλότερες από $121 \times 10^3/\mu\text{l}$ είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης CD34+ κυττάρων (39%) συγκριτικά με εκείνα με υψηλότερες συγκεντρώσεις (32%, $p=0.047$) ενώ τα ποσοστά απόπτωσης των CD45+ κυττάρων δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Αντίθετα τα κρυοκατεψυγμένα προϊόντα με συγκέντρωση αιμοπεταλίων $>418 \times 10^3/\mu\text{l}$ (διάμεση τιμή) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αποπτωτικών CD45+ κυττάρων συγκριτικά με τα προϊόντα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων. Παρόμοια αλλά όχι στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού απόπτωσης είχε και ο πληθυσμός των CD34+ κυττάρων (158).

Τέλος, η διάρκεια της κρυοσυντήρησης έως τη στιγμή μέτρησης της βιωσιμότητας, η οποία στη παρούσα μελέτη κυμάνθηκε μεταξύ 242 και 912 ημερών (διάμεση τιμή 456 ημέρες) δεν είχε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα ή την απόπτωση των κυτταρικών πληθυσμών.

Οι παράγοντες που κατά την μονοπαραγοντική ανάλυση αποδείχθηκαν στατιστικά σημαντικοί για τη βιωσιμότητα και την «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη, μετά την ανάλυση και των μεταξύ τους συσχετίσεων, υποβλήθηκαν σε ιεραρχική πολυπαραγοντική ανάλυση. Οι παράγοντες αυτοί ήταν α) η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα προ συλλογής ($\leq 97,3\%$ ή $>97,3\%$), β) η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν της συλλογής ($\leq 98,7\%$ ή $>98,7\%$), γ) η τελική συγκέντρωση CD34+ κυττάρων στους ασκούς κρυοκατάψυξης ($\leq 1354/\mu\text{l}$ ή $>1354/\mu\text{l}$), και δ) η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων στους ασκούς κρυοκατάψυξης ($>402 \times 10^3/\mu\text{l}$ ή $>402 \times 10^3/\mu\text{l}$). Από την ανάλυση προέκυψε ότι: α) βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής $\leq 97,3\%$ β) βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο προϊόν συλλογής πριν την κατάψυξη $\leq 98,7\%$, και γ) τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης $>402 \times 10^3/\mu\text{l}$ σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα και «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο αποψυγμένο προϊόν, όπως μετρήθηκαν με FACS. Οι παράγοντες αυτοί λοιπόν, καθότι είναι ήδη γνωστοί κατά τη συλλογή και τη κρυοκατάψυξη, θεωρούμε πως μπορούν να αποτελέσουν «προγνωστικούς δείκτες βιωσιμότητας», με σκοπό τη χρήση τους ως κριτήριο ορισμού του στόχου συλλογής CD34+/Kg, απόφασης ελέγχου της

βιωσιμότητας πριν την AMMO και επιλογής της ιδανικής δόσης CD34+/Kg στην AMMO.

Επίδραση της βιωσιμότητας και της απόπτωσης στην έκβαση της AMMO

Επίδραση της βιωσιμότητας και της απόπτωσης στον τελικό αριθμό των AAK που εγχύθηκαν στην AMMO

Ο αριθμός των ζωντανών προγονικών κυττάρων που τελικά εγχύονται στους ασθενείς στην AMMO αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθορίζουν την επιτυχή ή αποτυχημένη αποκατάσταση της αιμοποίησης. Παρόλα αυτά, στα περισσότερα κέντρα αυτόλογης μεταμόσχευσης μυελού των οστών, η δόση των CD34+ κυττάρων/Kg βάρους σώματος, που «προγραμματίζεται» προς έγχυση, βασίζεται στον αριθμό τους, όπως αυτός καταμετρείται με κυτταρομετρία ροής στο φρέσκο προϊόν συλλογής, πριν τη κρυοκατάψυξη. Αδιαμφισβήτητα όμως, υπάρχει ένα ποσοστό νέκρωσης και απόπτωσης των κρυοκατεψυγμένων κυτταρικών προϊόντων, και είτε είναι μικρό είτε είναι μεγάλο, έχει ως αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση των «πραγματικών» δόσεων των βιώσιμων AAK, που χορηγούνται στην AMMO, σε σχέση με τις «προγραμματισμένες» δόσεις (76, 100, 117, 143, 146, 148). Στη παρούσα μελέτη, με βάση τη μέτρηση της βιωσιμότητας με χρώση Trypan Blue, με 7-ADD και τη μέτρηση της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων με 7-ADD και Annexin-V α) οι ασθενείς που θα λάμβαναν «προγραμματισμένη» δόση $<3 \times 10^6$ CD34+/Kg ($>2 \times 10^6$ CD34+/Kg), έλαβαν τελικά δόση «βιώσιμων» κυττάρων $1,1 \times 10^6$ CD34+/Kg, $1,2 \times 10^6$ CD34+/Kg και $0,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεσες τιμές), αντίστοιχα, β) οι ασθενείς που θα λάμβαναν $3-6 \times 10^6$ CD34+/Kg, έλαβαν τελικά $2,5 \times 10^6$ CD34+/Kg, $1,8 \times 10^6$ CD34+/Kg και $1,1 \times 10^6$ CD34+/Kg, αντίστοιχα, και γ) οι ασθενείς που θα λάμβαναν $>6 \times 10^6$ CD34+/Kg, έλαβαν τελικά $4,4 \times 10^6$ CD34+/Kg, 4×10^6 CD34+/Kg και $3,1 \times 10^6$ CD34+/Kg, αντίστοιχα. Αντίστοιχη σημαντική μείωση του τελικού αριθμού των αποψυγμένων βιώσιμων ή των βιώσιμων και μη αποπτωτικών CD34+/Kg που τελικά εγχύονται διαπίστωσαν αρκετοί ερευνητές (81, 117, 145, 146, 155).

Επίδραση της βιωσιμότητας και της απόπτωσης στη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση της αιμοποίησης

Διερευνήθηκε η κλινική σημασία της απόκλισης του βιώσιμου αριθμού των CD34+/Kg που χορηγείται στον ασθενή από την «προγραμματισμένη» δόση. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση του «προγραμματισμένου» αριθμού των AAK, που εγχύθηκαν, και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων. Εντούτοις, οι διαφορές στις διάμεσες τιμές «προγραμματισμένης» δόσης των AAK μεταξύ των ομάδων ασθενών, που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, μεταξύ D13 και D16 και μεταξύ D17 και D30, δηλαδή $6,7 \times 10^6/\text{Kg}$, $6,5 \times 10^6/\text{Kg}$, και $5,8 \times 10^6/\text{Kg}$, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές: ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε «προγραμματισμένη» δόση $3,6 \times 10^6/\text{Kg}$. Ενώ οι διαφορές στη βιωσιμότητα των φρέσκων προϊόντων, μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, οι διαφορές στη βιωσιμότητα των αποψυγμένων προϊόντων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν και με τις τρεις μεθόδους, δηλαδή με τη μέτρηση της βιωσιμότητας με χρώση με Trypan blue, και της βιωσιμότητας και της «πραγματικής» βιωσιμότητας με κυτταρομετρία ροής, ήταν στατιστικά σημαντικές. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς, που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ α) έως την D12, είχαν διάμεση βιωσιμότητα ίση με 58%, 51,6% και 35,2%, όπως μετρήθηκαν με κάθε μια από τις μεθόδους, αντίστοιχα, β) μεταξύ D13 και D16, είχαν διάμεση βιωσιμότητα ίση με 47%, 14,5% και 14%, αντίστοιχα και γ) μεταξύ D17 και D30, είχαν διάμεση βιωσιμότητα ίση με 20,8%, 6,1% και 3,7%, αντίστοιχα. Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων είχε βιωσιμότητα ίση με 10%, 5% και 0,7%, αντίστοιχα για κάθε μέθοδο. Οι διαφορές στα ποσοστά των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, παρότι η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μικρή αρνητική συσχέτιση του ποσοστού απόπτωσης των CD34+ κυττάρων και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων. Η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και οι διαφορές στον αριθμό των βιώσιμων CD34+/Kg, όπως μετρήθηκαν με TB και FACS, και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg που

χορηγήθηκαν στους ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, μεταξύ D13 και D16 και μεταξύ D17 και D30 ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,007$, $p<0,0005$ και $p<0,0005$, για κάθε μέθοδο εκτίμησης της βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ α) έως την D12, έλαβαν αριθμό βιώσιμων CD34+ κυττάρων $3,7 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, μέτρηση με TB) ή αριθμό βιώσιμων CD34+ κυττάρων $3,2 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, μέτρηση με 7-ADD) ή αριθμό «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων $2,1 \times 10^6$ CD34+/Kg (διάμεση τιμή), β) μεταξύ D13 και D16, έλαβαν $2,8 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $0,9 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $0,9 \times 10^6$ CD34+/Kg, αντίστοιχα, και γ) μεταξύ D17 και D30, έλαβαν $1,1 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $0,4 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $0,3 \times 10^6$ CD34+/Kg, αντίστοιχα. Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε $0,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $0,2 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $0,03 \times 10^6/\text{Kg}$, αντίστοιχα. Ανάλογες μελέτες έχουν καταλήξει στο ίδιο συμπέρασμα, πως ο αριθμός των βιώσιμων CD34+/Kg σχετίζεται σημαντικά με την ημέρα αποκατάστασης των ουδετερόφιλων (81, 96, 107, 108, 177). Οι Lee και συν. διαπίστωσαν πως οι ασθενείς οι οποίοι είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $>500/\mu\text{l}$ μετά την D11 είχαν λάβει στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο διάμεσο αριθμό βιώσιμων CD34+/Kg ($1,4 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $0,04-4,0 \times 10^6$) συγκριτικά με εκείνους που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $>500/\mu\text{l}$ έως και την D11 ($3 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $1,2-15 \times 10^6$) (81). Ομοίως οι Allan και συν. διαπίστωσαν πως οι ασθενείς οι οποίοι είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $>500/\mu\text{l}$ μετά την D13 είχαν λάβει στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο διάμεσο αριθμό βιώσιμων CD34+/Kg ($1,8 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $0,7-3,2 \times 10^6$) συγκριτικά με εκείνους που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $>500/\mu\text{l}$ έως και την D13 ($2,5 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $0,8-11 \times 10^6$). Ταυτόχρονα όμως η χορήγηση βιώσιμων CD34+ κυττάρων σε δόσεις $>2 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $2-5 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $>5 \times 10^6/\text{Kg}$ δεν κατέληγε σε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της ημέρας αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων (D13 με εύρος 10–22, D14 με εύρος 10–19 και D12 με εύρος 9–13, αντίστοιχα) (allan2002 number of cd34 for auto pbsc). Άλλες μελέτες βέβαια δε διαπίστωσαν καμία συσχέτιση του αριθμού των βιώσιμων CD34+/Kg με την αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων (151, 178). Η αρνητική συσχέτιση του ποσοστού απόπτωσης των CD34+ κυττάρων και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων, που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη, έχει

αναφερθεί και στη μελέτη των Wu και συν., τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν πως η επανέγχυση κυτταρικών προϊόντων με αυξημένο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων σχετίζεται με καθυστέρηση της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων. Θεωρούν πως τα αποπτωτικά μονοπύρρηνα κύτταρα πιθανόν να χάνουν τη συμπληρωματική δράση τους ως «βοηθητικά» στην εγκατάσταση του μοσχεύματος κύτταρα ή ότι τα αποπτωτικά κύτταρα πιθανόν να απελευθερώνουν παράγοντες, που αναχαιτίζουν τη μεταναστευτική δυνατότητα των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων προς το μυελό των οστών (149). Άλλωστε τα αποπτωτικά κύτταρα φαγοκυτταρώνονται γρήγορα και ο ρόλος τους είτε στη βραχυπρόθεσμη είτε στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση εξαλείφεται (147).

Σε αντίθεση με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, οι διαφορές στην «προγραμματισμένη» δόση των AAK μεταξύ των ομάδων ασθενών, που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20/\mu\text{l}$ έως την D14, μεταξύ D15 και D20 και μεταξύ D21 και D30, ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,016$), και η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά σημαντική μέτρια αρνητική συσχέτιση του αριθμού των AAK που εγχύθηκαν και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων. Η διάμεση τιμή της «προγραμματισμένης» δόσης των CD34+ κυττάρων/Kg, που έλαβαν οι ασθενείς, οι οποίοι είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20/\mu\text{l}$ έως την D14, μεταξύ D15 και D20 και μεταξύ D21 και D30 ήταν $7,3 \times 10^6/\text{Kg}$, $6,3 \times 10^6/\text{Kg}$ και $4,1 \times 10^6/\text{Kg}$, αντίστοιχα· ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε $3,6 \times 10^6/\text{Kg}$. Οι διαφορές στη βιωσιμότητα των φρέσκων προϊόντων και των αποψυγμένων προϊόντων όπως προσδιορίστηκαν με τη χρώση με Trypan blue, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, ενώ αντίθετα οι διαφορές στη βιωσιμότητα των αποψυγμένων προϊόντων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέτρηση της βιωσιμότητας και της «πραγματικής» βιωσιμότητας με κυτταρομετρία ροής, ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,001$ και $p<0,0005$, αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς, που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20/\mu\text{l}$ α) έως την D14, είχαν διάμεση βιωσιμότητα με TB ίση με 56,6%, βιωσιμότητα με FACS 62,6% και «πραγματική» βιωσιμότητα 48%, β) μεταξύ D15 και D20, είχαν 55,5%, 36,6% και 22,8%, αντίστοιχα και γ) μεταξύ D21 και D30, είχαν 51%, 7,2% και 5%, αντίστοιχα. Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των αιμοπεταλίων είχε βιωσιμότητα ίση με 10%, 5% και 0,7%, αντίστοιχα για κάθε μέθοδο. Οι διαφορές

στα ποσοστά των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές και, σε αντίθεση με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, η μη παραμετρική ανάλυση έδειξε μια στατιστικά μη σημαντική συσχέτιση του ποσοστού απόπτωσης των CD34+ κυττάρων και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων. Έδειξε, όμως, μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων και οι διαφορές στον αριθμό των βιώσιμων CD34+/Kg, όπως μετρήθηκαν με TB και FACS, και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg που χορηγήθηκαν στους ασθενείς που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20/\mu\text{l}$ έως την D14, μεταξύ D15 και D20 και μεταξύ D21 και D30 ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,001$, $p<0,0005$ και $p<0,0005$, για κάθε μέθοδο εκτίμησης της βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20/\mu\text{l}$ α) έως την D14, έλαβαν $3,8 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή, μέτρηση με TB) ή $3,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (μέτρηση με 7-ADD) ή $3,1 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων CD34+/Kg (μέτρηση με 7-ADD και Annexin-V), β) μεταξύ D15 και D20, έλαβαν 3×10^6 CD34+/Kg ή $1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $1,2 \times 10^6$ CD34+/Kg, αντίστοιχα και γ) μεταξύ D17 και D30, έλαβαν $1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $0,3 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $0,2 \times 10^6$ CD34+/Kg, αντίστοιχα. Ο ασθενής στον οποίο δεν αποκαταστάθηκε ποτέ ο αριθμός των ουδετερόφιλων έλαβε $0,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $0,2 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $0,03 \times 10^6/\text{Kg}$, αντίστοιχα. Ανάλογες μελέτες έχουν καταλήξει στο ίδιο συμπέρασμα, πως ο αριθμός των βιώσιμων CD34+/Kg σχετίζεται σημαντικά με την ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων (81, 96, 108, 177). Οι Lee και συν. διαπίστωσαν πως οι ασθενείς οι οποίοι είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>20/\mu\text{l}$ μετά την D15 είχαν λάβει στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο διάμεσο αριθμό βιώσιμων CD34+/Kg ($1,7 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $0,04-5,5 \times 10^6/\text{Kg}$) συγκριτικά με εκείνους που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>500/\mu\text{l}$ έως και την D15 ($2,7 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $0,6-15 \times 10^6$) (81). Ομοίως οι Allan και συν διαπίστωσαν πως οι ασθενείς οι οποίοι είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>20/\mu\text{l}$ μετά την D14 είχαν λάβει στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο διάμεσο αριθμό βιώσιμων CD34+/Kg ($1,7 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $0,7-2,7 \times 10^6$) συγκριτικά με εκείνους που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $>20/\mu\text{l}$ έως και την D14 ($3 \times 10^6/\text{kg}$, εύρος $0,8-11 \times 10^6$). Ταυτόχρονα η χορήγηση βιώσιμων CD34+ κυττάρων σε δόσεις $>2 \times 10^6/\text{Kg}$ (I) ή $2-5 \times 10^6/\text{Kg}$ (II) ή $>5 \times 10^6/\text{Kg}$ (III) κατέληγε σε στατιστικά σημαντική

διαφοροποίηση της ημέρας αποκατάστασης του αριθμού των ουδετερόφιλων (D17, εύρος 12–42, D12, εύρος 11– 16 και D10, εύρος 9–14, αντίστοιχα) μεταξύ των ομάδων I και II και II και III (100). Αντίθετα με την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων, οι Rozario και συν. διαπίστωσαν πως όταν εγχύεται μικρός αριθμός βιώσιμων CD34+/Kg προβλέπεται καθυστερημένη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων (178). Άλλες μελέτες βέβαια δε διαπίστωσαν καμία συσχέτιση του αριθμού των βιώσιμων CD34+/Kg με την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων (151).

Όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων η «προγραμματισμένη» δόση των CD34+/Kg δεν είχε καμία στατιστική σημασία. Ο αριθμός των βιώσιμων (μέτρηση με FACS) ή των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg, που εγχύθηκε, μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D30, ήταν στατιστικά σημαντικός ($p=0,049$ και $p=0,025$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D30, έλαβαν 3×10^6 βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή) ή 2×10^6 «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg σε αντίθεση με τους ασθενείς, που δεν είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D30 και έλαβαν $1,5 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg ή $1,3 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg. Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών το ποσοστό «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων διέφερε στατιστικά σημαντικά (34,4% έναντι 23%, αντίστοιχα, $p=0,028$). Η δόση όπως ορίστηκε μετά τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας με TB δεν είχε στατιστική σημασία. Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D60, μόνο ο αριθμός των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, ήταν οριακά στατιστικά σημαντικός ($p=0,053$). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό των ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D60, έλαβαν $1,9 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg, ενώ εκείνοι που δεν είχαν, έλαβαν $0,03 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg. Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών το ποσοστό «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων διέφερε στατιστικά σημαντικά (32,9% έναντι 0,7%, αντίστοιχα, $p=0,015$). Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D90, ο αριθμός των βιώσιμων, όπως μετρήθηκε τόσο με TB όσο και με κυτταρομετρία

ροής, και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg, που εγχύθηκε, ήταν στατιστικά σημαντικός ($p=0,004$, $p=0,002$ και $p=0,004$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό των ουδετερόφιλων $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως την D90, έλαβαν $3,3 \times 10^6$ CD34+/Kg, μετρημένων με TB ή $2,8 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg, μετρημένων με FACS ή $1,9 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg σε αντίθεση με τους ασθενείς που δεν είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $> 1500/\mu\text{l}$ έως την D90 και έλαβαν $0,7 \times 10^6$ CD34+/Kg ή $0,1 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg ή $0,03 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg. Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών τα ποσοστά βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων, όπως μετρήθηκαν με τις τρεις μεθόδους, διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των ουδετερόφιλων τους $\geq 2000/\mu\text{l}$ έως την D180, μόνο ο αριθμός των βιώσιμων (TB) CD34+/Kg που εγχύθηκε, ήταν στατιστικά σημαντικός ($p=0,046$), ενώ ο αριθμός των CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση) ήταν οριακά στατιστικά σημαντικός ($p=0,054$). Πιθανότερα ο αριθμός των CD34+/Kg γενικότερα να μην περιλαμβάνεται στους παράγοντες εκείνους που έχουν σημασία για την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων μετά τη D90.

Όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων, επίσης η «προγραμματισμένη» δόση των CD34+/Kg δεν είχε καμία στατιστική σημασία. Μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D30, οι διαφορές στον αριθμό των βιώσιμων (μέτρηση με FACS) και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων ανά Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0,015$ και $p=0,006$, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D30, έλαβαν 3×10^6 βιώσιμων CD34+/Kg (διάμεση τιμή) ή $1,9 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg σε αντίθεση με τους ασθενείς, που δεν είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D30 και έλαβαν $1,2 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg ή $0,6 \times 10^6$ «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg. Μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών τα ποσοστά βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων, όπως αυτές μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής, διέφερε στατιστικά σημαντικά (48,9% έναντι 19,9% βιωσιμότητα, $p=0,047$ και 33,6% έναντι 11,2% «πραγματική» βιωσιμότητα, $p=0,019$). Η δόση όπως ορίστηκε μετά τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας με TB δεν είχε στατιστική σημασία. Μεταξύ των

ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ έως την D60, ο αριθμός των CD34+/Kg, που εγχύθηκε, δεν ήταν στατιστικά σημαντικός. Ομοίως μεταξύ των ασθενών που αποκατέστησαν ή δεν αποκατέστησαν τον αριθμό των αιμοπεταλίων τους $\geq 140/\mu\text{l}$ έως την D90 ή και την D180. Πιθανόν ο αριθμός των CD34+/Kg γενικότερα να μην περιλαμβάνεται στους παράγοντες εκείνους που έχουν σημασία για την αποκατάσταση των αιμοπεταλίων μετά τη D30.

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του αριθμού των CD34+/Kg, που εγχύθηκαν, ως «προγραμματισμένη» δόση και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων, η οποία ήταν ισχυρότερη όσο αφορά στην αποκατάσταση των αιμοπεταλίων και μικρή όσο αφορά στην αποκατάσταση των ουδετερόφιλων. Συνεπακόλουθα, οι διαφορές στη «προγραμματισμένη» δόση των AAK μεταξύ των ομάδων ασθενών, που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, μεταξύ D13 και D16 και μεταξύ D17 και D30, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, σε αντίθεση με τις διαφορές στην «προγραμματισμένη» δόση των AAK μεταξύ των ομάδων ασθενών, που είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20/\mu\text{l}$ έως την D14, μεταξύ D15 και D20 και μεταξύ D21 και D30, που ήταν στατιστικά σημαντικές. Η «προγραμματισμένη» δόση των CD34+/Kg δεν είχε καμία στατιστική σημασία όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση. Παρατηρήθηκε, αντίθετα, μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του βιώσιμου αριθμού των AAK που εγχύθηκαν με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων και οι διαφορές στον αριθμό των βιώσιμων CD34+/Kg, όπως μετρήθηκαν με TB και FACS, και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg που χορηγήθηκαν στους ασθενείς που είχαν αριθμό ουδετερόφιλων $\geq 500/\mu\text{l}$ έως την D12, μεταξύ D13 και D16 και μεταξύ D17 και D30 αλλά και αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 20/\mu\text{l}$ έως την D14, μεταξύ D15 και D20 και μεταξύ D21 και D30 ήταν στατιστικά σημαντικές. Όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση, ο αριθμός των βιώσιμων και των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg βάρους σώματος, που εγχύθηκε, είχε στατιστική σημασία όσο αφορά στην αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων έως την D90, ενώ όσο αφορά τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων είχε στατιστική σημασία έως τη D30. Διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση του ποσοστού απόπτωσης

των CD34+ κυττάρων και της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων, και άρα η επανέγχυση κυτταρικών προϊόντων με αυξημένο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων σχετίζεται με καθυστέρηση της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων. Αντίθετα, η απόπτωση των CD34+ κυττάρων δε σχετίζεται με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων.

Αρκετοί ερευνητές προτείνουν πως ο προσδιορισμός του βιώσιμου αριθμού των CD34+/Kg προς έγχυση πρέπει να πραγματοποιείται προ της μεταθεραπείας, δεδομένης της μείωσης της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την κρυοσυντήρηση, προκειμένου να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανεπαρκούς αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά τη AMMO, ιδιαίτερα όσο αφορά την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων (81, 108, 177). Οι Yang και συν. προτείνουν δε πως ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας θα πρέπει να πραγματοποιείται αμέσως μετά την κρυοκατάψυξη προκειμένου να διασφαλίζεται το νωρίτερο δυνατό η συλλογή επαρκούς δόσης CD34+/Kg (177). Φυσικά, πιο ακριβής και αξιόπιστος είναι ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας ακριβώς πριν την έγχυση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μακράς κρυοσυντήρησης, όμως τότε πλέον ο ασθενής έχει λάβει μεταθεραπεία και ο έλεγχος της βιωσιμότητας δεν έχει πρακτική σημασία παρά μόνο στατιστική (81). Σε μια ιταλική έρευνα το 43% των κέντρων μεταμόσχευσης μυελού των οστών που συμμετείχαν, απήντησαν πως η αποδέσμευση ενός κυτταρικού προϊόντος προς έγχυση συνοδεύεται συστηματικά με προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων στο συνοδό φιαλίδιο με κυτταρομετρία ροής (7-AAD). Παρόλα αυτά, σε κανένα από τα παραπάνω κέντρα, η κλινική απόφαση να εγχυθούν κρυοκατεψυγμένα κύτταρα δεν επηρεάζεται από το ποσοστό βιωσιμότητας (Lanza 2020 Manipulation, and cryopreservation). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει άλλωστε τυποποιημένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των AAK αποψυγμένου προϊόντος, ενώ από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, αποδεικνύεται πως ούτε η κλινική σημασία του προσδιορισμού της βιωσιμότητας έχει εξακριβωθεί πλήρως (148, 155, 171). Επίσης, όπως φαίνεται και από τη παρούσα μελέτη, η δόση των βιώσιμων CD34+/Kg που εγχύεται και ο χρόνος μέχρι την αιματολογική αποκατάσταση δε σχετίζονται πάντοτε, ούτε μια υψηλή δόση βιώσιμων CD34+/Kg εξασφαλίζει πάντα μια ταχεία αποκατάσταση ή μια χαμηλή δόση CD34+/Kg προδιαγράφει πάντα μια αργή ή ανεπαρκή αποκατάσταση (148).

Άλλωστε λίγα είναι γνωστά για τη συσχέτιση μεταξύ βιώσιμου αριθμού CD34+ κυττάρων και τη κλωνογενικότητά τους αφού ταυτόχρονα, τα προγονικά κύτταρα που ευθύνονται για τη μακρά και σταθερή αιματολογική αποκατάσταση αποτελούν τη μειοψηφία μεταξύ των CD34+ κυττάρων που εγχύονται (117, 171). Έχει επικρατήσει η άποψη πως η συστηματική εκτίμηση της βιωσιμότητας των CD34+/Kg προκειμένου να συμπεριληφθεί στην απόφαση για την αποδέσμευση ενός κρυοκατεψυγμένου προϊόντος προς έγχυση δεν είναι απαραίτητη αν ο αριθμός των CD34+/Kg στο φρέσκο προϊόν είναι τουλάχιστον 2×10^6 /Kg. Είναι βέβαιο όμως πως τουλάχιστον στις περιπτώσεις με οριακά χαμηλές δόσεις η εκτίμηση της βιωσιμότητας μπορεί να είναι πολύ σημαντική (107, 108, 171).

Ο προσδιορισμός των προγονικών κυττάρων της μυελώδους σειράς μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού των granulocyte-macrophage colony forming unit (CFU-GM) αποτελεί την πρότυπη μέθοδο εκτίμησης της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των AAK αφού έχει αποδειχθεί ότι έχει την πιο ισχυρή συσχέτιση με την αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO (63, 82, 120, 121, 140). Δυστυχώς, η εφαρμογή της μεθόδου στην καθ' ημέρα κλινική και εργαστηριακή πράξη είναι δύσκολη και το σημαντικότερο, δε μπορεί να παρέχει ταχεία αποτελέσματα αφού απαιτεί 10-14 ημέρες έως την ανάγνωση του αποτελέσματος (63, 108, 120, 140). Εξάλλου, φαίνεται πως δεν έχει επαναληψιμότητα καθώς εξαρτάται πολύ από την τεχνική και την εμπειρία του εργαστηριακού, ενώ τα αποτελέσματα διαφέρουν από κέντρο σε κέντρο (121). Ταυτόχρονα η εφαρμογή της σε αποψυγμένα κύτταρα αμφισβητείται καθώς η παρουσία του DMSO απαιτεί επιπλέον τροποποιήσεις στη μέθοδο, που πιθανόν να διαφοροποιούν το πραγματικό αποτέλεσμα (108). Η αντικατάσταση της με την καταμέτρηση του αριθμού των CD34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής είναι τα τελευταία χρόνια σχεδόν ολοκληρωτική καθώς η συσχέτιση του με τα CFU-GM έχει αποδειχθεί ισχυρή και έχει πλέον αποδειχθεί ικανοποιητικός δείκτης των AAK προς έγχυση (120). Σημειώνουμε ότι δεν έχει αποδειχθεί απευθείας συσχέτιση του αριθμού των CD34+ κυττάρων με τα CFU-GM, αλλά ο πληθυσμός των CD34+ κυττάρων είναι πάντοτε 5 με 10 φορές μεγαλύτερος από τα CFU-GM (121).

Μελέτες εξάλλου έχουν δείξει πως όσο αφορά στην πρόγνωση της αιματολογικής αποκατάστασης μετά την AMMO, η μέθοδος CFU δεν υπερισχύει του

προσδιορισμού των βιώσιμων CD34+ κυττάρων (106)(jansen 2007 engraftment prediction).

Μελέτες δείχνουν πως ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων που εγχύεται πιθανόν να ευθύνεται για την καθυστερημένη εγκατάσταση του μοσχεύματος ή να αποτελεί δείκτη μειωμένης δυνατότητας εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού των AAK μετά την AMMO (40, 146, 149). Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο προσδιορισμός επομένως των «πραγματικά» βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων πιθανόν να αποτελεί τον καλύτερο προγνωστικό δείκτη για ταχεία και ολοκληρωμένη αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO.

Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO

Ιδανικά, ο αριθμός των ουδετερόφιλων κυττάρων αποκαθίσταται $\geq 500/\mu\text{l}$ μέχρι τη D12 μετά την ημέρα έγχυσης του αυτόλογου μοσχεύματος (D0) και $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως τη D30. Ταυτόχρονα, ο αριθμός των αιμοπεταλίων αποκαθίσταται $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι τη D14 και $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ το αργότερο έως τη D90, ενώ έως τη D30 είναι τουλάχιστον $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ και έως τη D60 είναι τουλάχιστον $100 \times 10^3/\mu\text{l}$. Μεταξύ των 61 ασθενών που μελετήθηκαν, οι 36 ασθενείς (59%) είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων ενώ οι 45 (73,8%) είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση. Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, τόσο βραχυπρόθεσμη όσο και μακροπρόθεσμη, είχαν οι 32 ασθενείς (52,5%).

Εξετάστηκαν παράγοντες που αφορούν σε χαρακτηριστικά των ασθενών και σε χαρακτηριστικά του μοσχεύματος, που πιθανόν έχουν επίδραση στην ιδανική αιματολογική αποκατάσταση. Τα ποσοστά ασθενών διαφορετικού φύλου που πέτυχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των νεότερων ασθενών (≤ 58 ετών) πέτυχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση και ιδανική αιματολογική αποκατάσταση συνολικά έναντι των ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας (71,8% έναντι 36,4%, $p=0,014$ και 64,1% έναντι 31,8%, $p=0,019$, αντίστοιχα)· στατιστικά σημαντική διαφορά όσο αφορά στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των νεότερων και των μεγαλύτερων των 49 ετών. Μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με LH πέτυχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι των ασθενών με BNHL (78,9% έναντι 40,9%,

$p=0,046$)· το ποσοστό των ασθενών με MM (60%) δε διέφερε σημαντικά έναντι των ασθενών με LH ή BNL. Μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με LH πέτυχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση συνολικά έναντι των ασθενών με BNHL ή MM (78,9% έναντι 31,8% ή 50%, $p=0,011$). Τα ποσοστά των ασθενών που ήταν ή δεν ήταν σε ύφεση πριν την AMMO και είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Το μεγαθεραπευτικό σχήμα δεν είχε στατιστική σημασία για την ιδανική αιματολογική αποκατάσταση. Μεταξύ των πτωχών, των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων με ιδανική και μη ιδανική αποκατάσταση, είτε βραχυπρόθεσμη είτε μακροπρόθεσμη. Το 75,9% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 25% των πτωχών κινητοποιητών ($p=0,019$)· οι διαφορές μεταξύ των καλών και των πτωχών κινητοποιητών και μεταξύ των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν ήταν σημαντικές. Το 93,1% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 58,3% των καλών κινητοποιητών και του 50% των πτωχών κινητοποιητών ($p=0,002$)· η διαφορά μεταξύ των καλών και των πτωχών κινητοποιητών δεν ήταν σημαντική. Το 72,4% των πολύ καλών κινητοποιητών είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση συνολικά έναντι του 41,7% των καλών κινητοποιητών και του 12,5% των πτωχών κινητοποιητών ($p=0,004$)· οι διαφορές μεταξύ των καλών και των πτωχών κινητοποιητών και μεταξύ των καλών και των πολύ καλών κινητοποιητών δεν ήταν σημαντικές. Μεταξύ των ασθενών που είχαν $>98,5\%$ ή $\leq 98,5\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής τους παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων που είχαν ή όχι ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, τόσο βραχυπρόθεσμη όσο και μακροπρόθεσμη (76,5% έναντι 37%, $p=0,004$ και 94,1% έναντι 48,1%, $p<0,0005$, αντίστοιχα)· το 73,5% έναντι του 25,9% είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση συνολικά ($p<0,0005$). Μεταξύ των ασθενών που είχαν $>98,7\%$ ή $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο προϊόν της συλλογής παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων που είχαν ή όχι ιδανική βραχυπρόθεσμη και συνολικά ιδανική αιματολογική αποκατάσταση (73,3% έναντι 45,2%, $p=0,037$ και 70% έναντι 35,5%, $p=0,010$, αντίστοιχα. Μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών που τους εγχύθηκε όγκος αποψυγμένου κυτταρικού προϊόντος $\leq 360\text{ml}$ είχαν ιδανική

αποκατάσταση, βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη, έναντι των ασθενών που τους εγχύθηκαν >360ml (72,2% έναντι 40%, $p=0,017$ και 88,9 έναντι 52%, $p=0,002$, αντίστοιχα)· το 66,7% των πρώτων έναντι του 32% των δεύτερων είχε ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,010$). Ο συνολικός αριθμός των ασκών που αποψύχθηκε προς έγχυση δεν είχε καμία στατιστική σημασία για την ιδανική βραχυπρόθεσμη και τη συνολική αιματολογική αποκατάσταση, είχε όμως για τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση αφού το 82,2% των ασθενών που έλαβαν ≤ 3 ασκούς πέτυχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση έναντι του 50% εκείνων που έλαβαν >3 ασκούς, $p=0,020$. Μεταξύ των ασθενών, των οποίων οι ασκοί είχαν συγκέντρωση PLT $\leq 506 \times 10^3/\mu\text{l}$ ή $>506 \times 10^3/\mu\text{l}$ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εκείνων που είχαν ή όχι ιδανική βραχυπρόθεσμη και συνολικά ιδανική αιματολογική αποκατάσταση (66% έναντι 31,7%, $p=0,044$ και 59,6% έναντι 28,6%, $p=0,041$, αντίστοιχα)· οριακά μη σημαντική ήταν η διαφορά του 92,9% των ασθενών με PLT $\leq 506 \times 10^3/\mu\text{l}$ και του 68,1% με $>506 \times 10^3/\mu\text{l}$ που είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,059$). Μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των ασθενών που έλαβαν $>2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό έναντι όσων έλαβαν $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ είχε ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση (78,1% έναντι του 37,9%, $p=0,020$), ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση (90,6% έναντι 55,2%, $p=0,020$), και ιδανική αιματολογική αποκατάσταση (75% έναντι 27,6%, $p=0,020$).

Τα ποσοστά των ασθενών που έλαβαν διαφορετική «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg και είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Το 50% των ασθενών που έλαβαν $<3 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$, το 43,5% των ασθενών που έλαβαν $3-6 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$ και το 69,4% των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$ είχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,078$). Το 100% των ασθενών που έλαβαν $<3 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$, το 60,9% των ασθενών που έλαβαν $3-6 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$ και το 80,6% των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$ είχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ($p=0,188$). Το 50% των ασθενών που έλαβαν $<3 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$, το 34,8% των ασθενών που έλαβαν $3-6 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$ και το 63,9% των ασθενών που έλαβαν $>6 \times 10^6 \text{CD}34+/\text{Kg}$ είχαν ιδανική αιματολογική αποκατάσταση ($p=0,059$).

Συμπερασματικά, ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων είχαν οι ασθενείς με ηλικία ≤ 58 ετών, οι ασθενείς που έπασχαν από

LH και MM, οι καλοί και πολύ καλοί κινητοποιητές, οι ασθενείς με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής >98,5%, οι ασθενείς με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν της συλλογής >98,7%, οι ασθενείς των οποίων το συνολικό αποψυγμένο κυτταρικό προϊόν είχε όγκο ≤360ml ενώ η τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό ήταν ≤506×10³/μl και ο αριθμός CD34+ κυττάρων ανά ασκό ήταν >2,4×10⁶/Kg. Ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων είχαν οι ασθενείς με ηλικία ≤49 ετών, οι πολύ καλοί κινητοποιητές, οι ασθενείς με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής >98,5%, οι ασθενείς στους οποίους εγχύθηκαν ≤3 ασκοί με συνολικό όγκο ≤360ml και ο αριθμός CD34+ κυττάρων ανά ασκό ήταν >2,4×10⁶/Kg. Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση συνολικά είχαν οι νεότεροι ασθενείς, οι ασθενείς που έπασχαν από LH, οι πολύ καλοί κινητοποιητές, οι ασθενείς με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής >98,5%, οι ασθενείς με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν της συλλογής >98,7%, οι ασθενείς με συνολικό όγκο αποψυγμένου κυτταρικού προϊόντος ≤360ml, τελική συγκέντρωση PLT στον ασκό ≤506×10³/μl και αριθμό CD34+ κυττάρων ανά ασκό >2,4×10⁶/Kg. Φυσικά οι παράμετροι που αφορούν στη πτωχή, καλή ή πολύ καλή κινητοποίηση, στη συγκέντρωση CD34+/Kg ανά ασκό, στο συνολικό όγκο του προϊόντος που εγχύθηκε, στο συνολικό αριθμό των ασκών που αποψύχθηκαν προς έγχυση σχετίζονται μεταξύ τους και υφίστανται σχεδόν πάντοτε ταυτόχρονα. Η «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg που εγχύθηκε στους ασθενείς δεν είχε καμία στατιστικά σημαντική σημασία στην ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, είτε τη βραχυπρόθεσμη είτε τη μακροπρόθεσμη.

