



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ
ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΣΑΚ)**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, αρθρ. 202§2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος) ».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Γρηγοριάδη Νικόλαου: 23-11-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 705^α/8-2-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Πασχόπουλος Μηνάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-2-2011

«Ρύθμιση πολλαπλασιασμού στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων (ΣΑΚ)»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 785^α/9-2-2016

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πασχόπουλος Μηνάς	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βιζιριανάκης Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιοματικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Βρεκούσης Θώμας	Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική –Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γαλάνη Βασιλική	Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 26-2-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην οικογένειά μου....

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων για τη δυνατότητα εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής και ιδιαίτερα την Ιατρική Σχολή για την επιστημονική υποστήριξη και συνδρομή.

Ιδιαίτερως ευχαριστώ τον επιβλέπον της διδακτορικής διατριβής Καθηγητή Γεωργίου Ιωάννη, ο οποίος αποτέλεσε κύριο καθοδηγητή και εμπνευστή του ερευνητικού μου έργου και με εισήγαγε στα μονοπάτια της βασικής έρευνας.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τη Γυναικολογική Μαιευτική Κλινική του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων και ιδιαίτερως τους Καθηγητές Ιατρικής κ.κ Πασχόπουλο Μηνά και Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο για τη συμμετοχή τους στη συλλογή των ομφαλιοπλακουντιακών μοσχευμάτων.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιζιριανάκη Ιωάννη, σημαντικό αρωγό στην εκτέλεση των ερευνητικών πρωτοκόλλων και κυρίως στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη των πειραμάτων εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και στη στοχευμένη επιλογή των φαρμακομορίων.

Τέλος, ευχαριστώ εξαιρετικά τον αδελφό μου και Φαρμακοποιό Ιωάννη Γρηγοριάδη καθώς και την οικογένεια μου για την αμέριστη υποστήριξη τους σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

• ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
• ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	3
• ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
• ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	5
• ΠΛΗΡΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	7
• ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	45
• ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ).....	45
• ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	75
• ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
• ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	87
• ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	89
• ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ.....	91
• ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	93
• ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Τα Στελεχιαία Αιμοποιητικά Κύτταρα (ΣΑΚ) του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΟΠΑ), του κινητοποιημένου περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών αποτελούν δυνητικά αυτόλογα ή/και ετερόλογα μοσχεύματα ανασύστασης του αιμοποιητικού συστήματος σε ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπευτική χημειοθεραπεία υψηλών δόσεων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Τα ΣΑΚ του ΟΠΑ αποδεσμευόμενα από ιδιωτικές ή/και δημόσιες τράπεζες αίματος χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη παγκοσμίως, με έναρξη το 1988 σε περιστατικό αναιμίας Fanconi, ενώ το παγκόσμιο δίκτυο ΟΠΑ μοσχευμάτων NETCORD έχει δημοσιεύσει χιλιάδες περιστατικά αυτόλογων και ετερόλογων μεταμοσχεύσεων ΑΑΚ.

Τα ΣΑΚ του ΟΠΑ ως Αιμοποιητικά Μοσχεύματα που προορίζονται για λήπτες με αυξημένο βάρος σώματος συγκριτικά με το επιθυμητό βάρος σώματος για την κάθε κυτταρική δόση δεν επαρκούν για το επιθυμητό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό προτάθηκε η πρακτική να χρησιμοποιούνται περισσότερες της μίας μονάδας ιστοσυμβατών δειγμάτων με τον λήπτη. Οι μεγάλες, όμως ανάγκες για μοσχεύματα σε συνδυασμό με τον μικρό αριθμό των ΑΑΚ ανά κιλό βάρους σώματος των ασθενών-ληπτών, καθώς και τη δυσανάλογη εκπροσώπηση στις διεθνείς τράπεζες ιστοσυμβατότητας των μειονοτικών πληθυσμών, την περιορισμένη κλινική εμπειρία ως προς την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των μεταμοσχεύσεων ΑΑΚ προερχόμενων από περισσότερες της μίας ιστοσυμβατές μονάδες ή προερχόμενων από εξωσωματικώς πολλαπλασιασμένων ΑΑΚ, αποτελούν αντικείμενο διεξοδικής κλινικής έρευνας και επιστημονικής αναζήτησης κοινά αποδεκτών και ασφαλών προσεγγίσεων.

Τα ΣΑΚ του ΟΠΑ αποτελούν κύρια θεραπευτική επιλογή για τους παιδιατρικούς ασθενείς με αιματολογικές διαταραχές που υποβάλλονται σε υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας [1-4]. Ως αιμοποιητικά μοσχεύματα επέχουν σημαντικά πλεονεκτήματα όπως 1) σημαντικά ταχύτερη διαθεσιμότητα των αποθηκευμένων κρυοσυντηρημένων μονάδων ΟΠΑ, κατά μέσο όρο, 25-36 ημέρες νωρίτερα συγκριτικά με τα μοσχεύματα μυελού των οστών 2) την επέκταση του αριθμού των μερικώς συμβατών σε 1 ή 2 HLA-A, -B, και -DR αντιγόνα

δωρητών σε σχέση με την επιβίωση, 3) τη χαμηλότερη επίπτωση των αντιδράσεων της νόσου του μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD), 4) μειωμένο κίνδυνο μετάδοσης των συνήθων μολύνσεων, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός και ο ιός Epstein-Barr, 5) μειωμένη επαφή με το δότη των ΣΑΚ-ΟΠΑ λόγω των ευπρόσιτων διεθνών μητρώων και 6) η ευκολότερη αντιπροσώπευση των μειονοτήτων διά μέσου της διευρυμένης πιάσινας των σπάνιων HLA απλοτύπων [5]. Ωστόσο, το κρίσιμο μειονέκτημα των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος είναι ο περιορισμένος αριθμός των ΣΑΚ, καθώς και ο χρόνος συλλογής που μπορεί να συμβεί μόνο μία φορά κατά τον τοκετό. Επιπλέον, σε σύγκριση με τα μοσχεύματα του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος εμφανίζεται καθυστέρηση στην αιμοποιητικής ανασύσταση των ασθενών, με υψηλότερο κίνδυνο αποτυχίας της μεταμόσχευσης και επιπτώσεις στους δείκτες θνησιμότητας των μεταμοσχευμένων [6].