Η επίδραση των παραπάνω στατιστικά σημαντικών παραμέτρων στην πιθανότητα των ασθενών να έχουν ιδανική αποκατάσταση της αιμοποίησης ελέγχθηκε με διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση. Οι παράμετροι αυτές ήταν α) η ηλικία των ασθενών (≤58 ετών ή >58 ετών), β) η βιωσιμότητα των CD34+ του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής (≤98,5% ή >98,5%), γ) η βιωσιμότητα των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής (≤98,7% ή >98,7%), δ) ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση (≤2,4×10⁶/Kg ή >2,4×10⁶/Kg), ε) η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης (≤506×10³/μl ή >506×10³/μl). Προστέθηκαν επίσης, η «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg προς έγχυση

(μέτρηση στο φρέσκο προϊόν: $\leq 6 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $> 6 \times 10^6/\text{Kg}$) και ο βιώσιμος αριθμός (μέτρηση με FACS ή TB) ή ο «πραγματικά» βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg που εγχύθηκε. Πραγματοποιήθηκαν τρεις αναλύσεις, μια για τη βραχυπρόθεσμη, μια για τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση και μια για τη συνολική αιμοποιητική αποκατάσταση μετά την AMMO, ενώ σε κάθε μια από αυτές ελέγχθηκε η επίδραση είτε του βιώσιμου αριθμού CD34+ κυττάρων, όπως μετρήθηκε με TB, είτε του βιώσιμου αριθμού CD34+ κυττάρων, όπως μετρήθηκε με FACS, είτε του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των CD34+. Η εισαγωγή των παραμέτρων έγινε ιεραρχικά με βάση την πληροφορία, που είναι γνωστή σε κάθε φάση από τη συλλογή των AAK έως την AMMO, δηλαδή πρώτα εισήχθησαν η ηλικία και η βιωσιμότητα των CD34+ του περιφερικού αίματος (γνωστά κατά τη συλλογή), έπειτα εισήχθησαν η βιωσιμότητα των CD34+ στο φρέσκο προϊόν συλλογής, ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό προς έγχυση, η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης, η προγραμματισμένη δόση CD34+/Kg προς έγχυση (γνωστά κατά τη συλλογή και την κρυοκατάψυξη) και τελικά εισήχθηκε ο βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων προς έγχυση (γνωστός μετά από μέτρηση της βιωσιμότητας).

Όσο αφορά στην ιδανική βραχυπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση το μοντέλο που περιελάμβανε το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB, ήταν στατιστικά σημαντικό και προέβλεψε ορθώς το 80,3% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές δε, καμία μεταβλητή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το μοντέλο που περιελάμβανε το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS, ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό και προέβλεψε ορθώς μεγαλύτερο ποσοστό, το 85,2%, των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές δε, η ηλικία και ο βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση ήταν στατιστικά σημαντικές και συγκεκριμένα οι ασθενείς ηλικίας ≤ 58 ετών είχαν 5,6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση ενώ αύξηση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση. Το μοντέλο που περιελάμβανε τον «πραγματικά» βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό, ενώ προέβλεψε ορθώς το 83,6% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές, επίσης η ηλικία και ο «πραγματικά» βιώσιμος αριθμός των CD34+

κυττάρων/Kg προς έγχυση ήταν στατιστικά σημαντικές και συγκεκριμένα, οι ασθενείς ηλικίας ≤ 58 ετών είχαν 6,6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση και η αύξηση του βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση.

Όσο αφορά στην ιδανική μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση το μοντέλο που περιελάμβανε το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB, ήταν στατιστικά σημαντικό και προέβλεψε ορθώς το 90,2% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα τη ημέρα της συλλογής, η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης και ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό ήταν στατιστικά σημαντικές. Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα, $>508 \times 10^3/\mu\text{l}$ PLT στον ασκό κρουκατάψυξης και $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση, είχαν 0,07 φορές, 0,05 φορές και 0,1 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση. Το μοντέλο που περιελάμβανε το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS, ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό αλλά προέβλεψε ορθώς το 88,5% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής και η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ήταν στατιστικά σημαντικές. Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και $>508 \times 10^3/\mu\text{l}$ PLT στον ασκό κρουκατάψυξης είχαν 0,07 φορές και 0,03 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση. Το μοντέλο που περιελάμβανε τον «πραγματικά» βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό, ενώ προέβλεψε ορθώς το 90,2% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής και η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης ήταν στατιστικά σημαντικές. Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και $>508 \times 10^3/\mu\text{l}$ PLT στον ασκό κρουκατάψυξης έχουν 0,08 φορές και 0,03 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση.

Όσο αφορά στη συνολική ιδανική αιματολογική αποκατάσταση το μοντέλο που περιελάμβανε το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο με TB, ήταν στατιστικά σημαντικό και προέβλεψε ορθώς το 83,6% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής και ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε ήταν στατιστικά σημαντικές. Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος, $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής και $\leq 2,4 \times 10^6$ /Kg ανά ασκό που αποψύχθηκε προς έγχυση, είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση. Το μοντέλο που περιελάμβανε το βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, όπως αυτός προσδιορίστηκε με FACS, ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό αλλά προέβλεψε ορθώς το 85,2% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και ο βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση ήταν στατιστικά σημαντικές. Οι ασθενείς με $\leq 98,6\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση ενώ αύξηση του αριθμού των βιώσιμων CD34+/Kg που εγχύθηκαν συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση. Το μοντέλο που περιελάμβανε τον «πραγματικά» βιώσιμο αριθμό των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση, ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό, ενώ προέβλεψε ορθώς το 86,9% των περιπτώσεων. Από τις επτά μεταβλητές, μόνο η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν και ο «πραγματικά» βιώσιμος αριθμός των CD34+ κυττάρων/Kg προς έγχυση στατιστικά σημαντικές. Οι ασθενείς με $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής είχαν 0,2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση και η αύξηση του αριθμού των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg που εγχύθηκαν συσχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση.

Βέλτιστη ελάχιστη δόση CD34+/Kg για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση

Θεωρούμε, όπως και άλλοι, ότι ο στόχος συλλογής CD34+ κυττάρων δε θα πρέπει να περιορίζεται στην ελάχιστη απαιτούμενη δόση, που απλώς εξασφαλίζει

αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO (81). Αντίθετα, όταν είναι εφικτό, η συλλογή των CD34+ κυττάρων θα πρέπει να ολοκληρώνεται όταν έχει επιτευχθεί ο στόχος για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση. Πολλά κέντρα, όπως και το δικό μας, χρησιμοποιούμε την κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης μετά την AMMO ως κριτήριο καθορισμού της ελάχιστης ιδανικής δόσης. Θεωρούμε όμως, πως για τον ορισμό ελάχιστης απαιτούμενης δόσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το ποσοστό ελάττωσης της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων (81). Προσδιορίστηκαν επομένως, η ελάχιστη «προγραμματισμένη» δόση, και οι ελάχιστες δόσεις των βιώσιμων (TB και FACS) και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+/Kg που απαιτήθηκαν για ιδανική βραχυπρόθεσμη, ιδανική μακροπρόθεσμη και ιδανική συνολική αιμοποιητική αποκατάσταση των ασθενών, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Οι ασθενείς που πέτυχαν ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων (>500/μl έως την D12) και των αιμοπεταλίων τους (>20x10³/μl έως την D14) είχαν λάβει «προγραμματισμένη» δόση 7,3x10⁶/Kg CD34+ κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 2,9-12,5x10⁶/Kg), δόση 3,9x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (TB) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 1,8-6,6x10⁶/Kg), δόση 3,9x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 1,0-9,3x10⁶/Kg), και δόση 3,2x10⁶/Kg CD34+ «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,4-9,1 x10⁶/Kg). Η βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης ήταν τα 5,3x10⁶ CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση), τα 2,7x10⁶ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, TB), τα 3,2x10⁶ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, FACS), και τα 1,9x10⁶ CD34+/Kg (δόση «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων, FACS).

Οι ασθενείς που πέτυχαν ιδανική μακροπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων (>1500/μl έως την D30) και των αιμοπεταλίων τους (>140x10³/μl έως την D90) είχαν λάβει «προγραμματισμένη» δόση 6,7x10⁶/Kg CD34+ κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 2,7-12,5x10⁶/Kg), δόση 3,3x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (TB) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,4-6,6x10⁶/Kg), δόση 3,1x10⁶/Kg CD34+ βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,2-9,3x10⁶/Kg), και δόση 2,1x10⁶/Kg CD34+ «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: 0,1-9,1 x10⁶/Kg). Η βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής μακροπρόθεσμης

αποκατάστασης ήταν τα $5,1 \times 10^6$ CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση), τα $2,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, TB), τα $3,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, FACS), και τα $1,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων, FACS).

Οι ασθενείς που πέτυχαν ιδανική συνολική αιμοποιητική αποκατάσταση είχαν λάβει «προγραμματισμένη» δόση $7,4 \times 10^6$ /Kg CD34+ κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $2,9-12,5 \times 10^6$ /Kg), δόση $4,0 \times 10^6$ /Kg CD34+ βιώσιμων (TB) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $1,5-6,6 \times 10^6$ /Kg), δόση $4,1 \times 10^6$ /Kg CD34+ βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $1,0-9,3 \times 10^6$ /Kg), και δόση $3,3 \times 10^6$ /Kg CD34+ «πραγματικά» βιώσιμων (FACS) κυττάρων (διάμεση τιμή, εύρος: $0,4-9,1 \times 10^6$ /Kg). Η βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής αιμοποιητικής αποκατάστασης ήταν τα $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg («προγραμματισμένη» δόση), τα $2,7 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, TB), τα $3,4 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση βιώσιμων κυττάρων, FACS), και τα $2,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (δόση «πραγματικά» βιώσιμων κυττάρων, FACS).

Είναι γεγονός πως οι περιπτώσεις εκείνες όπου συλλέγεται και εγχύεται πολύ μικρός αριθμός CD34+ κυττάρων είναι λίγες, με αποτέλεσμα να υπάρχει σχεδόν πάντοτε η δυνατότητα έγχυσης αριθμού CD34+ κυττάρων, ικανού τουλάχιστον για επαρκή αιματολογική αποκατάσταση. Αυτή η συνθήκη αποτελεί εμπόδιο στον ορισμό της ελάχιστης απαιτούμενης δόσης για αιματολογική αποκατάσταση και οδηγεί σε ποικίλα αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών μελετών (179). Ως ελάχιστη δόση των CD34+/Kg, όπως αυτή μετράται στο φρέσκο προϊόν, για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων έχει οριστεί η δόση των $6,0 \times 10^6$ CD34+/kg από τους Dercksen και συν., των $\times 10^6$ CD34+/kg από τους και συν. (127). Ως ελάχιστη δόση των CD34+/Kg, όπως αυτή μετράται στο φρέσκο προϊόν, για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων έχει οριστεί η δόση των $6,1 \times 10^6$ CD34+/kg από τους Dercksen και συν., των $5,0 \times 10^6$ CD34+/kg από τους van der Waal και συν., των $3,5 \times 10^6$ CD34+/kg από τους Watts και συν. (83, 124, 127). Ως ελάχιστη δόση των CD34+/Kg, όπως αυτή μετράται στο φρέσκο προϊόν, για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση έχει οριστεί η δόση των 8×10^6 CD34+/kg από τους Siena και συν., η δόση των $5,0 \times 10^6$ CD34+/kg από τους Besinger και συν., τους Weaver και συν. και τους Beguin και συν., τους Olivieri και συν., τους Pecora και συν., τους Sauter και συν. (78, 90, 103, 119, 180).

Ένας ακόμη παράγοντας που δυσχεραίνει τον ορισμό της ελάχιστης απαιτούμενης δόσης για ασφαλή ή ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την ΑΜΜΟ, αποτελεί το γεγονός ότι κατά κανόνα, ο αριθμός των CD34+ κυττάρων μετράται μόνο στο φρέσκο προϊόν, παρόλο που έχει αποδειχθεί από πληθώρα μελετών, πως η βιωσιμότητα των κρυοσυντηρημένων κυττάρων ελαττώνεται σημαντικά (81, 108). Μόλις μετά το έτος 2000 εντοπίζονται στη βιβλιογραφία προσπάθειες ορισμού ελάχιστων ιδανικών δόσεων βιώσιμων CD34+ κυττάρων. Οι de Boer και συν. όρισαν ως ελάχιστη δόση βιώσιμων CD34+ κυττάρων για επαρκή αιματολογική αποκατάσταση τα $2,2 \times 10^6/\text{Kg}$ και ως ελάχιστη δόση βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων για επαρκή αιματολογική αποκατάσταση τα $1,2 \times 10^6/\text{Kg}$ (168). Οι Allan και συν. όρισαν ως ελάχιστη δόση βιώσιμων CD34+ κυττάρων για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση τα $5,0 \times 10^6 \text{ CD34+}/\text{kg}$ (100).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ταχεία και ολοκληρωμένη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων αποτελεί το ορόσημο της επιτυχημένης αιματολογικής αποκατάστασης έπειτα από αυτόλογη μεταμόσχευση κινητοποιημένων αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Η κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης μετά την AMMO αποτελεί δείκτη ποιότητας τόσο του κλινικού όσο και του εργαστηριακού τμήματος μιας μονάδας μεταμόσχευσης. Η ελάττωση της βιωσιμότητας των κρυοσυντηρημένων μοσχευμάτων προς AMMO είναι δεδομένη, και κάθε κέντρο οφείλει να έχει μια σταθερή πρακτική εφαρμογής μιας ασφαλούς μεθόδου ελέγχου της βιωσιμότητας, η οποία να σχετίζεται με την κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης των ασθενών του. Η κλινική σημασία της περαιτέρω μείωσης της βιωσιμότητας των κυττάρων λόγω απόπτωσης δεν έχει ακόμη ευρέως μελετηθεί.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν α) η διερεύνηση της επίδρασης της κρυοσυντήρησης στη βιωσιμότητα και την απόπτωση των CD34+ κυττάρων και της επίδρασης τους στην κινητική της μετέπειτα αιματολογικής αποκατάστασης, β) η διάκριση της ασφαλέστερης μεθόδου προσδιορισμού της βιωσιμότητας και «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μεταξύ των δυο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων, της μεθόδου με χρώση Trypan Blue (TB) και της καταμέτρησης με κυτταρομετρία ροής (FACS) και γ) ο ορισμός της ελάχιστης δόσης βιώσιμων και βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων με στόχο την ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα παρακάτω βασικά συμπεράσματα.

1. Παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας και απόπτωσης μεταξύ διαφορετικών κρυοσυντηρημένων προϊόντων.

Παρόλο που όλα τα κυτταρικά προϊόντα κρυοκαταψύχθηκαν και κρυοσυντηρήθηκαν σε ίδιες, ιδανικές συνθήκες, και οι πειραματικές μετρήσεις της βιωσιμότητας και απόπτωσης όλων των δειγμάτων έγιναν με αυστηρή τήρηση του πρωτοκόλλου όσο αφορά χρόνους, ποσότητες και θερμοκρασίες, παρατηρήθηκε

μεγάλη διακύμανση των ποσοστών βιωσιμότητας μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Στα 61 δείγματα που αναλύθηκαν, το εύρος του ποσοστού:

- των ζωντανών TNC κυττάρων ήταν 10-73% (διάμεση τιμή 55,3%, μέτρηση με Trypan blue),
- των βιώσιμων CD45+ κυττάρων ήταν 7,5-81,4% (διάμεση τιμή 61,7%, μέτρηση με FACS)
- των βιώσιμων CD34+ κυττάρων 0,6-88% (διάμεση τιμή 45,9%, μέτρηση με FACS).
- των αποπτωτικών CD45+ κυττάρων ήταν 0,5-34,3% (διάμεση τιμή 8,4%)
- των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων 0-44,9% (διάμεση τιμή 4,3%).
- των «πραγματικά» βιώσιμων (βιώσιμων μη αποπτωτικών) CD45+ κυττάρων ήταν 5,4-80,9% (διάμεση τιμή 52,9%) και
- των «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων 0,5-79,5% (διάμεση τιμή 32,2%).

Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση παραμέτρων, που σχετίζονται με τον ίδιο τον ασθενή και το προϊόν της συλλογής, με τη βιωσιμότητα των αποψυγμένων CD34+ κυττάρων, δικαιολογεί σε μεγάλο βαθμό τη μεγάλη διακύμανση των ποσοστών βιωσιμότητας μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων.

2. Παράμετροι σημαντικοί για τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την κρυοσυντήρηση των προϊόντων συλλογής.

Από τη μονοπαραγοντική ανάλυση 17 παραμέτρων, 6 παράγοντες σχετίστηκαν σημαντικά με τη βιωσιμότητα ή/και την «πραγματική βιωσιμότητα» των κρυοσυντηρημένων CD34+ κυττάρων:

- Οι ασθενείς με **$\leq 0,46\%$ CD34+ κύτταρα επί των CD45+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής** είχαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ποσοστά βιώσιμων και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων έναντι όσων είχαν $\leq 0,46\%$ (32,7% έναντι 62,9% $p=0,002$ και 23,3% έναντι 43%, $p=0,001$, αντίστοιχα).
- Οι ασθενείς με **$\leq 97,3\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής** εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα

ποσοστά βιώσιμων και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά τη απόψυξη έναντι όσων είχαν >97,3% (24,1% έναντι 51,5%, $p=0,009$ και 21,5% έναντι 35,3%, $p=0,001$, αντίστοιχα).

- Οι ασθενείς με **$\leq 98,7\%$ βιώσιμων CD34+ κυττάρων στο προϊόν συλλογής προ κατάψυξης** είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά βιώσιμων και «πραγματικά» βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη (40,9% έναντι 62,5%, $p=0,036$ και 22,9% έναντι 34,4%, $p=0,035$, αντίστοιχα).
 - Στους **ασκούς κρυσκατάψυξης με τελική συγκέντρωση λευκών αιμοσφαιρίων (CD45+) $\leq 132,4 \times 10^3/\mu\text{l}$** η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά καλύτερη από ότι σε εκείνους με συγκέντρωση $>132,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ (51,6% έναντι 40%, $p=0,043$).
 - Στους **ασκούς κρυσκατάψυξης με τελική συγκέντρωση CD34+ κυττάρων $>1354/\mu\text{l}$** η βιωσιμότητα και η «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων ήταν καλύτερη έναντι εκείνων με συγκέντρωση $\leq 1354/\mu\text{l}$ (58,2% έναντι 39,2%, $p=0,026$ και 36% έναντι 26,4%, $p=0,046$, αντίστοιχα).
 - Στους **ασκούς κρυσκατάψυξης με τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων $\leq 402 \times 10^3/\mu\text{l}$** η βιωσιμότητα και η «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων ήταν καλύτερη έναντι εκείνων με συγκέντρωση $\leq 402 \times 10^3/\mu\text{l}$ (60,7% έναντι 29,5%, $p=0,002$ και 35,7% έναντι 26,4%, $p=0,010$, αντίστοιχα).
 - Το ποσοστό των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων δε διέφερε μεταξύ των κρυσσυντηρημένων προϊόντων με διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτταρικών στοιχείων, με εξαίρεση τη συγκέντρωση των PMN. Το ποσοστό των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων στα προϊόντα με $\text{PMN} > 24 \times 10^3/\mu\text{l}$ ήταν μικρότερο από το ποσοστό τους στα προϊόντα με $\text{PMN} \leq 24 \times 10^3/\mu\text{l}$ (3,4% έναντι 11,8%, αντίστοιχα, $p=0,044$).
- ❖ Προτείνεται, με σκοπό τη βέλτιστη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων μετά την απόψυξη, κατά το σχεδιασμό της κρυσκατάψυξης, όσο αφορά στην αραιώση και τη διανομή του προϊόντος συλλογής σε ασκούς, να λαμβάνονται υπόψη οι παραπάνω παρατηρήσεις.

3. «Προγνωστικοί δείκτες βιωσιμότητας», γνωστοί πριν, κατά και μετά τη συλλογή των ΑΑΚ μπορούν να κατευθύνουν την απόφαση για συλλογή επιπλέον CD34+/Kg ή για έλεγχο της βιωσιμότητας του μοσχεύματος πριν τη ΑΜΜΟ.

Έπειτα από πολυπαραγοντική ανάλυση των παραμέτρων, που κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση σχετίστηκαν σημαντικά με τη βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων προέκυψε ότι:

- η $\leq 97,3\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής (γνωστή παράμετρος πριν τη συλλογή),
- η $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο προϊόν συλλογής πριν την κατάψυξη (γνωστή παράμετρος μετά τη συλλογή), και
- η $>402 \times 10^3/\mu\text{l}$ τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρουοκατάψυξης (γνωστή παράμετρος κατά τη συλλογή ή/και την κρουοκατάψυξη),

σχετίζονται με στατιστικά σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα και μειωμένη «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο αποψυγμένο προϊόν, όπως αυτές μετρήθηκαν με FACS.

- ❖ Εάν συντρέχει οποιοσδήποτε από τους παραπάνω παράγοντες, οι οποίοι προβλέπουν χαμηλότερη βιωσιμότητα, προτείνεται α) η παράταση της διάρκειας της συλλογής κατά την 1^η συνεδρία ή προγραμματισμό 2^{ης} συνεδρίας για την επίτευξη συλλογής μεγαλύτερου αριθμού CD34+/Kg και β) η σήμανση του προϊόντος για έλεγχο βιωσιμότητας πριν την ΑΜΜΟ (εικ. 1).

4. Η δόση των βιώσιμων και των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg έχει σημασία για την επίτευξη ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης και όχι ο αριθμός των CD34+/Kg, όπως μετράται στο φρέσκο προϊόν.

- Ο αριθμός των CD34+/Kg, όπως μετράται στο φρέσκο προϊόν και εγχύεται στην ΑΜΜΟ, έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων αλλά δε σχετίζεται με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων ούτε με τη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση.

- Ο βιώσιμος και «πραγματικά» βιώσιμος αριθμός CD34+/Kg που εγχύεται στην AMMO, έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη βραχυπρόθεσμη όσο και με τη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση.
- Κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση, η οποία περιελάμβανε εκτός των άλλων παραμέτρων, την «προγραμματισμένη» δόση (αριθμός CD34+/Kg φρέσκου προϊόντος) και τον αριθμό των βιώσιμων CD34+/Kg κυττάρων στο αποψυγμένο προϊόν, μόνο η αύξηση του βιώσιμου ή του «πραγματικά» βιώσιμου αριθμού των CD34+ κυττάρων/Kg σχετίστηκε με αύξηση της πιθανότητας για ιδανική συνολική αιματολογική αποκατάσταση.

5. Η αιματολογική αποκατάσταση στην AMMO επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από χαρακτηριστικά των ασθενών και χαρακτηριστικά του μοσχεύματος.

Κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση τα παρακάτω χαρακτηριστικά σχετίστηκαν με την ταχεία και επαρκή αιματολογική αποκατάσταση.

- Αύξηση της ηλικίας (>53 ετών) σχετίζεται με παράταση της ουδετεροπενίας και της θρομβοπενίας, χωρίς ιδιαίτερη κλινική σημασία, αλλά το σημαντικότερο, με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον οι ασθενείς ηλικίας ≤58 ετών έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα για ιδανική βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση.
- Τα MM είχαν πιο αργή αποκατάσταση της ουδετεροπενίας σε σχέση με τα LH (D11 έναντι D9, $p < 0,0005$) και τα NHL (D11 έναντι D10, $p = 0,021$), ενώ τα LH είχαν πιο σύντομη αποκατάσταση της θρομβοπενίας σε σχέση με τα MM και τα NHL (D11 έναντι D14, $p < 0,0005$ και έναντι D15, $p = 0,0008$, αντίστοιχα).
- Οι πολύ καλοί κινητοποιητές (οι ασθενείς που κινητοποιούνται επαρκώς με δυνατότητα συλλογής πλέον των 8×10^6 CD34+/Kg BΣ) επιτυγχάνουν στατιστικά σημαντικά καλύτερη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων τους.
- Η έγχυση >360ml κυτταρικού προϊόντος σχετίζεται με καθυστέρηση της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων και με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση τους.

- Η έγχυση >3 ασκών κυτταρικού προϊόντος σχετίζεται με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων.
- Η έγχυση $\leq 2,4 \times 10^6$ /Kg CD34+ κυττάρων ανά ασκό σχετίζεται με καθυστέρηση της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων και με υστέρηση στη συνολική μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση.

6. Ο χρόνος αποκατάστασης της θρομβοπενίας μετά την AMMO αποδεικνύεται *in vivo* δείκτης για τη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων.

Η διάμεση ημέρα αποκατάστασης των αιμοπεταλίων $> 20 \times 10^3$ /μl των ασθενών, που πέτυχαν μακροπρόθεσμη αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων τους, ήταν η D14, ενώ αντίθετα, η διάμεση ημέρα αποκατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων $> 20 \times 10^3$ /μl των ασθενών που δεν είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 50 \times 10^3$ /μl ή $\geq 100 \times 10^3$ /μl ή $\geq 140 \times 10^3$ /μl έως τις D30, D60 ή D90/D180, αντίστοιχα ήταν η D24, D20 και D16 αντίστοιχα ($p < 0,0005$, $p = 0,001$ και $p = 0,003$, αντίστοιχα).

7. Η συλλογή τουλάχιστον $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg και η έγχυση τουλάχιστον $3,4 \times 10^6$ βιώσιμων (FACS) CD34+/Kg ή $2,9 \times 10^6$ βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg εξασφαλίζει ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO.

- Βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης, βραχυπρόθεσμης όσο και μακροπρόθεσμης ταυτόχρονα, είναι τα $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (μέτρηση στο φρέσκο προϊόν), τα $3,4 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg και τα $2,9 \times 10^6$ βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg.
- Ελάχιστες δόσεις των $5,3 \times 10^6$ CD34+/Kg (μέτρηση στο φρέσκο προϊόν), εξασφαλίζουν είτε ιδανική βραχυπρόθεσμη είτε ιδανική μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση αλλά όχι ιδανική συνολική αιματολογική αποκατάσταση.
- Η ελάχιστη ιδανική δόση CD34+/Kg που απαιτείται να συλλεχθεί ή να εγχυθεί μπορεί να διαφέρει για κάθε κέντρο, αναλόγως της διάμεσης βιωσιμότητας των κρυοσυντηρημένων προϊόντων του.

- ❖ Προτείνεται, στις περιπτώσεις που είναι εφικτό, η συλλογή των CD34+ κυττάρων να μην περιορίζεται στην ελάχιστη απαιτούμενη δόση, που θεωρητικά εξασφαλίζει αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO ($2-3 \times 10^6/\text{Kg}$), αλλά να στοχεύει στον αριθμό που εξασφαλίζει ιδανική αιματολογική αποκατάσταση.

8. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας του προς έγχυση κρυσυντηρημένου προϊόντος δεν είναι απαραίτητος υπό ιδανικές συνθήκες κρυσυντήρησης και απόψυξης υπό προϋποθέσεις.

Ο έλεγχος του αριθμού των CD34+/Kg που εγχύονται στην AMMO δε θεωρείται απαραίτητος όταν δε συντρέχουν λόγοι, που να συνδέονται με παραβιάσεις του πρωτοκόλλου κρυσυντήρησης ή με αποκλίσεις στις θερμοκρασίες κρυσυντήρησης των μοσχευμάτων. Προκειμένου να ελαχιστοποιούνται όμως οι πιθανότητες για μια αποτυχημένη αιματολογική αποκατάσταση, είναι δόκιμος ο έλεγχος της βιωσιμότητας πριν την έναρξη της μεθεταχείρισης στις περιπτώσεις που ισχύουν ταυτόχρονα τα παρακάτω (εικ.1):

- υφίσταται οποιοσδήποτε από τους «προγνωστικούς» παράγοντες οι οποίοι προβλέπουν χαμηλότερη βιωσιμότητα:
 - $\leq 97,3\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα της συλλογής, ή
 - $\leq 98,7\%$ βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο προϊόν συλλογής ή
 - $> 402 \times 10^3/\mu\text{l}$ τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυσυντήρησης
- δεν έχουν συλλεχθεί $\geq 6,9 \times 10^6/\text{Kg}$ (φρέσκο προϊόν)
- ο αριθμός των βιώσιμων ή των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg προς έγχυση εκτιμάται $< 3,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ή $< 2,9 \times 10^6/\text{Kg}$, αντίστοιχα.

9. Η απόπτωση των κρυσυντηρημένων CD34+ κυττάρων οδηγεί σε επιπλέον μείωση της δόσης των CD34+/Kg που τελικά εγχύονται στον ασθενή που υποβάλλεται σε AMMO και πρέπει να συνεκτιμάται κατά την αξιολόγηση του προϊόντος.

- Ακόμα όμως και στις περιπτώσεις που προσδιορίζεται ο βιώσιμος αριθμός των CD34+/Kg πριν την έγχυση, ο «πραγματικά βιώσιμος» αριθμός τους

υπερεκτιμάται όταν δε συνυπολογίζεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μεταξύ των ζωντανών κυττάρων, το οποίο δεν είναι αμελητέο (διάμεση τιμή 4,3%, εύρος 0-44,9%).

- Η μείωση των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων στα κρουοκατεψυγμένα προϊόντα είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική διαφοροποίηση των «πραγματικών» δόσεων των AAK, που χορηγήθηκαν στην AMMO, σε σχέση με τις «προγραμματισμένες» δόσεις, όπως αυτές είχαν υπολογισθεί με καταμέτρηση των CD34+ κυττάρων στα φρέσκα προϊόντα.

Οι ασθενείς που θα λάμβαναν:

- 2,7-2,9x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 0,9x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,1-1,8x10⁶ CD34+/Kg),
 - 3-6x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 1,1x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,03-3,3x10⁶ CD34+/Kg), και
 - 6,1-12,5x10⁶ CD34+/Kg έλαβαν τελικά 3,1x10⁶ CD34+/Kg (διάμεση τιμή, εύρος: 0,3-9,1x10⁶ CD34+/Kg)
- Η απόπτωση δε σχετίστηκε με κανένα από τα χαρακτηριστικά των ασθενών ή των μοσχευμάτων που ελέγχθηκαν, άρα η πρόγνυσή της δεν είναι εφικτή.
 - Η δυνατότητα των πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων, όταν εγχύονται και βρίσκονται στο φυσιολογικό in vivo περιβάλλον τους, να επανακτούν τη φυσιολογία τους και την ικανότητα εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού στο μυελό των οστών, δεν έχει αποδειχθεί.
- ❖ Για όλους τους παραπάνω λόγους, προτείνεται ως σημαντική η εξαίρεση των αποπτωτικών κυττάρων κατά την εκτίμηση των βιώσιμων CD34+/Kg.

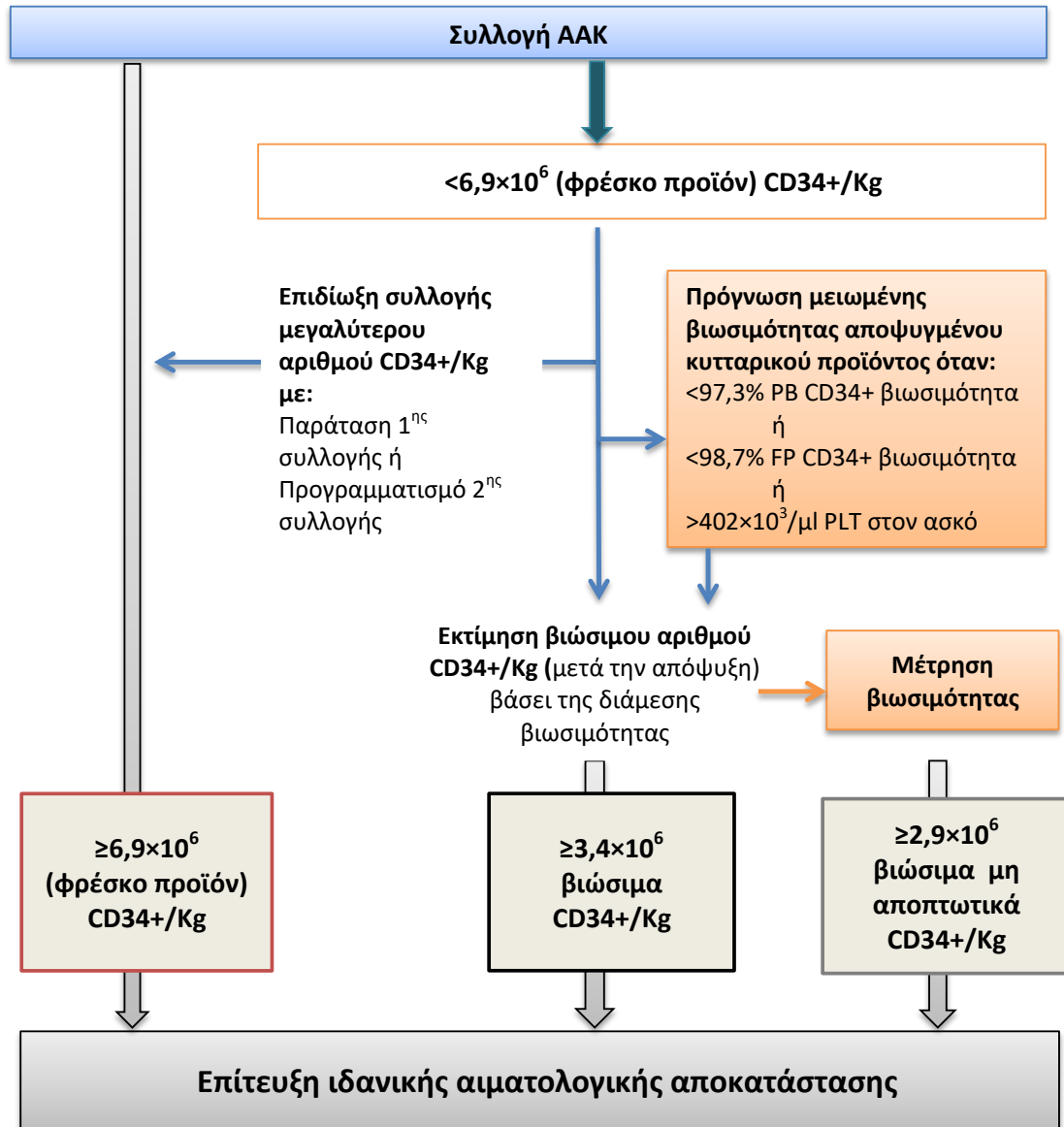
10. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας του προς έγχυση κρουοσυντηρημένου προϊόντος όταν πραγματοποιείται, είναι ασφαλέστερο να πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής και να συμπεριλαμβάνει και έλεγχο της απόπτωσης.

Με βάση τις διαπιστώσεις ότι:

- Τα κρουοσυντηρημένα CD34+ κύτταρα είχαν στατιστικά σημαντική μειωμένη βιωσιμότητα έναντι των CD45+ κυττάρων (διάμεση διαφορά -12,6%,

$p < 0,0005$), δεδομένο που δε μπορεί να εκτιμηθεί με TB, καθώς η τελευταία μετρά το σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων, ενώ επιπλέον δε μπορεί να ανιχνεύσει τα αποπτωτικά κύτταρα.

- Η μέθοδος με TB υπερεκτιμά την % βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων (στο 70,3% των δειγμάτων της μελέτης).
- ❖ Προτείνεται η μέθοδος με TB να εφαρμόζεται μόνο ως μια ταχεία μέθοδος εκτίμησης της βιωσιμότητας σε πρώτο στάδιο ελέγχου. Στις συλλογές με χαμηλό αριθμό CD34+/Kg προτείνεται ο ακριβής προσδιορισμός του αριθμού των βιώσιμων και μη αποπτωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα 1. Αλγόριθμος επίτευξης ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης. Ως ιδανική θεωρήθηκε η αιματολογική αποκατάσταση, στους ασθενείς που ο αριθμός των ουδετερόφιλων ήταν $\geq 500/\mu\text{l}$ μέχρι τη D12 και $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως τη D30, ενώ ταυτόχρονα, ο αριθμός των αιμοπεταλίων ήταν $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι την D14 και $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ το αργότερο έως τη D90. «Προγνωστικοί δείκτες βιωσιμότητας», γνωστοί πριν, κατά και μετά τη συλλογή των ΑΑΚ, μπορούν να κατευθύνουν την απόφαση για συλλογή επιπλέον CD34+/Kg ή για έλεγχο της βιωσιμότητας του μοσχεύματος πριν τη ΑΜΜΟ. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας του προς έγχυση κρυσυντηρημένου προϊόντος είναι δόκιμος όταν ο αριθμός των βιώσιμων CD34+/Kg προβλέπεται χαμηλότερος από τον ελάχιστο απαιτούμενο για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση. Ως βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης, βρέθηκαν τα $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (μέτρηση στο φρέσκο προϊόν), τα $3,4 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg και τα $2,9 \times 10^6$ βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Προοπτικά, είναι σημαντική η περαιτέρω διερεύνηση των ευρημάτων της μελέτης ώστε να επαληθευτούν σε μεγαλύτερο όγκο δειγμάτων.

Δεύτερον, ερωτήματα έχουν προκύψει όσο αφορά την ποσότητα των αρχέγονων (HSC: CD45dim CD34+ CD38- CD45RA- CD90+) και των προγονικών κυττάρων (MPP: CD45+ CD34+ CD38- CD45RA- CD90- και CMP: CD45+ CD34+ CD38+ CD45RA- CD123+) που συλλέγεται και εγχύεται ως βιώσιμα κύτταρα στην AMMO. Είναι γνωστό πως τα πρώτα συμβάλουν στη μακροπρόθεσμη σταθεροποίηση της αιμοποίησης ενώ τα δεύτερα εξασφαλίζουν μόνο βραχυπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση. Η διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν πρώτον την κινητοποίηση τους και κατά δεύτερον τη συλλογή τους και ο καθορισμός της ελάχιστης απαιτούμενης δόσης τους για επιτυχή και ιδανική αιματολογική αποκατάσταση δεν έχουν εκτενώς διερευνηθεί.

Τρίτον, εκτός από τους υποπληθυσμούς των AAK, η μελέτη της σημασίας των κυτταρικών πληθυσμών του αυτόλογου μοσχεύματος (B-λεμφοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα και υποπληθυσμοί τους, NK-λεμφοκύτταρα, δενδριτικά,) ως προς την εγκατάσταση του μοσχεύματος, την ανοσολογική αποκατάσταση και την έκβαση του βασικού νοσήματος δεν έχει επίσης διερευνηθεί επαρκώς.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η ταχεία και ολοκληρωμένη αιματολογική αποκατάσταση, έπειτα από την αυτόλογη μεταμόσχευση (AMMO) κινητοποιημένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK), αποτελεί δείκτη ποιότητας τόσο του κλινικού όσο και του εργαστηριακού τμήματος μιας μονάδας μεταμόσχευσης. Η ελάττωση της βιωσιμότητας των κρυσυντηρημένων μοσχευμάτων επιβάλλει μια σταθερή πρακτική ελέγχου της βιωσιμότητας, με αποτελέσματα που σχετίζονται σταθερά με την κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης των ασθενών.

Σκοπός: Σκοπός της μελέτης ήταν α) η διερεύνηση της επίδρασης της κρυσυντήρησης στη βιωσιμότητα και την απόπτωση των CD34+ κυττάρων και της επίδρασης τους στην κινητική της μετέπειτα αιματολογικής αποκατάστασης, β) η διάκριση της ασφαλέστερης μεθόδου προσδιορισμού της βιωσιμότητας και της «πραγματικής» βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων μεταξύ των δυο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων, και γ) ο προσδιορισμός της ελάχιστης δόσης βιώσιμων και βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση μετά την AMMO.

Μέθοδοι: Μελετήθηκαν αναδρομικά τα κρυσυντηρημένα δείγματα 61 ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες – Πολλαπλό Μυέλωμα (MM), Λέμφωμα Hodgkin (HL) και Μη-Hodgkin Λεμφώματα (NHL) - που είχαν ήδη υποβληθεί σε AMMO.

Ως προς την κυτταρική τους βιωσιμότητα, τα δείγματα αναλύθηκαν με δύο μεθόδους: α) τη μέθοδο με χρώση με Trypan Blue (TB) και β) με κυτταρομετρία ροής (FACS). Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση της χρωστικής 7-AAD και της Annexin-V επέτρεψε τη διάκριση μεταξύ βιώσιμων (7-AAD-/Annexin-V-), πρώιμων αποπτωτικών (7-AAD-/Annexin-V+) και νεκρών κυττάρων (7-AAD+/Annexin-V+). Τα βιώσιμα κύτταρα δε βιάφονται από τη χρωστική Trypan Blue (μέθοδος α) και είναι αρνητικά στη 7-AAD (method β). τα «πραγματικά» βιώσιμα (βιώσιμα μη αποπτωτικά) κύτταρα είναι αρνητικά τόσο στη 7-AAD όσο και στην Annexin-V.