Βάση των ανωτέρω δεδομένων αρκετές ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να αξιολογήσουν διαφορετικές προσεγγίσεις για τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό των ΣΑΚ-ΟΠΑ [33-47]. Ενδεικτικά αναφέρονται τα συστήματα κυτταροκαλλιέργειών συμπεριλαμβανομένων, του παράγοντα βλαστοκυττάρων (SCF), της θρομβοποιητίνης (TPO), της τυροσινικής κινάσης (FL3t), το σύμπλοκο της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και του διαλυτού υποδοχέα (IL-6 / sIL-6R), ο συνδέτης delta1 Notch, οι πεπτιδικοί παράγοντες της αγγειοποιητίνης και της πλειοτροπίνης [10, 11]. Πρόσφατα, εφαρμόζονται οι τεχνικές της φαρμακολογικής προετοιμασίας επί των βλαστικών κυττάρων με στόχο την ενισχυμένη επιβίωση κατά την κυτταρική έκπτυξη αυτών [12,13]. Φαρμακομόρια και λοιπές ενώσεις αναφέρονται κατά την κλινική βιβλιογραφία τα εξής ο προστατευτικός παράγοντας υποξίας (HIF-1), τροφικοί/ αυξητικοί παράγοντες, ρυθμιστικοί παράγοντες επί της κινάσης (ERK), η κινάση (GSK-3β), οι μεταλλοπρωτεϊνάσες-2 (MMP-2) και Bcl-2 που εμπλέκονται στην απόκριση σε ερεθίσματα φαρμακολογικής προετοιμασίας [14,15]. Επίσης, αναφέρονται ως παράγοντες προετοιμασίας το υδρόθειο (H₂S) [16], διοξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) [17], και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) [18], η ερυθροποιητίνη (EPO) [19], ο παράγοντας (SDF-1), ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) ή λοιποί φαρμακολογικοί παραγόντες όπως το διαζοξίδιο, η απελίνη, το ισοφλουράνιο, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), και πρωτοπορφυρίνη κοβαλτίου (CoPP) [20-30].

ΠΛΗΡΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (STEM CELLS)

- **Ανθρώπινα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα (ESCs)**

1. Υπεράριθμα η πλεονάζοντα έμβρυα (spare) : IVF έμβρυο 5 ημερών in vitro, στάδιο βλαστοκύστης: 200-250 κύτταρα, ICM: 30-34 κύτταρα
2. Έμβρυα λίγων ημερών (research embryos) ή κλωνοποιημένα έμβρυα (SCNT-Dolly method) ή παρθενογενετικά έμβρυα
3. Επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα (iPS)

- **Ανθρώπινα ενήλικα σωματικά στελεχιαία κύτταρα (ASCs)**

1. Στελεχιαία κύτταρα του μυελού των οστών (BMDSCs)
2. Πολυδύναμα πρόδρομα ενήλικα στελεχιαία κύτταρα (MAPCs)
3. Ανθρώπινα νευρικά στελεχιαία κύτταρα (NSCs)
4. Στελεχιαία κύτταρα του περιφερικού αίματος (PCMOs)
5. Στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα ομφαλίου λώρου και ομφαλικού ιστού (CB-HSCs)

- **Ιστοειδικά στελεχιαία κύτταρα (Tissue-specific Stem Cells)**

1. Στελεχιαία κύτταρα με νέφρο-, κάρδιο-, ήπατο-, παγκρέατο-, δέρμο-, νεύρο-, έντερο-ειδική καταγωγή.
2. Στελεχιαία κύτταρα κυήματος (εμβρυϊκά γεννητικά κύτταρα αποβολών, gonadal ridge embryonic germ cells- embryoid bodies)

- **Κυκλοφορούντα στελεχιαία κύτταρα (Circulated Stem Cells)**

- **Κυκλοφορούντα στελεχιαία καρκινικά κύτταρα (Cancer Stem Cells)**

- **Εναλλακτικές πηγές στελεχιαίων κυττάρων**

1. Ηθικά έμβρυα, ομοιάζοντα με εμβρυϊκά κυτταρικά συστήματα τεχνητά κατασκευασμένα

2. Μη βλαβερή βιοψία σε ζωντανά έμβρυα
3. Αφαίρεση στελεχιαίων κυττάρων από πτωματικά έμβρυα.

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (STEM CELLS)

1. Αδιαφοροποίητα Κύτταρα (Undifferentiated Stem Cells)
2. Αυτοανανέωση/ Κλωνογεννητικότητα (Self Renewal/ Clonogenicity)
3. Διαφοροποίηση / Πολυδυναμικότητα (Differentiation/Plasticity)
4. Έκπτυξη (Stem Cell Expansion)
5. Αναγέννηση Ιστών (Tissue Regeneration)