Ως προς την επίδρασή τους στη βιωσιμότητα και την «πραγματική βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων, μελετήθηκαν με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση, τα χαρακτηριστικά των ασθενών, οι παράμετροι της κινητοποίησης, και τα χαρακτηριστικά των κρυοκατεψυγμένων προϊόντων (Πίνακας 1). Ως προς την κινητική της αιματολογικής αποκατάστασης των ασθενών μετά την AMMO, μελετήθηκαν με μονοπαραγοντική ανάλυση, τα εξής χαρακτηριστικά: το φύλο, η ηλικία, τα νόσημα, η κατάσταση νόσου κατά τη συλλογή AAK, η μεταθεραπεία, η κινητική της κινητοποίησης, ο συνολικός όγκος του αποψυγμένου προϊόντος, ο αριθμός των ασκών, τα CD34+/Kg ανά ασκό, η διάρκεια κρυοσυντήρησης, ο συνολικός αριθμός CD34+/kg (όπως μετρήθηκαν στο φρέσκο προϊόν) και ο συνολικός αριθμός βιώσιμων και βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg, που εγχύθηκαν. Κατά τη μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής, η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο προϊόν της συλλογής και η συγκέντρωση των PLT στον ασκό, προστέθηκαν στους παραπάνω παράγοντες ως πιθανοί προγνωστικοί παράγοντες ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης.

Ως «προγραμματισμένη» δόση ορίστηκε ο προς έγχυση αριθμός των CD34+/Kg, όπως μετράται στο φρέσκο προϊόν συλλογής. Η ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης είναι η πρώτη ημέρα μετά την AMMO, όπου τα ουδετερόφιλα είναι $\geq 500/\mu\text{l}$ και η πρώτη ημέρα μετά από τρεις συνεχόμενες (χωρίς μετάγγιση) όπου τα αιμοπετάλια είναι $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$. Μακροπρόθεσμη αποκατάσταση επιτυγχάνεται εφόσον τα ουδετερόφιλα είναι $\geq 1500/\mu\text{l}$ (το αργότερο έως τη D90) και $\geq 2000/\mu\text{l}$ (το αργότερο έως τη D180) και τα αιμοπετάλια είναι $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ (το αργότερο έως τη D180). Ως ιδανική θεωρήθηκε η αιματολογική αποκατάσταση, στους ασθενείς που ο αριθμός των ουδετερόφιλων ήταν $\geq 500/\mu\text{l}$ μέχρι τη D12 και $\geq 1500/\mu\text{l}$ έως τη D30, ενώ ταυτόχρονα, ο αριθμός των αιμοπεταλίων ήταν $\geq 20 \times 10^3/\mu\text{l}$ μέχρι την D14 και $\geq 140 \times 10^3/\mu\text{l}$ το αργότερο έως τη D90.

Αποτελέσματα: Στα 61 δείγματα που αναλύθηκαν, η διάμεση τιμή α) των ζώντων εμπύρηνων κυττάρων (TNC) ήταν 55,3% (εύρος 10-73%, μέτρηση με Trypan blue), β) των βιώσιμων CD45+ κυττάρων ήταν 61,7% (εύρος 7,5-81,4%, μέτρηση με FACS), γ) των βιώσιμων CD34+ κυττάρων ήταν 45,9% (εύρος 0,6-88%), δ) των αποπτωτικών

CD45+ κυττάρων ήταν 8,4% (εύρος 0,5-34,3%), ε) των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων ήταν 4,3% (εύρος 0-44,9%), στ) των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD45+ κυττάρων ήταν 52,9% (εύρος 5,4-80,9%) και ζ) των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων ήταν 32,2% (εύρος 0,5-79,5%). Τα κρυοσυντηρημένα CD34+ κύτταρα είχαν στατιστικά σημαντική μειωμένη βιωσιμότητα έναντι των CD45+ κυττάρων (διάμεση διαφορά -12,6%, $p < 0,0005$). Η μέθοδος με TB υπερεκτίμησε την % βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο 70,3% των δειγμάτων της μελέτης.

Ως προς τη βιωσιμότητα και την «πραγματική» βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων, εννέα παράγοντες βρέθηκαν στατιστικά σημαντικοί κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση (πίνακας 1). Κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο οι εξής τρεις παρέμειναν στατιστικά σημαντικοί: α) η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής ($p=0,020$ για τη βιωσιμότητα και $p=0,036$, για την «πραγματική» βιωσιμότητα), β) η βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής ($p=0,024$ και $p=0,006$, αντίστοιχα) και γ) η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό κρυοκατάψυξης ($p=0,001$ και $p=0,004$, αντίστοιχα).

Όσο αφορά στην αιματολογική αποκατάσταση των ασθενών μετά την AMMO, κατά τη μελέτη της επίδρασης χαρακτηριστικών των ασθενών και του μοσχεύματος, με μονοπαραγοντική ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι με στατιστικά σημαντικό τρόπο: α) η ηλικία >53 ετών σχετίζεται με πιο αργή αποκατάσταση της ουδετεροπενίας {D11 έναντι D10} και της θρομβοπενίας {D14 έναντι D13} και με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων {το 66,7% των ασθενών >53 ετών έναντι του 90,3% των ≤ 53 ετών}, β) στους ασθενείς με MM η αποκατάσταση της ουδετεροπενίας καθυστερεί περισσότερο {D11 (MM) έναντι D9 (LH) και D10 (NHL)}, ενώ στους ασθενείς με LH η αποκατάσταση της θρομβοπενίας είναι πιο ταχεία {D11 (LH), έναντι D14 (MM), και D15 (NHL)}, γ) οι πολύ καλοί κινητοποιητές σχετίζονται με ταχύτερη βραχυπρόθεσμη {D12 (πολύ καλοί) D14 (καλοί) και D15 (πτωχοί)} και μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων {το 96.6% των πολύ καλών έναντι του 62.5% των υπολοίπων} γ) η έγχυση >360 ml κυτταρικού προϊόντος σχετίζεται με καθυστέρηση της αποκατάστασης των αιμοπεταλίων τόσο βραχυπρόθεσμα {D13 έναντι D15} όσο και μακροπρόθεσμα {το 56% έναντι του 94,4% αυτών που έλαβαν ≤ 360 ml}, δ) η έγχυση >3 ασκών

κυτταρικού προϊόντος σχετίζεται με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων {το 56,3% έναντι του 86,7% όσων έλαβαν ≤ 3 }, και ε) η έγχυση $\leq 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ CD34+ κυττάρων ανά ασκό σχετίζεται με καθυστέρηση της βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων {D15 έναντι D12} και με υστέρηση στη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση {το 62,1% έναντι 93,8% του όσων έλαβαν $> 2,4 \times 10^6/\text{Kg}$ ανά ασκό}, στ) η «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg, σχετίζεται σημαντικά μόνο με τη βραχυπρόθεσμη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων {D18 (για $< 3 \times 10^6$), D15 (για $3-6 \times 10^6$) και D13 (για $> 6 \times 10^6$), ζ) η δόση των βιώσιμων και βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg, που εγχύεται στην AMMO, έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη βραχυπρόθεσμη όσο και με τη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση.

Ιδανική αιματολογική αποκατάσταση - όπως ορίστηκε στις μεθόδους -, είχαν 32 ασθενείς (το 52,5%). Κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση διαπιστώθηκαν οι παρακάτω παράμετροι ως στατιστικά σημαντικές για την επίτευξη ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης: η ηλικία, το νόσημα, η κινητική της κινητοποίησης, η βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής, η βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο προϊόν της συλλογής, ο συνολικός όγκος αποψυγμένου προϊόντος, ο αριθμός των CD34+/Kg ανά ασκό, η τελική συγκέντρωση των PLT στον ασκό και η δόση των βιώσιμων και των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg που εγχύθηκαν. Κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση δε, μόνο η αύξηση της δόσης των βιώσιμων ή των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg που εγχύθηκαν, σχετίστηκε και με στατιστικά και με κλινικά σημαντική αύξηση της πιθανότητας για ιδανική αιμοποιητική αποκατάσταση. Ως βέλτιστη ελάχιστη δόση για την επίτευξη ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης, βρέθηκαν τα $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (μέτρηση στο φρέσκο προϊόν), τα $3,4 \times 10^6$ βιώσιμων CD34+/Kg και τα $2,9 \times 10^6$ βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg.

Η μείωση των βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+ κυττάρων στα κρουκατεψυγμένα προϊόντα είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική διαφοροποίηση των «πραγματικών» δόσεων των AAK, που χορηγήθηκαν στην AMMO, σε σχέση με τις «προγραμματισμένες» δόσεις. Αναλυτικά, οι ασθενείς με «προγραμματισμένη» δόση CD34+/Kg: α) $< 3 \times 10^6$ έλαβαν τελικά $0,9 \times 10^6$ βιώσιμων μη αποπτωτικών

CD34+/Kg (διάμεση τιμή), β) $3-6 \times 10^6$ έλαβαν τελικά $1,1 \times 10^6$ CD34+/Kg και γ) $>6 \times 10^6$ CD34+/Kg έλαβαν τελικά $3,1 \times 10^6$ CD34+/Kg.

Συμπεράσματα:

Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση χαρακτηριστικών του ασθενή και του κρυσυντηρημένου προϊόντος με τη βιωσιμότητα των αποψυγμένων CD34+ κυττάρων, δικαιολογεί σε μεγάλο βαθμό τη διακύμανση των ποσοστών βιωσιμότητας, που παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων, και είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό της κρυσκατάψυξης (αραίωση και διανομή του προϊόντος σε ασκούς). Επιπλέον, «προγνωστικοί δείκτες βιωσιμότητας», γνωστοί πριν, κατά και μετά τη συλλογή των ΑΑΚ, μπορούν να κατευθύνουν την απόφαση για συλλογή επιπλέον CD34+/Kg ή για έλεγχο της βιωσιμότητας του μοσχεύματος πριν τη ΑΜΜΟ. Η ταχεία και ολοκληρωμένη αιματολογική αποκατάσταση στην ΑΜΜΟ επηρεάζεται επίσης στατιστικά σημαντικά από χαρακτηριστικά των ασθενών και του μοσχεύματος. Ο αριθμός των CD34+/Kg, όπως μετράται στο φρέσκο προϊόν συλλογής, σχετίζεται στατιστικά σημαντικά μόνο με την ημέρα βραχυπρόθεσμης αποκατάστασης των αιμοπεταλίων. Αντίθετα, ο αριθμός των βιώσιμων και βιώσιμων μη αποπτωτικών CD34+/Kg που εγχύεται στην ΑΜΜΟ, έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη βραχυπρόθεσμη όσο και με τη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση. Η πολυπαραγοντική ανάλυση κατέδειξε μόνο τον αριθμό των βιώσιμων ή των βιώσιμων μη αποπτωτικών κυττάρων/Kg ως στατιστικά και κλινικά σημαντική παράμετρο για την επίτευξη ιδανικής αιματολογικής αποκατάστασης. Επομένως, είναι προτιμότερο, η συλλογή των CD34+ κυττάρων να στοχεύει στον αριθμό που εξασφαλίζει ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, ο οποίος αντιπροσωπεύεται ακριβέστερα από τα βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα παρά από τον αριθμό των Cd34+ κυττάρων που μετράται στο φρέσκο προϊόν. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας του προς έγχυση κρυσυντηρημένου προϊόντος δεν είναι απαραίτητος υπό ιδανικές συνθήκες κρυσυντήρησης και απόψυξης. Είναι όμως δόκιμος όταν ο αριθμός των βιώσιμων CD34+/Kg προβλέπεται χαμηλότερος από τον ελάχιστο απαιτούμενο για ιδανική αιματολογική αποκατάσταση, βάση της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων του περιφερικού αίματος την ημέρα της συλλογής, της βιωσιμότητας των CD34+

κυττάρων στο φρέσκο προϊόν συλλογής και της τελικής συγκέντρωσης των PLT στον ασκό κρουκατάψυξης.

Καθώς η απόπτωση των κρυσυντηρημένων CD34+ κυττάρων οδηγεί σε επιπλέον μείωση της δόσης των CD34+/Kg, ενώ σε μπορεί να προβλεφθεί, πρέπει να συνεκτιμάται κατά την αξιολόγηση του προϊόντος. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας με τη μέθοδο με Trypan blue, προτείνεται μόνο ως μια ταχεία λύση σε ένα πρωταρχικό στάδιο ελέγχου, ενώ είναι ασφαλέστερο να συνοδεύεται με κυτταρομετρία ροής, ιδιαίτερα στις συλλογές με χαμηλό αριθμό CD34+/Kg.

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά ασθενών και κρυσυντηρημένων προϊόντων με στατιστικά σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα και στην «πραγματική» βιωσιμότητα των αποψυγμένων CD34+ κυττάρων (μονοπαραγοντική ανάλυση 15 παραμέτρων¹)

Χαρακτηριστικό		Διάμεση βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων (%)		Διάμεση «πραγματική» ² βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων (%)	
			<i>p</i>		<i>p</i>
Νόσημα	HL vs MM	~3	~3	56,3 vs 42	0,022
Χημειοθεραπεία στην κινητοποίηση	(-) vs (+)	17,3 vs 48,9	0,016	14,7 vs 33,6	0,037
Plerixafor στην κινητοποίηση	(-) vs (+)	51,1 vs 31,4	0,036	35,3 vs 23,3	0,026
%CD34+ περιφερικού αίματος	≤0,46 vs >0,46	32,7 vs 62,9	0,002	23,3 vs 43	0,001
% βιωσιμότητα CD34+ αίματος *	≤97,3 vs >97,3	24,1 vs 51,5	0,009*	21,5 vs 35,3	0,001*
% βιωσιμότητα CD34+ φρέσκου προϊόντος*	≤98,7 vs >98,7	40,9 vs 62,5	0,026*	26,4 vs 36	0,046*
CD45+/μl στον ασκό κρουκατάψυξης ⁴	≤132,4 vs >132,4	51,6 vs 40	0,043	33,6 vs 31,6	0,096
CD34+/μl στον ασκό κρουκατάψυξης	≤1354 vs >1354	39,2 vs 58,2	0,026	26,4 vs 36	0,046
PLT (×10 ³)/μl στον ασκό κρουκατάψυξης*	≤402 vs >402	60,7 vs 29,5	0,029*	35,7 vs 26,4	0,010*

¹ Φύλο, ηλικία, νόσημα, κατάσταση νόσου κατά τη συλλογή, σχήμα κινητοποίησης, χορήγηση Plerixafor, κινητική κινητοποίησης, ποσοστό CD34+ κυττάρων επί των CD45+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα την ημέρα συλλογής, βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα, διάρκεια συντήρησης προ κατάψυξης, βιωσιμότητα των CD34+ κυττάρων προ κατάψυξης, συγκέντρωση των CD45+, των CD34+, των PLT και των PMN στον ασκό κρουκατάψυξης, όγκος του προϊόντος στον ασκό, διάρκεια κρυσυντήρησης.

² Η βιωσιμότητα μετά την εξαίρεση του ποσοστού απόπτωσης

³ Μη στατιστικά σημαντικό

⁴ Σημαντική ήταν η διαφορά των αποπτωτικών CD34+ κυττάρων στα προϊόντα με PMN>24×10³/μl ή PMN≤24×10³/μl (3,4% έναντι 11,8%, αντίστοιχα, *p*=0,044).

*παρέμειναν στατιστικά σημαντικοί και μετά την πολυπαραγοντική ανάλυση

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Background: Rapid and complete hematologic reconstitution, following autologous hematopoietic stem cell (HSC) transplantation (Auto-HSCT), serves as an in vivo quality control for the clinical and laboratory Department of a Transplantation center. The decline of the cryopreserved products' viability necessitates a standardized viability assessment procedure with results that consistently correlate with patients' reconstitution kinetics.

Purpose: The purpose of this study was a) the investigation of the effect of cryopreservation on viability and apoptosis of CD34+ cells and their effect on the kinetics of hematologic reconstitution, β) the discrimination of the safest CD34+ viability and "true" viability assessment method between the two most widely used methods, and γ) the definition of the viable and viable non apoptotic CD34+ cells threshold dose for an ideal hematological reconstitution following auto-HSCT.

Material and Methods: Cryopreserved peripheral blood stem cell (PBSC) samples of 61 patients with hematologic malignancies - multiple myeloma (MM), Hodgkin lymphoma (HL), and non-Hodgkin lymphoma (NHL) - who had already undergone auto-HSCT, were retrospectively studied.

As far as cell viability is concerned, the samples were analyzed by two methods, namely: a) the Trypan Blue exclusion method (TB) and b) flow cytometry (FACS). The concurrent use of 7-AAD and Annexin-V allowed the discrimination between viable (7-AAD-/Annexin-V-), early apoptotic (7-AAD-/Annexin-V+) and necrotic cells (7-AAD+/Annexin-V+). Viable cells were defined as those not stained with Trypan Blue (method a) and those that were negative for 7-AAD (method b). True viable (viable non-apoptotic) cells were defined as those which were negative both for 7-ADD and Annexin-V.

As far as the effect on viability and "true" viability of CD34+ cells is concerned, patients' characteristics, mobilization parameters and cryopreserved products' characteristics, were investigated with univariate and multivariate analysis

(Table 1). As far as hematologic reconstitution kinetics are concerned, the following characteristics were investigated by univariate analysis: gender, age, disease, disease status at HSC collection, type of high dose therapy, mobilization kinetics, total volume infused product, total number of thawed bags, CD34+/Kg per bag, cryopreservation time-length, total number of CD34+/kg (as measured in the fresh product) and total number of viable and viable non apoptotic (true viable) CD34+/Kg infused. The viability of PB CD34+ cells on collection day, the viability of CD34+ cells in the fresh product and platelet (PLT) final concentration in the cryopreservation bag were also included as possible prognostic factors for ideal hematologic reconstitution in univariate and multivariate analysis.

“Planned” dose was defined as the dose of CD34+/Kg (as measured in the fresh product) that was infused. The day of short-term reconstitution was the first day following infusion, on which neutrophils exceeded 500/ μ l and the first day after three consecutive days (without transfusion) on which PLT exceeded 20×10^3 / μ l. Long-term reconstitution was achieved when neutrophils exceeded 1500/ μ l (the latest on D90) and 2000/ μ l (the latest on D180) and PLT exceed $\geq 140 \times 10^3$ / μ l (the latest on D180). Patients achieving ideal hematological reconstitution were defined as those having neutrophil counts ≥ 500 / μ l until D12 and ≥ 1500 / μ l until D30, and simultaneously, reaching PLT counts $\geq 20 \times 10^3$ / μ l until D14 and $\geq 140 \times 10^3$ / μ l the latest until D90.

Results: Among the 61 samples analyzed, the median value of: a) viable nucleated cells (TNC) was 55,3% (range 10-73%, measured by TB), b) viable CD45+ cells was 61,7% (range 7,5-81,4%, measured by FACS), c) viable CD34+ cells was 45,9% (range 0,6-88%), d) apoptotic CD45+ cells was 8,4% (range 0,5-34,3%), e) apoptotic CD34+ cells was 4,3% (range 0-44,9%), f) viable non apoptotic CD45+ cells was 52,9% (range 5,4-80,9%) and g) viable non apoptotic CD34+ cells was 32,2% (range 0,5-79,5%). The cryopreserved CD34+ cells showed a statistically significant lower viability than CD45+ cells (median difference -12,6%, $p < 0,0005$). TB method overestimated the % CD34+ cell viability in 70,3% of the samples.

As far as viability and “true” viability of CD34+ cells is concerned, 9 variables were found statistically significant in univariate analysis (table 1). In multivariate

analysis only the following 3 remained statistically significant: a) PB CD34+ cell viability on collection day ($p=0,020$ for viability and $p=0,036$, for “true” viability), b) CD34+ cell viability in the fresh product ($p=0,024$ και $p=0,006$, respectively) and c) PLT final concentration in the cryopreservation bag ($p=0,001$ και $p=0,004$, respectively).