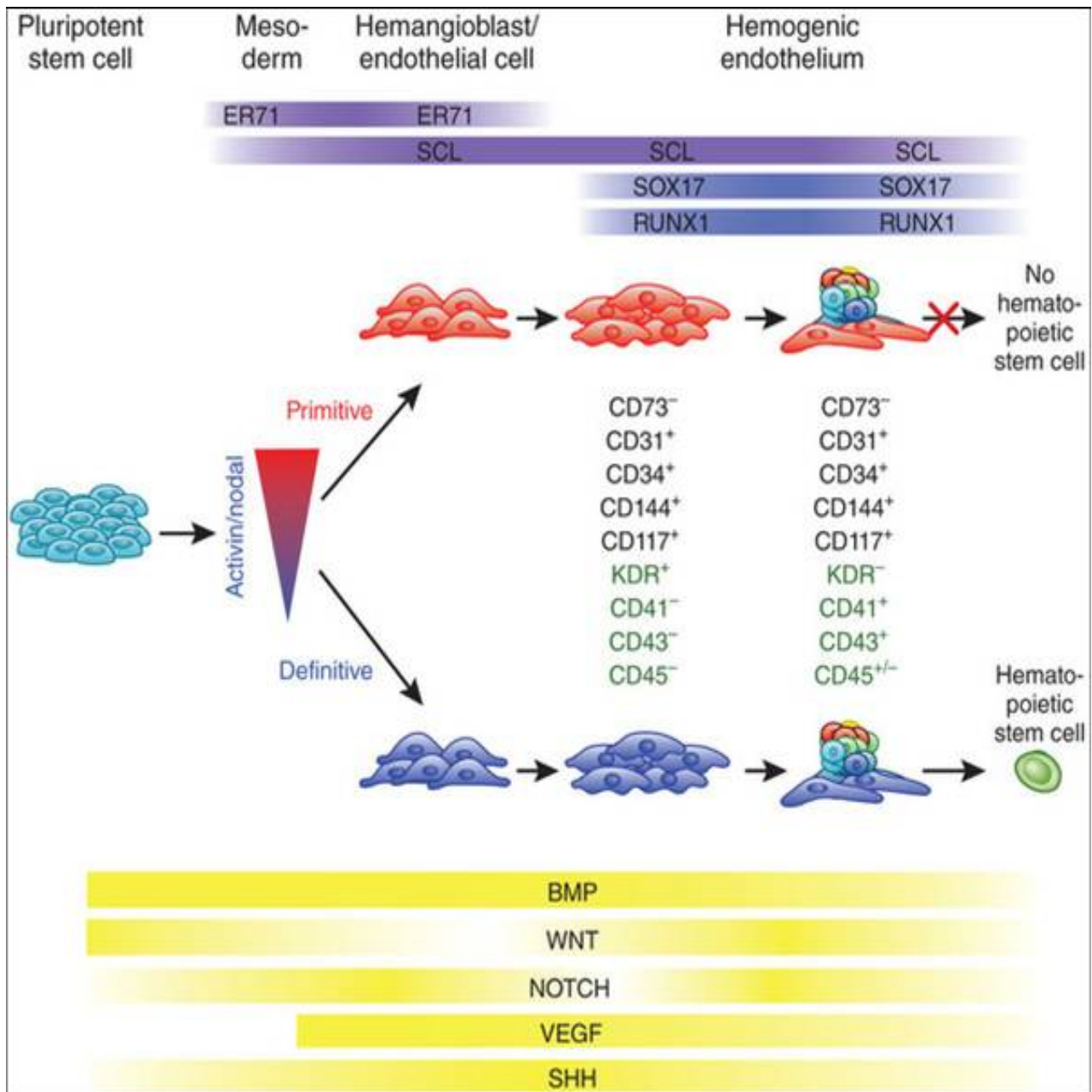
ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ - ΣΑΚ

1. Τα ΣΑΚ (ή πολυδύναμες αιμοποιητικές προβαθμίδες) είναι πολυδύναμα, αδιαφοροποίητα κύτταρα με δυνατότητα κυτταρικής διαιρέσεως απεριόριστα, με δυνατότητα αυτοανανέωσης και δυνατότητα παραγωγής λειτουργικών προγονικών ή διαφοροποιημένων κυτταρικών σειρών υψηλής εξειδίκευσης. (*Hematopoiesis-The EBMT Handbook*)

ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΦΩΛΗΕΣ

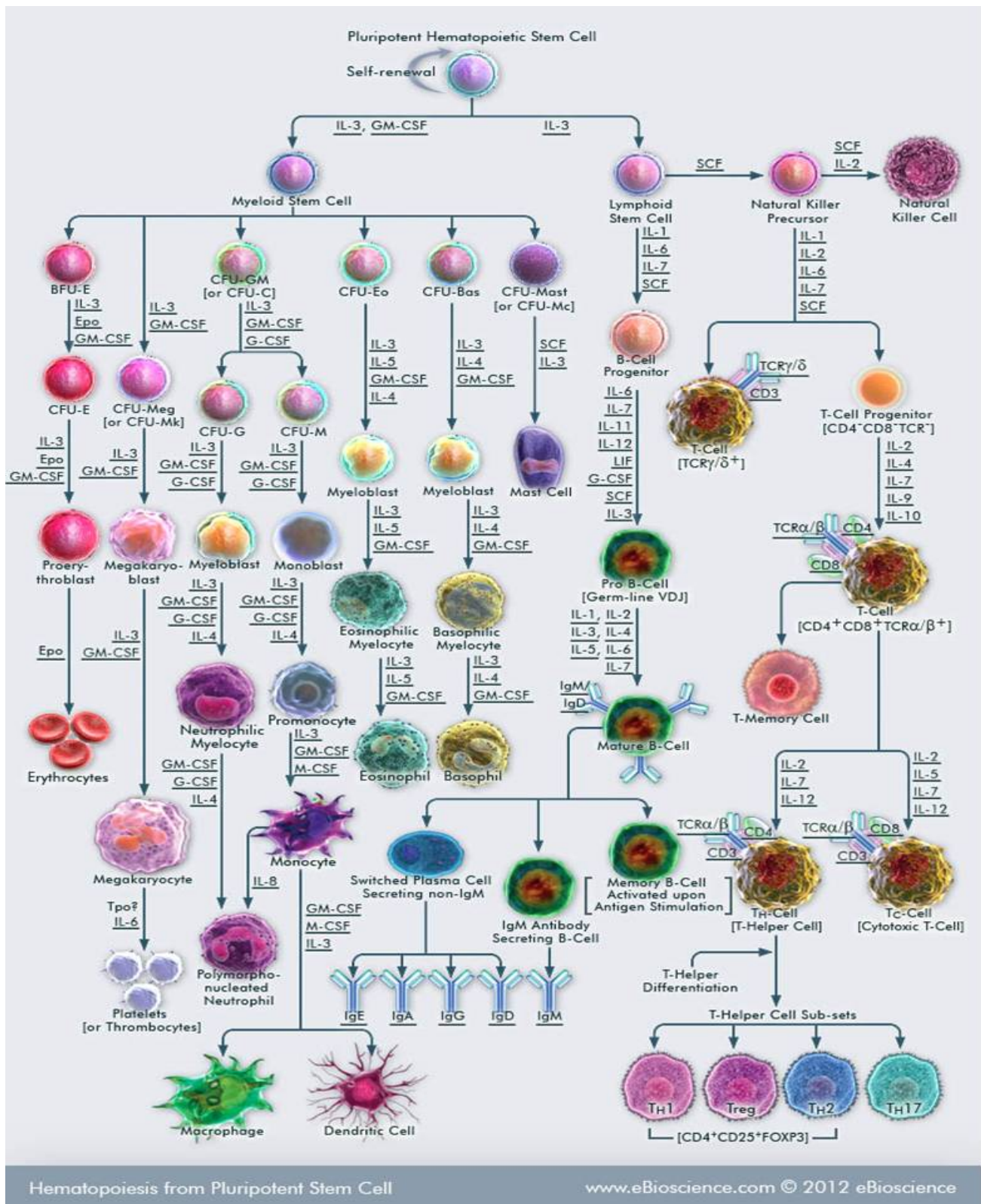
1. Μυελός των Οστών
2. Κινητοποιημένο περιφερικό αίμα
3. Ομφαλοπλακουντιακό αίμα

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑΜΕΤΑΓΩΓΗΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΣΑΚ *IN VITRO*



Ref: (Hematopoiesis-The EBMT Handbook)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΙΕΡΑΡΧΙΑΣ ΤΩΝ ΣΑΚ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ



Ref: www.ebioscience.com

ΣΥΝΤΟΜΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ ΣΑΚ-ΟΠΑ

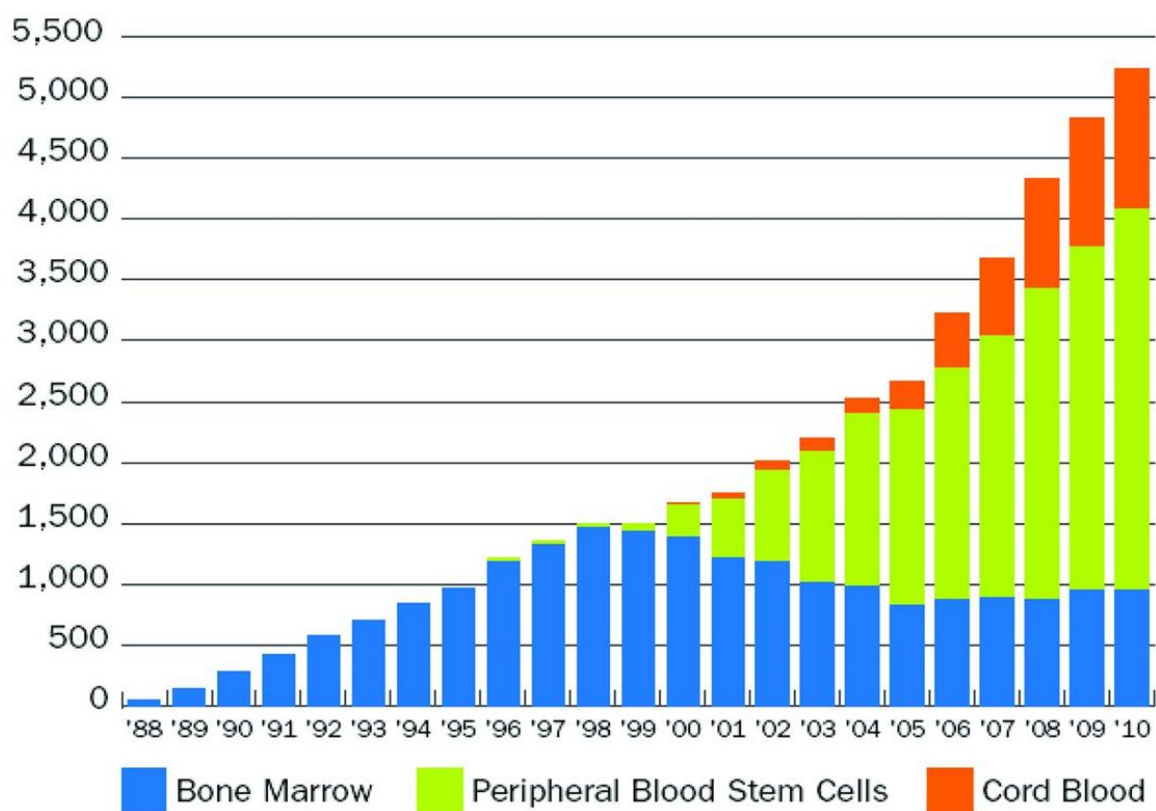
- 1989: Optimization of UCB collection and storage. Broxmeyer HE, Gordon GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828–3832.
- 1983: First HLA-identical sibling cord blood transplant in a patient with Fanconi's anemia. Gluckman E, Devergie A, Dutreix J. Radio sensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1983; 54: 431–440.
- 1993: Development of CBB for related and unrelated transplants (Paris, Dusseldorf, New York, Milan). Rubinstein P, Rosenfield RD, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993; 81: 1679–1690.
- 1996: First unrelated mismatched cord blood transplant in children. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC *et al.* Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *New Engl J Med* 1996; 335: 157–166.
- 1996: First unrelated cord blood transplant in adults. Laporte JP, Gorin NC, Rubinstein P, Lesage S, Portnoi MF, Barbu V *et al.* Cord blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. *New Engl J Med* 1996; 335: 167–170.
- 1997: Creation of the Eurocord Netcord network. Gluckman E, Rocha V, Boyer Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R *et al.* Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. *New Engl J Med* 1997; 337: 373–381.
- 1998: Description of criteria of donor choice based on the number of cells and possibility to use mismatched cord blood. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *New Engl J Med* 1998; 339: 1565–1577.

- 2000: Demonstration that in HLA-identical sibling transplants, cord blood gave delayed engraftment, less GVH and same survival. Rocha V, Wagner JE, Sobocinski K, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM *et al.* Comparison of graft-versus-host disease in children transplanted with HLA identical sibling umbilical cord blood versus HLA identical sibling bone marrow transplant. *New Engl J Med* 2000; 342: 1846–1854.
- 2004: Demonstration that, compared with matched unrelated BM, mismatched cord blood gave similar long-term leukemia-free survival in children and adults. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi *et al.* for the Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant group and Eurocord-Netcord registry. Comparison of outcomes after unrelated umbilical cord versus unrelated bone marrow transplants in adults with acute leukemia. *New Engl J Med* 2004; 351: 2276–2285.
- 2007: Improvement of results mostly in adults by double cord blood transplants and non-myeloablative conditioning regimens. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, McAfee S, Dey BR, Attar E *et al.* Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 82–89.
- 2010: Isolation of non-hematopoietic stem cells from cord blood as a first step for regenerative medicine.

ΚΡΙΣΙΜΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΣΑΚ-ΟΠΑ

- Σωστή ενημέρωση και έγγραφη συναίνεση των δοτών ΣΑΚ-Ο.Π.Α
- Συλλογή του Ο.Π.Α (2 τεχνικές, κριτήρια αποδοχής NETCORD: 40-150 ml, χρόνος απολίνωσης, ανατομία πλακούντα, επιπλοκές τοκετού)
- Σωστή Μεταφορά του Ο.Π.Α (48-72 ώρες)
- Έλεγχος μολυσματικών νοσημάτων (HIV, HBV, HCV, CMV, HTLV-I/II?) – Ιατρικό Ιστορικό – Μητέρα/Παιδί
- Βακτηριολογικός έλεγχος αναεροβίων και αεροβίων βακτηρίων
- Γενετικός έλεγχος κληρονομικών νόσων / Νεογνικός έλεγχος μεταβολικών νοσημάτων
- Έλεγχος ιστοσυμβατότητας Ο.Π.Α, Eurocord/ Netcord, (HLA-C, -DQB1,-DPB1, -A, -B)
- Επεξεργασία Ο.Π.Α και έλεγχος ποιότητας / ποσότητας, (TNC πριν και μετά την απόψυξη, CD34+, CFU-GEMM)
- Τρόποι κρυοσυντήρησης και ποσοστά βιωσιμότητας 10y, 15y, 21/23.5y

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΥΩΝ ΤΩΝ ΣΑΚ ΑΝΑ ΠΗΓΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ



Source: National Marrow Donor Program FY 2010

Ref: Oran B , and Shpall E Hematology 2012;2012:215-222

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΑΚ

1. Προσεγγίσεις: Ένδο- vs Έξω- κυττάριοι μηχανισμοί
2. Τεχνολογίες: Αρχεγονικότητα vs Διαφοροποίηση
3. Αποτελέσματα: Φάση Κλινικών Μελετών

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΑΚ (EX VIVO EXPANSION)

Walasek et al.

HSC expansion: challenges and opportunities

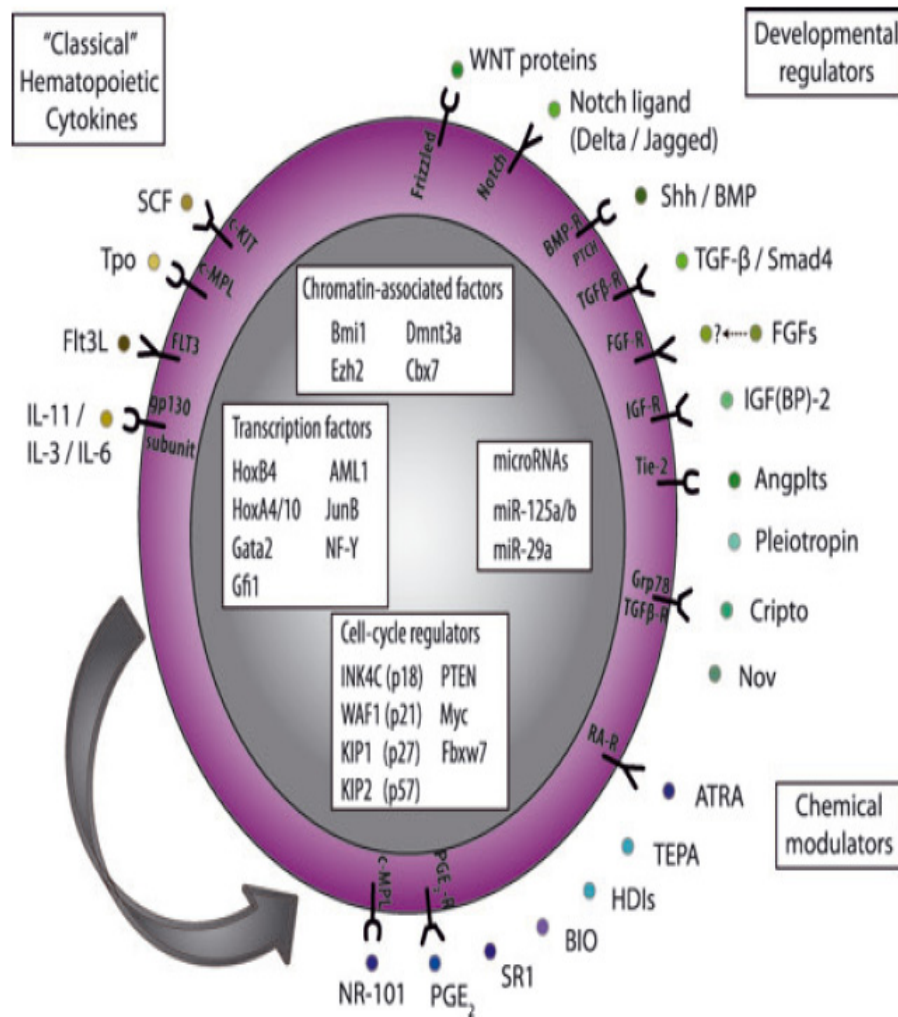


Figure 2. Cell-intrinsic and cell-extrinsic factors involved in HSC self-renewal. Self-renewal can be driven intrinsically by gene expression and can be regulated by extrinsic factors from environment. Cell-intrinsic regulation of HSC fate includes interplay between specific transcription factors, RNA/DNA-binding proteins, and chromatin-associated factors. That network can be modulated by cell-extrinsic cues such as cytokines, developmental/growth factors, and chemical compounds. These distinct stimuli create a complex matrix of interactions that defines the result of HSC fate, suggesting that combination of distinct stimuli could be required for effective stimulation of self-renewal divisions and stem cell expansion.