As far as hematologic reconstitution is concerned, the univariate analysis disclosed that, with a statistical significance: a) age >53 years was associated with slower restoration of neutropenia {D11 vs D10} and thrombocytopenia {D14 vs D13} and with delayed long-term PLT reconstitution { 66,7% of patients >53 years vs 90,3% of those ≤ 53 years}, b) in patients with MM, restoration of neutropenia was delayed {D11 (MM) vs D9 (LH) and D10 (NHL)}, while in patients with HL restoration of thrombocytopenia was faster {D11 (LH), vs D14 (MM), and D15 (NHL)}, c) very good mobilizers were associated with faster short-term reconstitution {D12 (very good) D14 (good) και D15 (poor)} and long-term reconstitution of platelets {96.6% of very good mobilizers vs 62.5% of the remaining}, c) the infusion of >360 ml of cell product was associated with delayed short-term {D13 vs D15} as well as long-term PLT reconstitution { 56% vs 94,4% of those who received ≤ 360 ml}, d) the infusion of >3 bags of cell product was associated with delayed long-term PLT reconstitution { 56,3% vs 86,7% of those who were infused with ≤ 3 }, and e) the infusion $\leq 2,4 \times 10^6$ /Kg CD34+ cells per bag was associated with delayed short-term PLT reconstitution {D15 vs D12} and with delayed long-term hematologic reconstitution { 62,1% vs 96,3% of those who were infused with $>2,4 \times 10^6$ /Kg per bag}, f) the “planned” dose of CD34+/Kg, was significantly associated only with short-term PLT reconstitution {D18 (if $<3 \times 10^6$), D15 (if $3-6 \times 10^6$) και D13 (if $>6 \times 10^6$)}, g) the dose of viable and viable non apoptotic CD34+/Kg infused, was statistically significantly associated with short-term as well as long-term hematologic reconstitution.

Ideal hematologic reconstitution – as defined in methods - was achieved by 32 patients (52,5%). In univariate analysis the following parameters were found as statistically significant for ideal hematological reconstitution achievement: age, disease, mobilization kinetics, peripheral blood CD34+ cell viability on collection day, fresh product CD34+ cell viability, total volume of thawed product, CD34+/Kg per bag, PLT final concentration in the cryopreservation bag and the dose of viable and

viable non-apoptotic CD34+/Kg infused. In multivariate analysis, only higher doses of viable or viable non-apoptotic CD34+/Kg infused were associated with statistically and clinically significant higher probability for ideal hematological reconstitution. The threshold dose for ideal hematological reconstitution achievement was inferred as $6,9 \times 10^6$ CD34+/Kg (measured in fresh product), as $3,4 \times 10^6$ viable CD34+/Kg and as $2,9 \times 10^6$ viable non apoptotic CD34+/Kg.

The reduction of viable non-apoptotic CD34+ cells in the cryopreserved products had as a consequence the dramatic decline of “true” doses of CD34+ cells infused, compared to “planned” doses. Specifically, patients infused with “planned” doses of CD34+/Kg: a) $< 3 \times 10^6$ were actually infused with $0,9 \times 10^6$ viable non-apoptotic CD34+/Kg (median value), b) $3-6 \times 10^6$ were actually infused with $1,1 \times 10^6$ viable non-apoptotic CD34+/Kg and c) $> 6 \times 10^6$ CD34+/Kg were actually infused with $3,1 \times 10^6$ viable non-apoptotic CD34+/Kg.

Conclusions: The significant association of patients’ and cryopreserved products’ characteristics with the viability of thawed CD34+ cells, largely explains the observed variation of viability among different samples. Thus, these parameters should be taken into account during the cryopreservation procedure (product dilution and apportionment in the cryopreservation bags). Moreover, “prognostic indicators of viability” known before, during and after the HSC collection procedure, may direct the decision to extend the collection, aiming to a higher dose of CD34+/Kg or to test the cell viability of the frozen product prior to HSCT. Rapid and complete hematologic reconstitution in HSCT is also significantly affected by patients’ and cryopreserved products’ characteristics. The number of CD34+/Kg, as counted in the fresh product, is only statistically significantly associated with platelets’ short-term reconstitution. On the contrary, the number of viable and viable non-apoptotic CD34+/Kg infused proved as the only statistically and clinically significant factor for ideal hematologic reconstitution. Therefore, it seems preferable to target the dose of CD34+/Kg that ensures an ideal hematologic reconstitution, which in turn is accurately represented by the viable non-apoptotic CD34+ cells, rather than the number of CD34+ cells counted from freshly collected product. Viability assessment of the cryopreserved product to be infused is not necessary under ideal conditions of

cryopreservation and thawing. However, it is necessary, when the number of viable CD34+/Kg is expected lower than the threshold for ideal hematological reconstitution, based upon PB CD34+ cell viability, CD34+ cell viability in the fresh product and PLT concentration in the cryopreservation bag. While cryopreserved CD34+ cells' apoptosis leads to further CD34/Kg dose reduction, and it can't be predicted, it should be co-evaluated during the product's viability estimation. Trypan blue exclusion method is only recommended as a rapid alternative at the first step of viability assessment process, which is safer to be accompanied by FACS, especially for products with low number of CD34+/Kg.

Table 1 Patients' and products' characteristics with statistically significant association to viability and "true" viability of thawed CD34+ cells (univariate analysis with 15 factors¹)

Characteristic		Median viability of CD34+ cells (%)		Median "true" ² viability of CD34+ cells (%)	
				<i>p</i>	<i>p</i>
Disease	HL vs MM	- ³	- ³	56,3 vs 42	0,022
Chemotherapy at mobilization	(-) vs (+)	17,3 vs 48,9	0,016	14,7 vs 33,6	0,037
Plerixafor at mobilization	(-) vs (+)	51,1 vs 31,4	0,036	35,3 vs 23,3	0,026
%CD34+ (PB)	≤0,46 vs >0,46	32,7 vs 62,9	0,002	23,3 vs 43	0,001
% viability CD34+ (PB) *	≤97,3 vs >97,3	24,1 vs 51,5	0,009*	21,5 vs 35,3	0,001*
% viability CD34+ (fresh product) *	≤98,7 vs >98,7	40,9 vs 62,5	0,026*	26,4 vs 36	0,046*
CD45+/μl in cryopreservation bag ⁴	≤132,4 vs >132,4	51,6 vs 40	0,043	33,6 vs 31,6	0,096
CD34+/μl in cryopreservation bag	≤1354 vs >1354	39,2 vs 58,2	0,026	26,4 vs 36	0,046
PLT (×10 ³)/μl in cryopreservation bag ⁴	≤402 vs >402	60,7 vs 29,5	0,029*	35,7 vs 26,4	0,010*

¹ Gender, age, disease, disease status on collection day, mobilization regimen, Plerixafor, kinetics of mobilization, PB % CD34+ of CD45+ on collection day, PB CD34+ cell viability, duration of preservation before freezing, CD34+ cell viability of fresh product, concentration of CD45+, CD34+, PLT and PMN in the cryopreservation bag, product's volume in the cryopreservation bag, cryopreservation time-length.

² cell viability following the exclusion of apoptosis

³ Non statistically significant

⁴ The different percentage of apoptotic CD34+ cells in products with PMN>24x10³/μl ή PMN≤24x10³/μl was significant (3,4% vs 11,8%, respectively, p=0,044).

*remained statistically significant in multivariate analysis

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Ένα ταξίδι δέκα ετών ολοκληρώνεται, έχοντας αποκομίσει τεράστια γνώση και εμπειρία. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι σημαντικά σε πρακτικό επίπεδο και μπορούν να συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση των εργαστηριακών πρακτικών όσο αφορά την ΑΜΜΟ. Ταυτόχρονα έχουν δώσει γένεση σε πολλά ερωτήματα που θα διερευνηθούν προοπτικά. Το ταξίδι λοιπόν δεν τελειώνει

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ

1. Wasnik S, Tiwari A, Kirkland MA, Pande G. Osteohematopoietic stem cell niches in bone marrow. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:95-133.
2. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res.* 2003;34(6):476-88.
3. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Comp Physiol.* 1963;62:327-36.
4. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 1990;110(4):1001-20.
5. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development.* 1989;106(4):619-33.
6. Lacaud G, Robertson S, Palis J, Kennedy M, Keller G. Regulation of hemangioblast development. *Ann NY Acad Sci.* 2001;938:96-107; discussion 8.
7. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:759-806.
8. Boisset JC, Robin C. On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy. *Stem Cell Res.* 2012;8(1):1-13.
9. Mohle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood.* 1997;89(1):72-80.
10. Πάγκαλης ΓΑ. Μορφολογία, φυσιολογία και διαφοροποίηση ιστών και κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος. *ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ: Π.Χ Πασχαλίδης; 2008. p. 3-59.*
11. Zhong JF, Zhao Y, Sutton S, Su A, Zhan Y, Zhu L, et al. Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(7):2448-53.
12. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation.* 1979;14(1-2):23-34.

13. 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(4):267-88.
14. Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood*. 1998;92(2):345-7; discussion 52.
15. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, et al. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest*. 1988;81(3):951-5.
16. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother*. 1992;1(2):115-29.
17. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother*. 1993;2(2):137-44.
18. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1195-201.
19. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105(7):2631-9.
20. Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*. 2011;117(20):5281-8.
21. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001;97(8):2293-9.
22. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:35-71.
23. Angelopoulou MK, Tsirkinidis P, Boutsikas G, Vassilakopoulos TP, Tsirigotis P. New insights in the mobilization of hematopoietic stem cells in lymphoma and multiple myeloma patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:835138.
24. Tsirkinidis P, Terpos E, Boutsikas G, Papatheodorou A, Anargyrou K, Lalou E, et al. Bone metabolism markers and angiogenic cytokines as regulators of human hematopoietic stem cell mobilization. *J Bone Miner Metab*. 2018;36(4):399-409.

25. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106(6):1901-10.
26. Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med*. 2005;202(11):1599-611.
27. Hematopoietic Progenitor Cells: A Primer for Medical Professionals: American Association of Blood Banks; 2000.
28. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570-83.
29. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
30. Wyllie AH. Cell Death - Apoptosis and Necrosis. 2001. In: Apoptosis and Cell Proliferation [Internet]. 2nd Edition. [2-4].
31. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):5-17.
32. Martin SJ, Henry CM. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. *Methods*. 2013;61(2):87-9.
33. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
34. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res*. 2018;28(1):9-21.
35. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.
36. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
37. Μαργαρίτης Λ. Χ. ΓΒΚ, Κεραμάρης Κ.Ε, Μαρίνος Ε.Σ, Παπασιδέρη Ι.Σ, Στραβοπόδης Δ.Ι, Τρουγκάκος Ι.Π. Προγραμματισμένος κυτταρικός Θάνατος - Απόπτωση. *Βιολογία Κυττάρου: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας*; 2004. p. 917-33.

38. Alberts B. JA, Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Apoptosis. 2008. In: Molecular Biology of the Cell [Internet]. Garland science, Taylor & Francis Group. 5th Edition. [1115-29].
39. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? Trends Cell Biol. 1998;8(7):267-71.
40. Desoutter J, Ossart C, Lacassagne MN, Regnier A, Marolleau JP, Harrivel V. Cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cell CD34-induced apoptosis through caspase pathway activation: Key role of granulocytes. Cytotherapy. 2019;21(6):612-8.
41. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J Cell Biol. 1999;144(2):281-92.
42. Γ.Ν Θ. Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος: University Studio Press; 2014.
43. Apoptosis Handbook.
44. Gong YN, Crawford JC, Heckmann BL, Green DR. To the edge of cell death and back. FEBS J. 2019;286(3):430-40.
45. Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour L, Cui Z. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. Biotechnol Prog. 2010;26(3):827-37.
46. Henry CM, Hollville E, Martin SJ. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. Methods. 2013;61(2):90-7.
47. Balasubramanian K, Mirnikjoo B, Schroit AJ. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. J Biol Chem. 2007;282(25):18357-64.
48. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med. 1995;182(5):1545-56.

49. Savitskaya MA, Onishchenko GE. Apoptosis in Cryopreserved Eukaryotic Cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(5):445-52.
50. Leibo SP, Farrant J, Mazur P, Hanna MG, Jr., Smith LH. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. *Cryobiology*. 1970;6(4):315-32.
51. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970;168(3934):939-49.
52. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984;247(3 Pt 1):C125-42.
53. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 1977;14(3):251-72.
54. Ε. Π. Θερμοδυναμική των επιφανειών και διεπιφανιών. Σημειώσεις για το κατ' επιλογήν μάθημα: Φυσική επιφανειών & εφαρμογές, Θεσσαλονίκη: Τμήμα Φυσικής Α.Π.Θ. - Τομέας Φυσικής Στερεάς Κατάστασης; 2006.
55. Farrant J, Walter CA, Lee H, McGann LE. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology*. 1977;14(3):273-86.
56. Farrant J, Walter CA, Lee H, Morris GJ, Clarke KJ. Structural and functional aspects of biological freezing techniques. *J Microsc*. 1977;111(1):17-34.
57. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90-6.
58. Stroh C, Cassens U, Samraj A, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *FASEB J*. 2002;16(12):1651-3.
59. Sarkar S, Kalia V, Montelaro RC. Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4+ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing. *Cryobiology*. 2003;47(1):44-58.

60. Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS, Rufaihah AJ, Yang Z, et al. Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *J Biomed Sci.* 2006;13(3):433-45.
61. Tang HL, Tang HM, Mak KH, Hu S, Wang SS, Wong KM, et al. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell.* 2012;23(12):2240-52.
62. Sun G, Guzman E, Balasanyan V, Conner CM, Wong K, Zhou HR, et al. A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death. *J Cell Biol.* 2017;216(10):3355-68.
63. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother.* 1996;5(3):213-26.
64. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015;111:A3 B 1-A3 B
65. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods.* 2000;243(1-2):167-90.
66. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry.* 1998;34(2):61-70.
67. Keeney M, Sutherland DR. Stem cell enumeration by flow cytometry: current concepts and recent developments in CD34+ cell enumeration. *Cytotherapy.* 2000;2(5):395-402.
68. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 1998;31(1):1-9.
69. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-20.

70. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.
71. Mitchell R, Wagner JE, Brunstein CG, Cao Q, McKenna DH, Lund TC, et al. Impact of long-term cryopreservation on single umbilical cord blood transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):50-4.
72. Humpe A, Beck C, Schoch R, Kneba M, Horst HA. Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34+ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. *Transfusion*. 2005;45(7):1208-13.
73. Kim KM, Huh JY, Hong SS, Kang MS. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage. *Transfusion*. 2015;55(8):2017-22.
74. Lee YH, Koh H, Nam E, Kim YJ. Cryopreserved cord blood mononuclear cells in DMSO are healthy for at least 6 hours after thawing. *Transfus Apher Sci*. 2019:102603.
75. Liu R, Klich I, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK. Erythrocyte-derived microvesicles may transfer phosphatidylserine to the surface of nucleated cells and falsely 'mark' them as apoptotic. *Eur J Haematol*. 2009;83(3):220-9.
76. Duggleby RC, Querol S, Davy RC, Fry LJ, Gibson DA, Horton RB, et al. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion*. 2012;52(3):549-59.
77. Laerd Statistics. Statistical tutorials and software guides. 2015 [Available from: <https://statistics.laerd.com/>].
78. Siena S, Bregni M, Di Nicola M, Ravagani F, Peccatori F, Gandola L, et al. Durability of hematopoiesis following autografting with peripheral blood hematopoietic progenitors. *Ann Oncol*. 1994;5(10):935-41.
79. Jones RJ, Celano P, Sharkis SJ, Sensenbrenner LL. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood*. 1989;73(2):397-401.
80. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Handbook for Clinicians. 2nd Edition ed. Bethesda, MD: AABB; 2015.

81. Lee S, Kim S, Kim H, Baek EJ, Jin H, Kim J, et al. Post-thaw viable CD34(+) cell count is a valuable predictor of haematopoietic stem cell engraftment in autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 2008;94(2):146-52.
82. Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E, Pearce R, Fielding A, Devereux S, et al. Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol.* 1997;15(2):535-46.
83. Watts MJ, Linch DC. Peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 1997;73(3):135-42.
84. Zubair A, Zahrieh D, Daley H, Schott D, Gribben JG, Freedman A, et al. Early neutrophil engraftment following autologous BMT provides a functional predictor of long-term hematopoietic reconstitution. *Transfusion.* 2003;43(5):614-21.
85. Rosenthal NS, Farhi DC. Failure to engraft after bone marrow transplantation: bone marrow morphologic findings. *Am J Clin Pathol.* 1994;102(6):821-4.
86. Bentley SA, Brecher ME, Powell E, Serody JS, Wiley JM, Shea TC. Long-term engraftment failure after marrow ablation and autologous hematopoietic reconstitution: differences between peripheral blood stem cell and bone marrow recipients. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19(6):557-63.
87. Tricot G, Jagannath S, Vesole D, Nelson J, Tindle S, Miller L, et al. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood.* 1995;85(2):588-96.
88. Gertz MA, Lacy MQ, Inwards DJ, Pineda AA, Chen MG, Gastineau DA, et al. Factors influencing platelet recovery after blood cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20(5):375-80.
89. Klaus J, Herrmann D, Breitzkreutz I, Hegenbart U, Mazitschek U, Egerer G, et al. Effect of CD34 cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2007;78(1):21-8.

90. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, et al. 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;86(10):3961-9.
91. Yamaguchi J, Chinen Y, Takimoto-Shimomura T, Nagata H, Muramatsu A, Kuriyama K, et al. Prediction of delayed platelet engraftment after autologous stem cell transplantation for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(14):3434-41.
92. Jiang L, Malik S, Litzow M, Gastineau D, Micallef I, Roy V, et al. Hematopoietic stem cells from poor and good mobilizers are qualitatively equivalent. *Transfusion*. 2012;52(3):542-8.
93. Duggan PR, Guo D, Luider J, Auer I, Klassen J, Chaudhry A, et al. Predictive factors for long-term engraftment of autologous blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26(12):1299-304.
94. Felix O, Tunes G, Ginani VC, Simoes PC, Barros DP, Delbuono E, et al. The influence of cell concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018;40(3):233-9.
95. Reich-Slotky R, Bachegowda LS, Ancharski M, Gergis U, van Besien K, Cushing MM. Engraftment for CD34 selected stem cell products is not compromised by cryopreservation. *Transfusion*. 2016;56(4):893-8.
96. Rohner N, Passweg JR, Tsakiris DA, Halter JP, Heim D, Buser AS, et al. The value of the post-thaw CD34+ count with and without DMSO removal in the setting of autologous stem cell transplantation. *Transfusion*. 2019;59(3):1052-60.
97. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol*. 1995;13(10):2547-55.
98. Stewart DA, Guo D, Luider J, Auer I, Klassen J, Ching E, et al. Factors predicting engraftment of autologous blood stem cells: CD34+ subsets inferior to the total CD34+ cell dose. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(12):1237-43.

99. Nagayama T, Ashizawa M, Ikeda T, Kawaguchi SI, Toda Y, Ito S, et al. Factors that predict delayed platelet recovery after autologous stem cell transplantation for lymphoma or myeloma. *Ann Hematol.* 2020.
100. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M, et al. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29(12):967-72.
101. Hoffmann S, Zhou L, Gu Y, Davenport R, Cooling L. Delayed platelet engraftment in group O patients after autologous progenitor cell transplantation. *Transfusion.* 2005;45(6):885-95.
102. Ergene U, Cagirgan S, Pehlivan M, Yilmaz M, Tombuloglu M. Factors influencing engraftment in autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation (PBSCT). *Transfus Apher Sci.* 2007;36(1):23-9.
103. Olivieri A, Offidani M, Montanari M, Ciniero L, Cantori I, Ombrosi L, et al. Factors affecting hemopoietic recovery after high-dose therapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a single center experience. *Haematologica.* 1998;83(4):329-37.
104. Faucher C, Le Corroller AG, Chabannon C, Viens P, Stoppa AM, Bouabdallah R, et al. Autologous transplantation of blood stem cells mobilized with filgrastim alone in 93 patients with malignancies: the number of CD34+ cells reinfused is the only factor predicting both granulocyte and platelet recovery. *J Hematother.* 1996;5(6):663-70.
105. Nath K, Boles R, McCutchan A, Vangaveti V, Birchley A, Irving I. The relationship between CD34+ stem cell dose and time to neutrophil recovery in autologous haematopoietic stem cell recipients-A single centre experience. *Transfus Apher Sci.* 2018;57(4):532-6.
106. Jansen EM, Hanks SG, Terry C, Akard LP, Thompson JM, Dugan MJ, et al. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit-granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion.* 2007;47(5):817-23.
107. Abrahamsen JF, Wentzel-Larsen T, Bruserud O. Autologous transplantation: the viable transplanted CD34+ cell dose measured post-thaw does not predict engraftment

kinetics better than the total CD34+ cell dose measured pre-freeze in patients that receive more than 2×10^6 CD34+ cells/kg. *Cytotherapy*. 2004;6(4):356-62.