Ref: Walasek et al.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΑΚ (EX VIVO EXPANSION)

Table 1. Summary of recent expansion protocols discussed

Molecule	Species	Input cells	Supplements	Treatment time	Effect		Mechanism	Reference
					Assay	Fold over control	Fold over input	
FGFs	M	BM		3w	CAFC d-35		↑	de Haan <i>et al.</i> ³⁴
IGF-2	M	BM	SCF Tpo	10d	HSC frequency		↑	Yeoh <i>et al.</i> ³⁵
					CRU (HSC frequency)		↑ 24 (WBM)	Zhang and Lodish ³⁶
Angplts (2,3,5,7)	M	SP CD45 ⁺ Sca-1 ⁺	SCF Tpo FGF-1 IGF-2	10d	CRU (HSC frequency)		↑ 7.8 (SP)	Angplts expansion effects are dependent on mammalin cell-specific posttranslational modifications
							↑ 24 (Angptl2)	
							↑ 30 (Angptl3)	
Pleiotrophin	M	LSK CD34 ⁺	SCF Flt3L Tpo	7d	LSK numbers	↑ 17		Himburg <i>et al.</i> ³⁸
	H	Lin-34 ⁺ 38 ⁺ UCB			CRU frequency (12 weeks p-tpx)	↑ 6	↑ 4	
ATRA	M	LSK	Serum SCF Flt3L IL-6 IL-11	7d	% engraftment secondary tpx	↑ 10	↑ 10	Purton <i>et al.</i> ³⁹ Purton <i>et al.</i> ⁴⁰
					CFU	↑ 4		
					% engraftment (4 weeks)	↑ 3	↑ 3	
					% Lin ⁺ /Sca1 ⁺ cells	↑ 1.7/4	↓ 0.5	
					CFU-S (d8)	↑ 12	↑ 60	
TEPA	H	CD34 ⁺ CD133 ⁺	Serum SCF	3w	Pre-CFU-S	↓ 0.2	↓ 0.4	Peled <i>et al.</i> ⁴¹ Peled <i>et al.</i> ⁴² Peled <i>et al.</i> ⁴³
					% engraftment	↔	↓	
					Donor reconstitution (per 10 ⁵ cells)	↑ 5		
				8w	Total CD34 ⁺ CD38 ⁺ cells	↑ 15		
VPA	H	CD34 ⁺ UCB MPB BM	Serum SCF Flt3L Tpo	1-3w	Total CD34 ⁺ cells	↑ 10		Slower cell cycle
					% engraftment	↑	↑	
					% CD34 ⁺ CD90 ⁺ cells	↓ 1.5-6		
					% CD34 ⁺ CD38 ⁺ cells	↑ 20-140	↑ 16	
					CFU activity (plating efficiency)	↑ 85	↑ 7	
	H	CD34 ⁺ UCB BM	IL-3 SCF Flt3L Tpo	2-10d	Replating CFU activity	↓ 0.3-0.08		Bug <i>et al.</i> ⁴⁵
					CFU activity	↑ 5		
					Total CD34 ⁺ cell numbers	↑		
					CFU plating and replating activity	↑		
					CFU-S (d12)	↑		
Chlamy docin	H	CD34 ⁺ MPB	SCF Flt3L Tpo	24h	% engraftment	↑ 2.2		Seet <i>et al.</i> ⁴⁶
					Total CD45 ⁺ CD34 ⁺ cell numbers	↑ 2.0		
					% CD45 ⁺ CD34 ⁺ cells in S-phase	↑		
Saza +TSA	H	CD34 ⁺ UCB	Serum SCF Flt3L MGDF IL-3	9d	SRC frequency	↑ 6.0		Young <i>et al.</i> ⁴⁷
					% engraftment (SRC)	↑ 4.0	↑ 2.0	
					Total CD34 ⁺ cell numbers	↑ 2.5	↑ 5	
					Total CD34 ⁺ CD90 ⁺ cell numbers	↑ 6	↑ 12.5	
					CFU activity	↑ 8	↑ 9.8	
					CAFC activity	↑ 7	↑ 11.5	
Saza +TSA	H	CD34 ⁺ UCB	Serum SCF Flt3L MGDF IL-3	9d	SRC frequency of CD34 ⁺ CD90 ⁺ cells	↑ 40	↑ 9	Araki <i>et al.</i> ⁴⁸

Continued

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΑΚ (EX VIVO EXPANSION)

Table 1. Continued

Molecule	Species	Input cells	Supplements	Treatment time	Effect			Mechanism	Reference
					Assay	Fold over control	Fold over input		
BIO	H	CD34 ⁺ UBC	Serum SCF Flt3L Tpo	5d	% cells in G ₀ /G ₁ phase + Ki67 ^{dim}	↑ 28 + 1.5		↑ p57, Jagged-1, BMP8-b, RARRES2, Noggin	Ko <i>et al.</i> ⁴⁹
					CFU activity	↑ 2	↑ 30	↑ β-catenin nuclear-location	
					CFU replating activity	↑ 6	↑ 15	↓ cyclin D1, CEBPδ	
	H	CD34 ⁺ UBC	Serum SCF Flt-3L Tpo	5d	Engraftment of expanded cells	↑ 2	↔		Holmes <i>et al.</i> ⁵⁰
					Total CD34 ⁺ cell number	↓		↑ β-catenin nuclear-location	
					CFU	↓		↑ c-myc, HoxB4	
SR1	H	CD34 ⁺ MPB UBC	SCF Flt3L Tpo IL-6	3–5w	% engraftment	↔		↑ CXCR4 in stroma-adherent population	Boitano <i>et al.</i> ⁵¹
					SRC frequency (6 weeks)	↑ 2.5			
					Total CD34 ⁺ cell numbers	↑ 47		Antagonizing the aryl hydrocarbon receptor	
					CFU	↑ 65	↑ 9500		
					Engraftment 1 week p-tpx	↑ 24	↑ 6	↓ AHRR and CYP1B1	
					SRC frequency	↑ 14	↑ 17		
PGE2	M	WBM		2h	Secondary SRC frequency	↑ 4	↑ 12		North <i>et al.</i> ⁵²
					CFU-S (d12)	↑ 3		↑ Survivin, CXCR4 ↓ caspase-3	
					HSC frequency (CRU)	↑ 2-4	↑		
NR-101	H	LSK CD34 ⁺ CD34 ⁺ 38 [–] UCB		7d	Total CD34 ⁺ CD38 [–] cell number	↑ 2.3		Activation of STAT5, but not of STAT3.	Hoggatt <i>et al.</i> ⁵³ Nishino <i>et al.</i> ⁵⁴
					% CD34 ⁺ CD38 [–] cells in G1/G0-phase	↑ 2.1		Accumulation of HIF-1α and enhanced activation of its targets.	
					SRC frequency	↑ 2.3	↑ 2.9		

FGFs, fibroblast growth factors; IGF-2, insulin growth factors 2; Angplts, angiopoietin-like proteins; ATRA, all-*trans* retinoic acid; TEPA, tetra-ethylenepentamine; VPA, valproic acid; TSA, trichostatin A; 5aza, 5-aza-2'-deoxycytidine; BIO, 6-bromoindirubin-3'-oxime; SR1, StemRegenin1; PGE₂, prostaglandin E₂; M, mouse; H, human; BM, bone marrow; SP, side population; UCB, umbilical cord blood; MPB, mobilized peripheral blood; SCF, stem cell factor; Tpo, thromopoietin; Flt3L, Flt3 ligand; IL, interleukin; MGDF, megakaryocyte growth and development factor; w, week; d, day; CAFC, cobblestone area forming cell; CFU(-S), colony forming cell (spleen); CRU, competitive repopulating unit; SRC, NOD/SCID-repopulating cell; H4-AC, histone 4 acetylation.

ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΤΩΝ ΣΑΚ-ΟΠΑ ΑΝΑ ΧΩΡΑ

UCB-based therapy for non-hematological disorders

Table 2 Clinical trials using UCB stem cells in therapy of non-hematological disorders.

Condition	ClinicalTrials.gov Identifier	No
Alzheimer's disease	NCT01297218	1
Autism	NCT01343511	1
Bronchopulmonary dysplasia	NCT01297205	1
Burns	NCT01443689	1
Cartilage injury, osteoarthritis	NCT01041001	1
Cerebral palsy	NCT01072370; NCT01193660	2
Critical limb ischemia	NCT01019681	1
Diabetes	NCT01350219; NCT01415726; NCT00873925; NCT00989547	4
Epidermolysis bullosa	NCT01033552; NCT00881556; NCT00478244	3
Hearing loss	NCT01343394	1
Inborn metabolic disorders	NCT00950846 ^a ; NCT00920972 ^a ; NCT01238328; NCT00668564; NCT00654433; NCT00383448; NCT00176917; NCT00176904	8
Osteopetrosis	NCT00775931; NCT01087398; NCT00638820	3
Solid tumors	NCT00436761; NCT00112645	2
Stroke	NCT01438593	1
SLE, systemic sclerosis	NCT00684255	1

SLE, systemic lupus erythematosus.

^aClinical trials that involve both hematological and non-hematological disorders.

Table 3 Number of ongoing clinical trials per country using UCB stem cells in therapy for non-hematological (non-H) and hematological (H) disorders.

Country (sponsor/study site)	Non-H	H
Austria, Germany/Austria, Germany		1
Austria/multiple countries		1
Belgium/Belgium		2
China/China	2	2
France/France		3
Germany/Germany	1	
Iran/Iran	2	1
Israel, Italy/Israel, Italy		1
Israel/multiple countries		1
Israel/USA		1
Italy/Italy		4
Japan/Japan		1
Korea/Korea	4	3
Spain/Spain		1
The Netherlands/multiple countries		1
Taiwan/Taiwan	1	
UK/UK		2
USA/China	2	
USA/multiple countries		5
USA/USA	19 ^a	112 ^a

^aTwo clinical trials involve both H and non-H disorders.

Ref: [Walasek et al.](#)

ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΩΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΕΝΩΝ ΣΑΚ-ΟΠΑ

1. Allogenic Transplantation of Ex-vivo Expanded Cord Blood (CB)

Conditions: Umbilical Cord Blood; Stem Cell Transplantation; Hematological Malignancies

Intervention: Biological: ex vivo expansion

Responsible Party: Dr. Avichai Shimoni MD, Dr. Avichai Shimoni, hematologist, Sheba Medical Center

ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT01235468](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01235468)

Other Study ID Numbers: SHEBA-10-7959-AN-CTIL

Study First Received: November 2, 2010

Last Updated: December 1, 2015

Health Authority: Israel: Israeli Health Ministry Pharmaceutical Administration

2. Clinical Ex Vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood Stem and Progenitor Cells

Conditions: Acute Leukemia; Chronic Leukemia; Myelodysplastic Syndrome; Lymphoma; Myeloma

Intervention: Other: Ex vivo expanded cord blood cells

Responsible Party: Singapore General Hospital

ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT01624701](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01624701)

Other Study ID Numbers: 2009/925/B

Study First Received: March 20, 2012

Last Updated: November 26, 2015

Health Authority: Singapore: Health Sciences Authority

3. Transplantation of Umbilical Cord Blood Following Chemotherapy for Blood Cancers

Conditions: Acute Myeloid Leukemia; Leukemia, Lymphoblastic, Acute; Leukemia, Bilineage, Acute; Leukemia, Myeloid, Chronic

Intervention: Device: Ex vivo expansion of cord blood

Responsible Party: Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center

ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT00539656](#)

Other Study ID Numbers: J0606, NA00001903

Study First Received: October 2, 2007

Last Updated: October 24, 2013

Health Authority: United States: Food and Drug Administration

4. Expansion of Umbilical Cord Blood Using a Unique Bio-system

Condition: Pregnancy

Intervention:

Responsible Party: University of Kansas Medical Center

ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT01061879](#)

Other Study ID Numbers: 11973

Study First Received: February 2, 2010

Last Updated: December 28, 2012

Health Authority: United States: Institutional Review Board

5. A Pilot Study to Evaluate the Co-Infusion of Ex Vivo Expanded Cord Blood Cells With an Unmanipulated Cord Blood Unit in Patients Undergoing Cord Blood Transplant for Hematologic Malignancies

Conditions: Accelerated Phase Chronic Myelogenous Leukemia; Acute Myeloid Leukemia With Multilineage Dysplasia Following Myelodysplastic Syndrome; Adult Acute Lymphoblastic Leukemia in Remission; Adult Acute Myeloid Leukemia in Remission; Adult Acute Myeloid Leukemia With 11q23 (MLL) Abnormalities; Adult Acute Myeloid Leukemia With Del(5q); Adult Acute Myeloid Leukemia With Inv(16)(p13;q22); Adult