108. Feugier P, Bensoussan D, Girard F, Alla F, Schuhmacher A, Latger-Cannard V, et al. Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34+ cells. *Transfusion*. 2003;43(7):878-84.

109. Schwella N, Siegert W, Beyer J, Rick O, Zingsem J, Eckstein R, et al. Autografting with blood progenitor cells: predictive value of preapheresis blood cell counts on progenitor cell harvest and correlation of the reinfused cell dose with hematopoietic reconstitution. *Ann Hematol*. 1995;71(5):227-34.

110. Beaujean F, Bourhis JH, Bayle C, Jouault H, Divine M, Rieux C, et al. Successful cryopreservation of purified autologous CD34+ cells: influence of freezing parameters on cell recovery and engraftment. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22(11):1091-6.

111. Limat S, Woronoff-Lemsi MC, Milpied N, Chartrin I, Ifrah N, Deconinck E, et al. Effect of cell determinant (CD)34+ cell dose on the cost and consequences of peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma patients in front-line therapy. *Eur J Cancer*. 2000;36(18):2360-7.

112. Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34(+) cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol*. 1999;17(4):1227.

113. Kiss JE, Rybka WB, Winkelstein A, deMagalhaes-Silverman M, Lister J, D'Andrea P, et al. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(4):303-10.

114. Stewart DA, Guo D, Luider J, Auer I, Klassen J, Morris D, et al. The CD34+90+ cell dose does not predict early engraftment of autologous blood stem cells as well as the total CD34+ cell dose. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(4):435-40.

115. Stiff PJ, Micallef I, Nademanee AP, Stadtmauer EA, Maziarz RT, Bolwell BJ, et al. Transplanted CD34(+) cell dose is associated with long-term platelet count recovery following autologous peripheral blood stem cell transplant in patients with non-Hodgkin lymphoma or multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(8):1146-53.

116. Sari T, Yuksel MK, Topcuoglu P, Tol M, Ayyildiz E, Ozcan M, et al. The effect of CD34 count and clonogenic potential of hematopoietic stem cells on engraftment. *Transfus Apher Sci.* 2010;43(3):315-20.
117. Hicks C, Wong R, Manoharan A, Kwan YL. Viable CD34+/CD133+ blood progenitor cell dose as a predictor of haematopoietic engraftment in multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Ann Hematol.* 2007;86(8):591-8.
118. Weaver CH, Potz J, Redmond J, Tauer K, Schwartzberg LS, Kaywin P, et al. Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell content. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19(11):1103-10.
119. Beguin Y, Baudoux E, Sautois B, Fraipont V, Schaaf-Lafontaine N, Pereira M, et al. Hematopoietic recovery in cancer patients after transplantation of autologous peripheral blood CD34+ cells or unmanipulated peripheral blood stem and progenitor cells. *Transfusion.* 1998;38(2):199-208.
120. Sauter CS, Giralt S. The prognostic impact of peripheral blood progenitor cell dose following high-dose therapy and autologous stem cell transplant for hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(6):1619-25.
121. Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother.* 1992;1(4):329-41.
122. Haas R, Mohle R, Fruhauf S, Goldschmidt H, Witt B, Flentje M, et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood.* 1994;83(12):3787-94.
123. Perez-Simon JA, Martin A, Caballero D, Corral M, Nieto MJ, Gonzalez M, et al. Clinical significance of CD34+ cell dose in long-term engraftment following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(12):1279-83.
124. van der Wall E, Richel DJ, Holtkamp MJ, Slaper-Cortenbach IC, van der Schoot CE, Dalesio O, et al. Bone marrow reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of graft size. *Ann Oncol.* 1994;5(9):795-802.

125. Jillella AP, Ustun C. What is the optimum number of CD34+ peripheral blood stem cells for an autologous transplant? *Stem Cells Dev.* 2004;13(6):598-606.
126. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood.* 1991;77(2):400-9.
127. Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, et al. Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 1995;13(8):1922-32.
128. Ojeda-Urbe M, Sovalat H, Bourderont D, Brunot A, Marr A, Lewandowski H, et al. Peripheral blood and BM CD34+ CD38- cells show better resistance to cryopreservation than CD34+ CD38+ cells in autologous stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2004;6(6):571-83.
129. Henon P, Sovalat H, Becker M, Arkam Y, Ojeda-Urbe M, Raidot JP, et al. Primordial role of CD34+ 38- cells in early and late trilineage haemopoietic engraftment after autologous blood cell transplantation. *Br J Haematol.* 1998;103(2):568-81.
130. Robinson SN, Freedman AS, Neuberg DS, Nadler LM, Mauch PM. Loss of marrow reserve from dose-intensified chemotherapy results in impaired hematopoietic reconstitution after autologous transplantation: CD34(+), CD34(+)/38(-), and week-6 CAFC assays predict poor engraftment. *Exp Hematol.* 2000;28(12):1325-33.
131. Millar BC, Millar JL, Shepherd V, Blackwell P, Porter H, Cunningham D, et al. The importance of CD34+/CD33- cells in platelet engraftment after intensive therapy for cancer patients given peripheral blood stem cell rescue. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(5):469-75.
132. Feng R, Shimazaki C, Inaba T, Takahashi R, Hirai H, Kikuta T, et al. CD34+/CD41a+ cells best predict platelet recovery after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21(12):1217-22.
133. Camacho Villa AY, Reyes Maldonado E, Montiel Cervantes LA, Vela Ojeda J. CD133+CD34+ and CD133+CD38+ blood progenitor cells as predictors of platelet engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2012;46(3):239-44.

134. Sartor MM, Garvin F, Antonenas V, Bradstock KF, Gottlieb DJ. Failure to achieve a threshold dose of CD34+ CD110+ progenitor cells in the graft predicts delayed platelet engraftment after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40(9):851-7.
135. Shimazaki C, Sumikuma T, Inaba T. CD34+ CD90+ cells and late hematopoietic reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma.* 2004;45(4):661-8.
136. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
137. Tennant JR. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation.* 1964;2:685-94.
138. Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, Mourao FA, Massensini AR, Martins-Filho OA, et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(4):307-15.
139. Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion.* 2000;40(6):693-6.
140. Varan HD, Bay M, Ozturk A, Dalva K, Ilhan O. Comparison of the methods evaluating post thawing viability of peripheral blood stem cell graft. *Transfus Apher Sci.* 2019;58(2):192-5.
141. Reich-Slotky R, Makhani SS, Vasovic LV, Pearse RN, Rossi A, Philips A, et al. Comparison of time to engraftment between autologous patients receiving washed versus non-washed cryopreserved peripheral blood stem cell products. *Leuk Lymphoma.* 2018;59(12):2829-35.
142. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1992;13(8):795-808.
143. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O, Gjertsen BT. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29(2):165-71.

144. Logue SE, Elgendy M, Martin SJ. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat Protoc.* 2009;4(9):1383-95.
145. Schuurhuis GJ, Muijen MM, Oberink JW, de Boer F, Ossenkoppele GJ, Broxterman HJ. Large populations of non-clonogenic early apoptotic CD34-positive cells are present in frozen-thawed peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(5):487-98.
146. de Boer F, Drager AM, Pinedo HM, Kessler FL, Monnee-van Muijen M, Weijers G, et al. Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34+ cells in frozen-thawed stem cell grafts. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(6):951-63.
147. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion.* 2002;42(12):1573-80.
148. Marinelli Busilacchi E, Costantini A, Mancini G, Bencivenga R, Olivieri J, Battaglini G, et al. A novel method to evaluate prethawing viability of cryopreserved CD34+ hematopoietic stem cells for autologous transplantation. *Transfusion.* 2020;60(7):1529-35.
149. Wu L, Al-Hejazi A, Filion L, Ben R, Halpenny M, Yang L, et al. Increased apoptosis in cryopreserved autologous hematopoietic progenitor cells collected by apheresis and delayed neutrophil recovery after transplantation: a nested case-control study. *Cytotherapy.* 2012;14(2):205-14.
150. Abrahamsen JF, Rusten L, Bakken AM, Bruserud O. Better preservation of early hematopoietic progenitor cells when human peripheral blood progenitor cells are cryopreserved with 5 percent dimethylsulfoxide instead of 10 percent dimethylsulfoxide. *Transfusion.* 2004;44(5):785-9.
151. Reich-Slotky R, Colovai AI, Semidei-Pomales M, Patel N, Cairo M, Jhang J, et al. Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. *Vox Sang.* 2008;94(4):351-7.
152. Roskopf K, Ragg SJ, Worel N, Gromme M, Preijers FW, Braakman E, et al. Quality controls of cryopreserved haematopoietic progenitor cells (peripheral blood, cord blood, bone marrow). *Vox Sang.* 2011;101(3):255-75.

153. Korbling M, Branham C. Quality control in stem cell processing for autotransplantation. *Transfus Sci.* 1993;14(1):101-4.
154. Abbruzzese L, Agostini F, Durante C, Toffola RT, Rupolo M, Rossi FM, et al. Long term cryopreservation in 5% DMSO maintains unchanged CD34(+) cells viability and allows satisfactory hematological engraftment after peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 2013;105(1):77-80.
155. Fritsch G, Frank N, Dmytrus J, Frech C, Pichler H, Witt V, et al. Relevance of flow cytometric enumeration of post-thaw leucocytes: influence of temperature during cell staining on viable cell recovery. *Vox Sang.* 2016;111(2):187-96.
156. Fernyhough LJ, Buchan VA, McArthur LT, Hock BD. Relative recovery of haematopoietic stem cell products after cryogenic storage of up to 19 years. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(1):32-5.
157. Lee HR, Song EY, Shin S, Roh EY, Yoon JH, Kim BJ. Quality of cord blood cryopreserved for up to 5 years. *Blood Res.* 2014;49(1):54-60.
158. Lalou E MG, Dimitrakopoulou A, Gkasouka P, Triantafyllou E-F., Efstathopoulou M., Konstantinou I., Galopoulos D., Asimakopoulos J.V., Petsa P., Benekou A., Siakantaris M.P., Tsourouflis G., Kafasi N., Vassilakopoulos T.P., Konstantopoulos K., Angelopoulou M.K. The effect of cryopreservation on the viability and apoptosis of hematopoietic stem cells: reappraisal by a single center experience. *Haema Journal.* Accepted on 7th December 2020.
159. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2002;20(1):5-13.
160. Mitrus I, Smagur A, Fidyk W, Czech M, Prokop M, Chwieduk A, et al. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% and 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation: results of a prospective, randomized study. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(3):274-80.
161. Smagur A, Mitrus I, Ciomber A, Panczyniak K, Fidyk W, Sados-Wojciechowska M, et al. Comparison of the cryoprotective solutions based on human albumin vs. autologous plasma: its effect on cell recovery, clonogenic potential of peripheral blood hematopoietic progenitor cells and engraftment after autologous transplantation. *Vox Sang.* 2015;108(4):417-24.

162. Hunt CJ. Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transfus Med Hemother*. 2011;38(2):107-23.
163. Fowke KR, Behnke J, Hanson C, Shea K, Cosentino LM. Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*. 2000;244(1-2):139-44.
164. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J*. 2000;41(4):187-96.
165. Kurita N, Frassoni F, Chiba S, Podesta M. Impact of length of cryopreservation and origin of cord blood units on hematologic recovery following cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(6):818-21.
166. Pavlu J, Auner HW, Szydlo RM, Sevillano B, Palani R, O'Boyle F, et al. Analysis of hematopoietic recovery after autologous transplantation as method of quality control for long-term progenitor cell cryopreservation. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(12):1599-601.
167. Schmidt-Mende J, Hellstrom-Lindberg E, Joseph B, Zhivotovsky B. Freezing induces artificial cleavage of apoptosis-related proteins in human bone marrow cells. *J Immunol Methods*. 2000;245(1-2):91-4.
168. de Boer F, Drager AM, Pinedo HM, Kessler FL, van der Wall E, Jonkhoff AR, et al. Extensive early apoptosis in frozen-thawed CD34-positive stem cells decreases threshold doses for haematological recovery after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29(3):249-55.
169. Pettengell R, Woll PJ, O'Connor DA, Dexter TM, Testa NG. Viability of haemopoietic progenitors from whole blood, bone marrow and leukapheresis product: effects of storage media, temperature and time. *Bone Marrow Transplant*. 1994;14(5):703-9.
170. Ruiz-Arguelles GJ, Ruiz-Arguelles A, Perez-Romano B, Marin-Lopez A, Larregina-Diez A, Apreza-Molina MG. Filgrastim-mobilized peripheral-blood stem cells can be stored at 4 degrees and used in autografts to rescue high-dose chemotherapy. *Am J Hematol*. 1995;48(2):100-3.
171. Lanza F, Mangianti S, Accorsi P, Lombardini L, Martino M, Saccardi R, et al. Manipulation, and cryopreservation of autologous peripheral blood stem cell products in

Italy: A survey by GITMO, SIDEM and GIIMA societies. *Transfus Apher Sci.* 2020;59(2):102753.

172. Donmez A, Cagirgan S, Saydam G, Tombuloglu M. Overnight refrigerator storage of autologous peripheral progenitor stem cells without cryopreservation. *Transfus Apher Sci.* 2007;36(3):313-9.

173. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood.* 1994;83(9):2731-6.

174. Cabezudo E, Dalmases C, Ruz M, Sanchez JA, Torrico C, Sola C, et al. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. *Transfusion.* 2000;40(10):1223-7.

175. Martin-Henao GA, Torrico C, Azqueta C, Amill B, Querol S, Garcia J. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells from apheresis at high cell concentrations does not impair the hematopoietic recovery after transplantation. *Transfusion.* 2005;45(12):1917-24.

176. Alencar S, Gamica M, Luiz RR, Nogueira CM, Borojevic R, Maiolino A, et al. Cryopreservation of peripheral blood stem cell: the influence of cell concentration on cellular and hematopoietic recovery. *Transfusion.* 2010;50(11):2402-12.

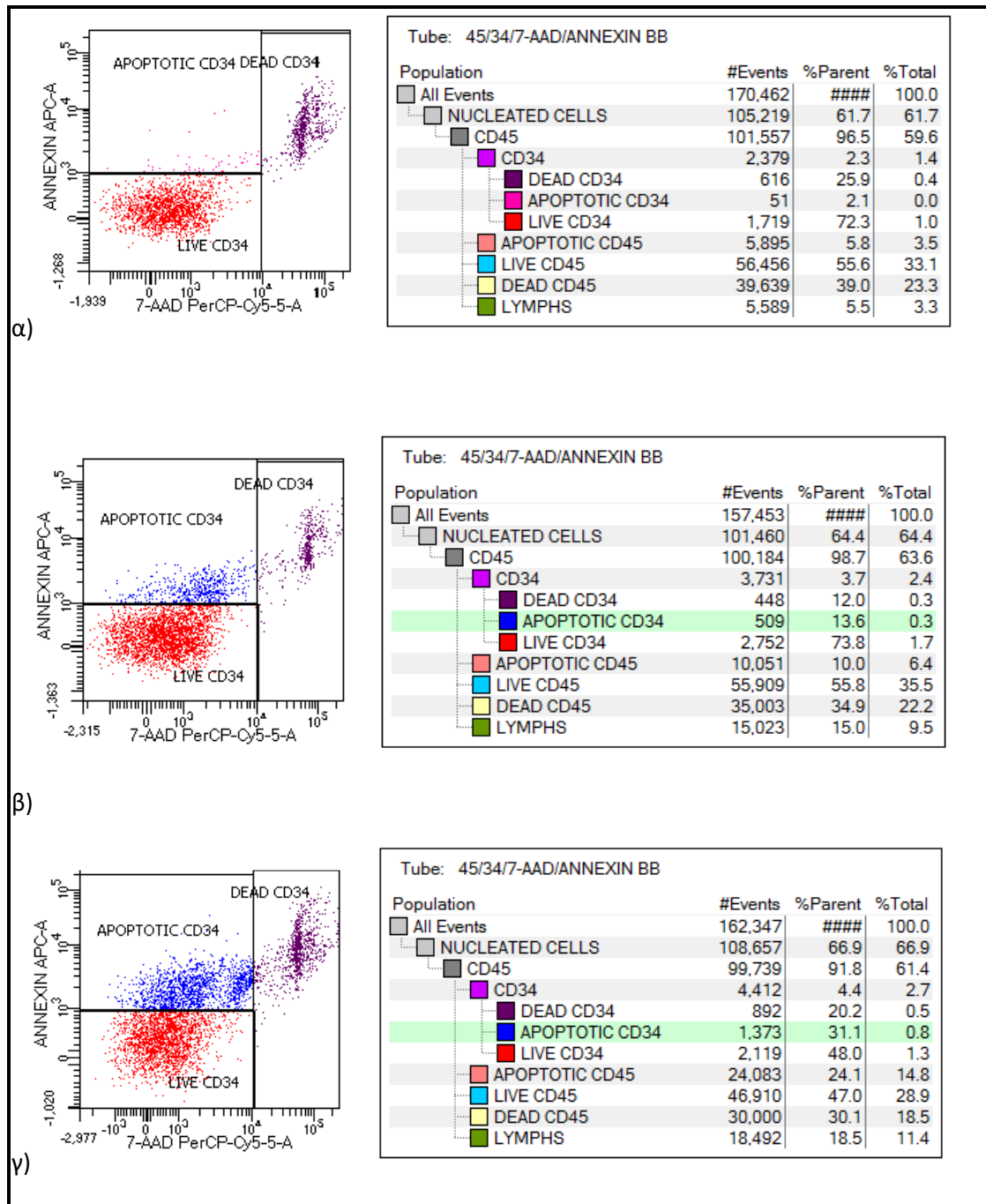
177. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larratt L, McGann LE. Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35(9):881-7.

178. D'Rozario J, Parisotto R, Stapleton J, Gidley A, Owen D. Pre infusion, post thaw CD34+ peripheral blood stem cell enumeration as a predictor of haematopoietic engraftment in autologous haematopoietic cell transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2014;50(3):443-50.

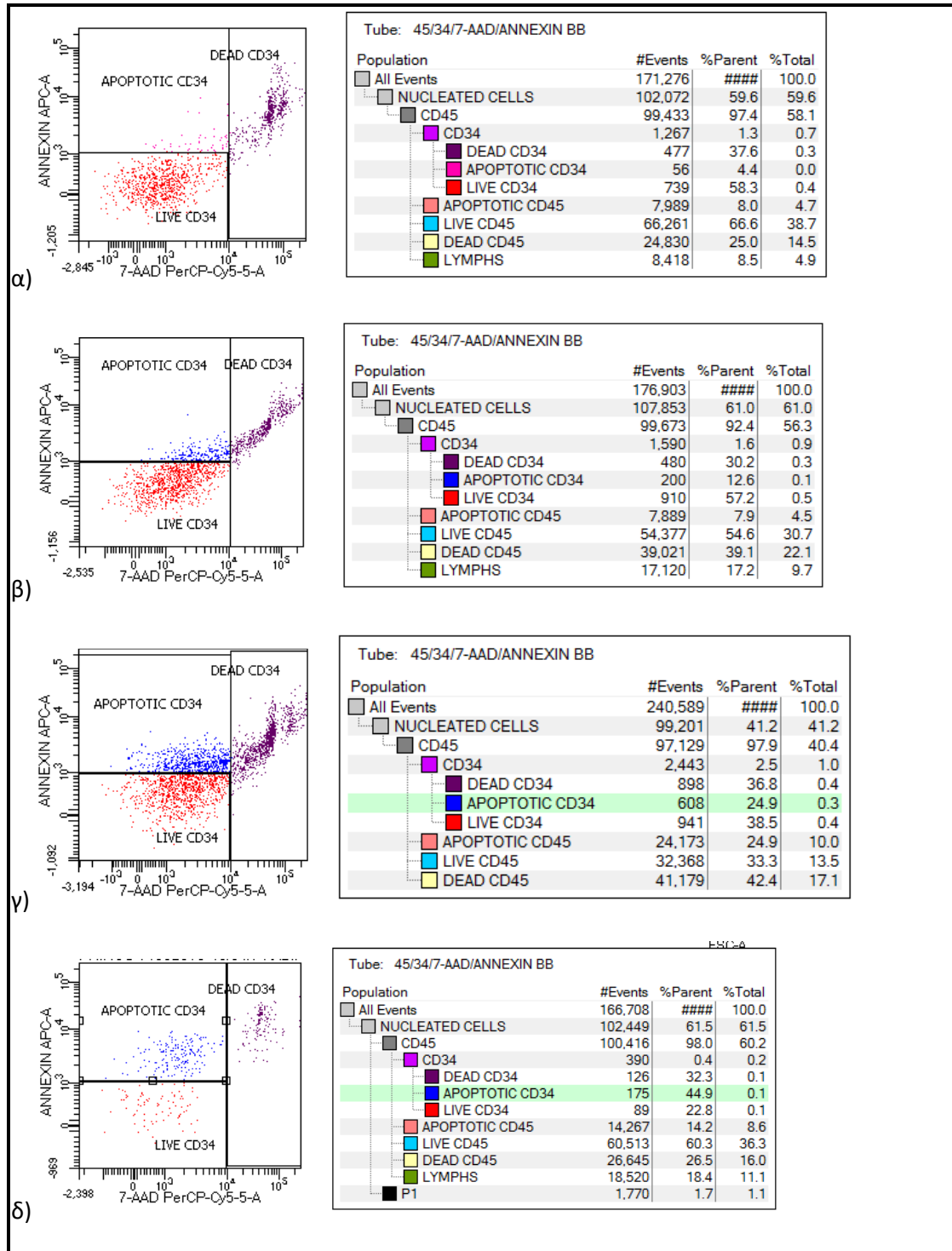
179. Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, Rowley S, Weaver C, Lilleby K, et al. Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *Br J Haematol.* 1994;87(4):825-31.

180. Pecora AL, Preti RA, Gleim GW, Jennis A, Zahos K, Cantwell S, et al. CD34+CD33- cells influence days to engraftment and transfusion requirements in autologous blood stem-cell recipients. *J Clin Oncol.* 1998;16(6):2093-104.

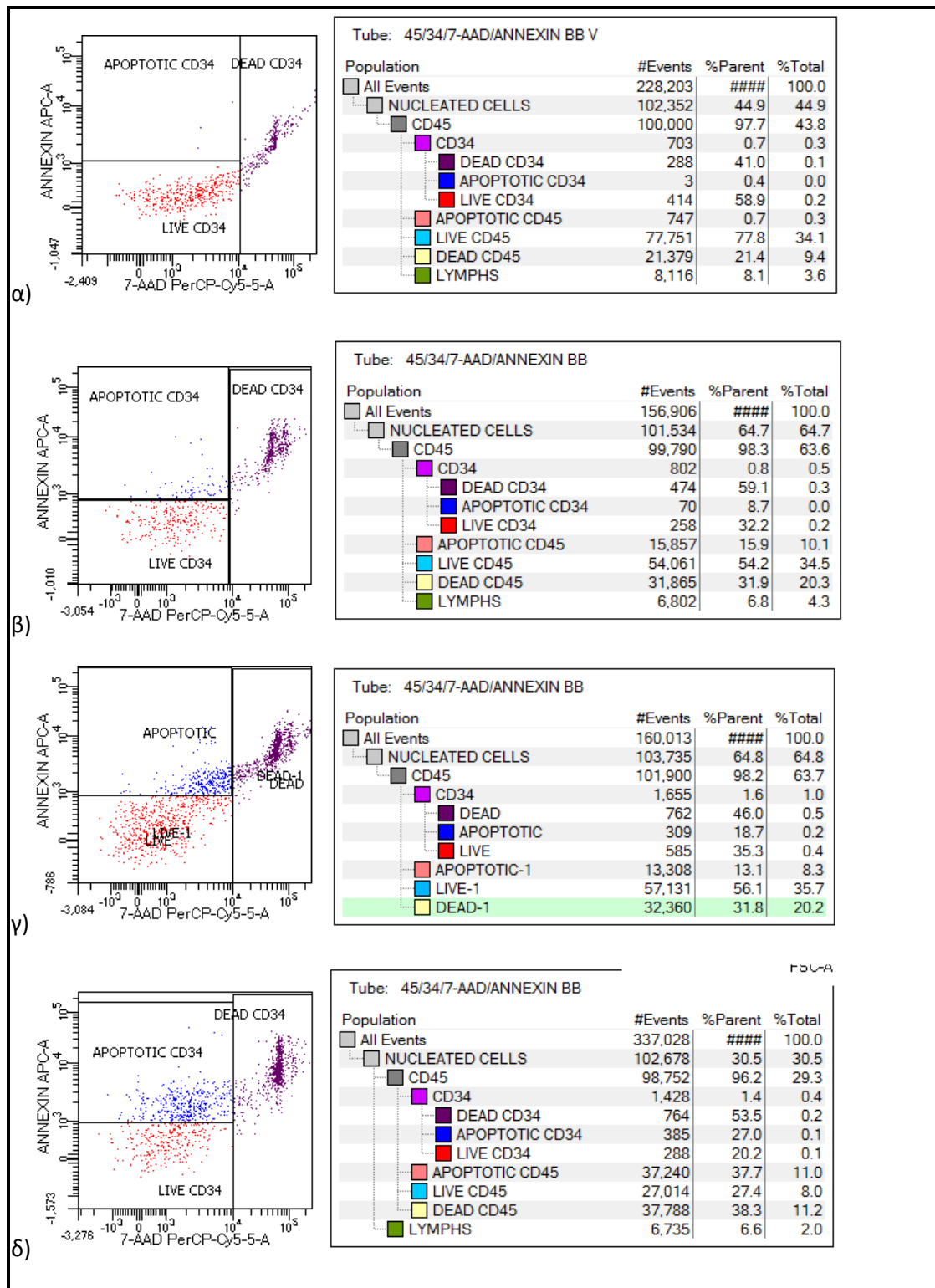
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



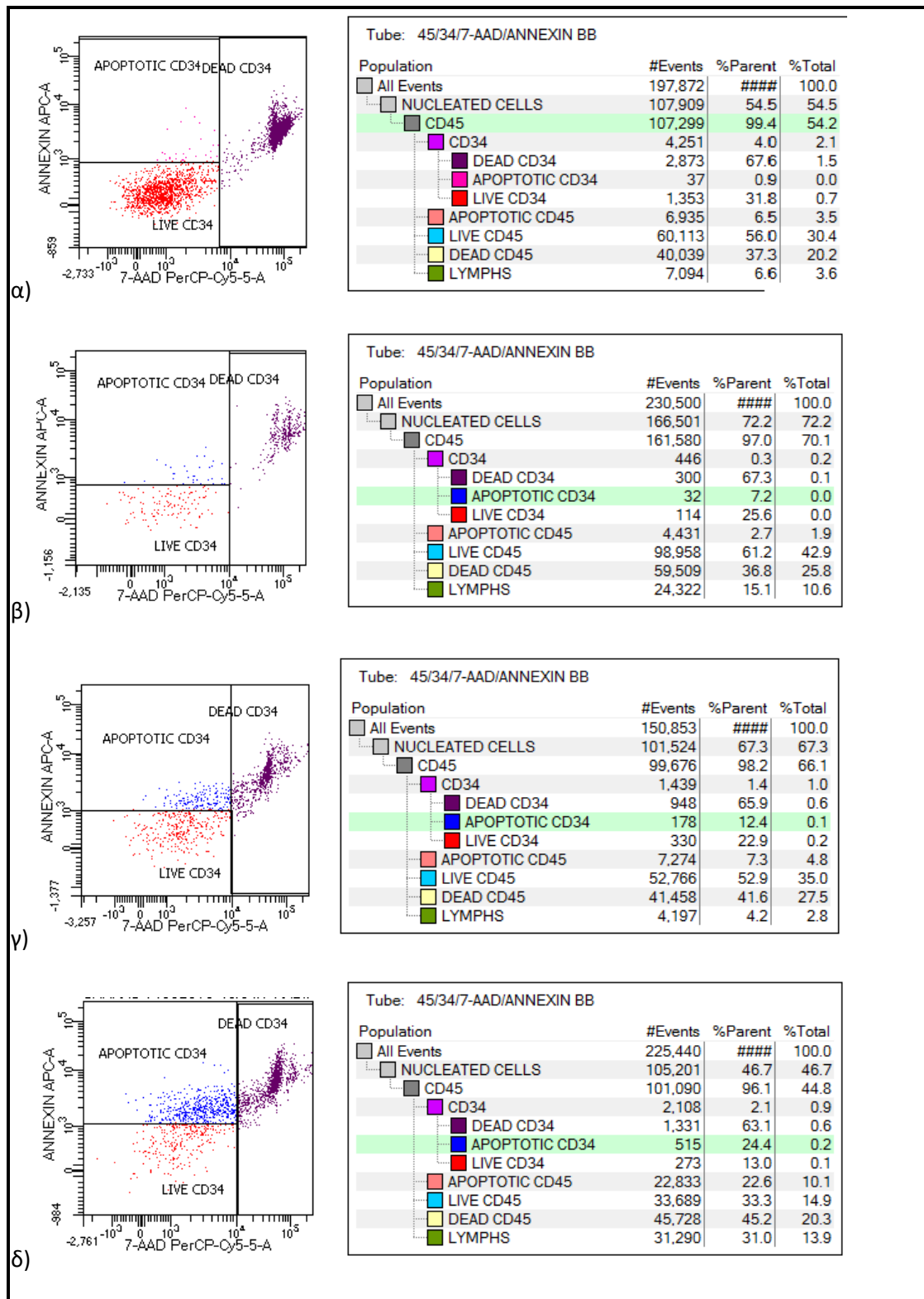
Εικόνα 2 παραρτήματος: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα δειγμάτων με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων >70% και διαφορετικά ποσοστά απόπτωσης: α) 74,4% βίωσιμα CD34+ κύτταρα, 2,1% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 72,3% βίωσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. β) 87,4% βίωσιμα CD34+ κύτταρα, 13,6% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 73,8% βίωσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. γ) 79,1% βίωσιμα CD34+ κύτταρα, 31,1% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 48% βίωσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα



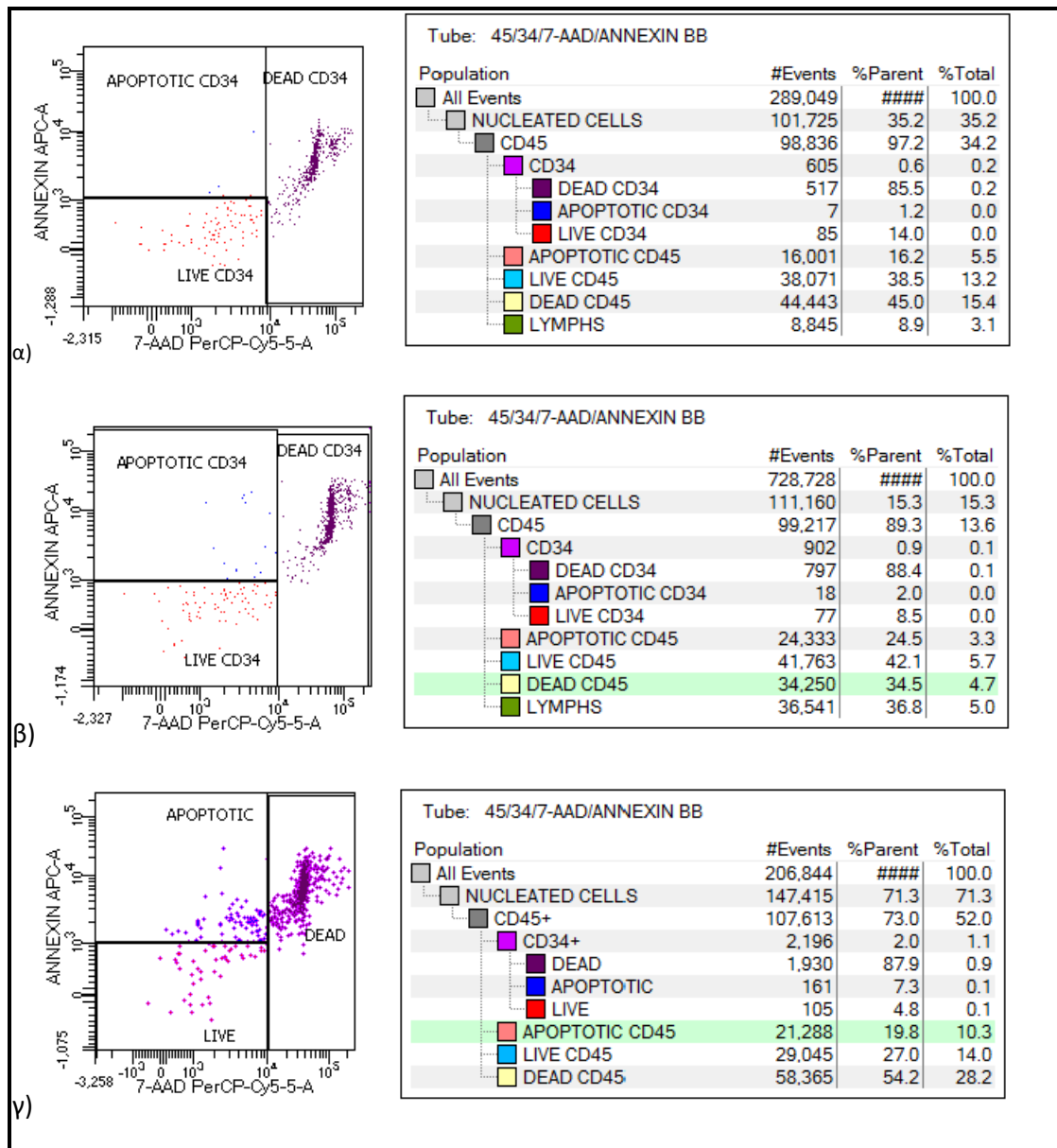
Εικόνα 3 παραρτήματος: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα δειγμάτων με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 60-70% και διαφορετικά ποσοστά απόπτωσης: α) 62,7% βίωσιμα CD34+ κύτταρα, 4,4% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 58,3% βίωσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. β) 69,8% βίωσιμα CD34+ κύτταρα, 12,6% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 57,2% βίωσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. γ) 63,4% βίωσιμα CD34+ κύτταρα, 24,9% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 38,5% βίωσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. δ) 67,7% βίωσιμα CD34+ κύτταρα, 44,9% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 22,8% βίωσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα.



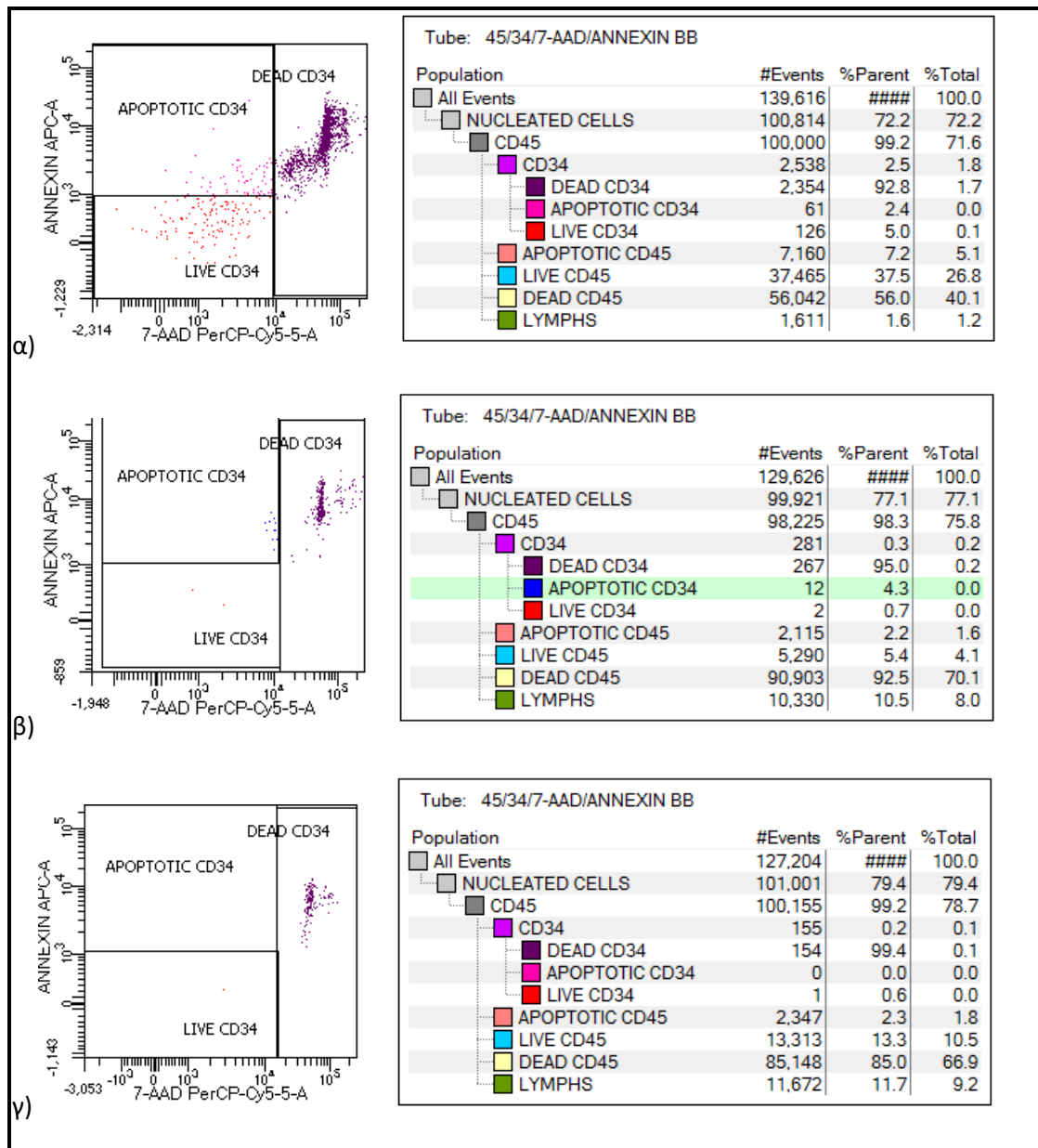
Εικόνα 3 παραρτήματος: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα δειγμάτων με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 40-60% και διαφορετικά ποσοστά απόπτωσης: α) 59,3% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 0,4% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 58,9% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. β) 40,9% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 8,7% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 32,2% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. γ) 54,0% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 18,7% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 35,3% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. δ) 47,2% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 27,0% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 20,2% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα.



Εικόνα 4 παραρτήματος: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα δειγμάτων με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 20-40% και διαφορετικά ποσοστά απόπτωσης: α) 32,7% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 0,9% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 31,8% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. β) 32,8% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 7,2% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 32,2% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. γ) 35,3% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 14,4% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 22,9% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. δ) 37,4% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 24,4% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 13% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα.



Εικόνα 5 παραρτήματος: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα δειγμάτων με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 10-20% και διαφορετικά ποσοστά απόπτωσης: α) 15,2% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 1,2% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 14% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. β) 10,5% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 2% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 8,5% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. γ) 12,1% βιώσιμα CD34+ κύτταρα, 7,3% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 4,8% βιώσιμα μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα.



Εικόνα 6 παραρτήματος: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα δειγμάτων με βιωσιμότητα CD34+ κυττάρων 10-20% και διαφορετικά ποσοστά απόπτωσης: α) 7,4% βίωση CD34+ κύτταρα, 2,4% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 5% βίωση μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. β) 5% βίωση CD34+ κύτταρα, 4,3% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 0,7% βίωση μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα. γ) 0,6% βίωση CD34+ κύτταρα, 0% αποπτωτικά CD34+ κύτταρα και 0,6% βίωση μη αποπτωτικά CD34+ κύτταρα.