Acute Myeloid Leukemia With t(15;17)(q22;q12); Adult Acute Myeloid Leukemia With t(16;16)(p13;q22); Adult Acute Myeloid Leukemia With t(8;21)(q22;q22); Adult Nasal Type Extranodal NK/T-cell Lymphoma; Anaplastic Large Cell Lymphoma; Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Remission; Childhood Acute Myeloid Leukemia in Remission; Childhood Burkitt Lymphoma; Childhood Chronic Myelogenous Leukemia; Childhood Diffuse Large Cell Lymphoma; Childhood Immunoblastic Large Cell Lymphoma; Childhood Myelodysplastic Syndromes; Childhood Nasal Type Extranodal NK/T-cell Lymphoma; Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia; Contiguous Stage II Adult Burkitt Lymphoma; Contiguous Stage II Adult Diffuse Large Cell Lymphoma; Contiguous Stage II Adult Diffuse Mixed Cell Lymphoma; Contiguous Stage II Adult Immunoblastic Large Cell Lymphoma; Contiguous Stage II Adult Lymphoblastic Lymphoma; Contiguous Stage II Grade 3 Follicular Lymphoma; Contiguous Stage II Mantle Cell Lymphoma; de Novo Myelodysplastic Syndromes; Extranodal Marginal Zone B-cell Lymphoma of Mucosa-associated Lymphoid Tissue; Nodal Marginal Zone B-cell Lymphoma; Noncontiguous Stage II Adult Burkitt Lymphoma; Noncontiguous Stage II Adult Diffuse Large Cell Lymphoma; Noncontiguous Stage II Adult Diffuse Mixed Cell Lymphoma; Noncontiguous Stage II Adult Immunoblastic Large Cell Lymphoma; Noncontiguous Stage II Adult Lymphoblastic Lymphoma; Noncontiguous Stage II Grade 3 Follicular Lymphoma; Noncontiguous Stage II Mantle Cell Lymphoma; Previously Treated Myelodysplastic Syndromes; Prolymphocytic Leukemia; Recurrent Adult Burkitt Lymphoma; Recurrent Adult Diffuse Large Cell Lymphoma; Recurrent Adult Diffuse Mixed Cell Lymphoma; Recurrent Adult Grade III Lymphomatoid Granulomatosis; Recurrent Adult Immunoblastic Large Cell Lymphoma; Recurrent Adult Lymphoblastic Lymphoma; Recurrent Childhood Anaplastic Large Cell Lymphoma; Recurrent Childhood Grade III Lymphomatoid Granulomatosis; Recurrent Childhood Large

Cell Lymphoma; Recurrent Childhood Lymphoblastic Lymphoma; Recurrent Grade 1 Follicular Lymphoma; Recurrent Grade 2 Follicular Lymphoma; Recurrent Grade 3 Follicular Lymphoma; Recurrent Mantle Cell Lymphoma; Recurrent Marginal Zone Lymphoma; Recurrent Small Lymphocytic Lymphoma; Refractory Anemia; Refractory Anemia With Excess Blasts; Refractory Anemia With Excess Blasts in Transformation; Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia; Refractory Multiple Myeloma; Secondary Acute Myeloid Leukemia; Secondary Myelodysplastic Syndromes; Splenic Marginal Zone Lymphoma; Stage I Adult Burkitt Lymphoma; Stage I Adult Diffuse Large Cell Lymphoma; Stage I Adult Diffuse Mixed Cell Lymphoma; Stage I Adult Immunoblastic Large Cell Lymphoma; Stage I Adult Lymphoblastic Lymphoma; Stage I Childhood Lymphoblastic Lymphoma; Stage I Grade 3 Follicular Lymphoma; Stage I Mantle Cell Lymphoma; Stage II Childhood Lymphoblastic Lymphoma; Stage III Adult Burkitt Lymphoma; Stage III Adult Diffuse Large Cell Lymphoma; Stage III Adult Diffuse Mixed Cell Lymphoma; Stage III Adult Immunoblastic Large Cell Lymphoma; Stage III Adult Lymphoblastic Lymphoma; Stage III Childhood Lymphoblastic Lymphoma; Stage III Grade 3 Follicular Lymphoma; Stage III Mantle Cell Lymphoma; Stage IV Adult Burkitt Lymphoma; Stage IV Adult Diffuse Large Cell Lymphoma; Stage IV Adult Diffuse Mixed Cell Lymphoma; Stage IV Adult Immunoblastic Large Cell Lymphoma; Stage IV Adult Lymphoblastic Lymphoma; Stage IV Childhood Lymphoblastic Lymphoma; Stage IV Grade 3 Follicular Lymphoma; Stage IV Mantle Cell Lymphoma

Interventions:

Drug: cyclophosphamide; Drug: fludarabine phosphate; Drug: cyclosporine; Drug: mycophenolate mofetil; Other: ex-vivo umbilical cord blood expansion; Procedure: double-unit umbilical cord blood transplantation; Procedure: biopsy; Other: immunologic technique; Other: diagnostic laboratory biomarker analysis

Responsible Party:

Fred Hutchinson Cancer
Research Center

ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT00343798](#)
Other Study ID Numbers: 2044.00, NCI-2010-00236,
R43HL106868, R24HL074445,
RC2HL101844
Study First Received: June 22, 2006
Last Updated: February 10, 2015
Health Authority: United States: Food and Drug
Administration

6. Transplantation of Ex-vivo Expanded Cord Blood Stems Cells

Condition: Malignant Haematological Disease
Intervention: Other: allogeneic transplant
Responsible Party: University Hospital, Bordeaux
ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT01034449](#)
Other Study ID Numbers: CHUBX 2008/12
Study First Received: December 16, 2009
Last Updated: January 12, 2015
Health Authority: France: Afssaps - Agence française de sécurité sanitaire des
produits de santé (Saint-Denis)

7. Umbilical Cord Transplantation for the Elderly Population

Condition: Hematologic Malignancies
Intervention: Biological: StemEx
Responsible Party: Patrick Stiff, Professor, Loyola University
ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT01484470](#)
Other Study ID Numbers: 202041
Study First Received: November 30, 2011
Last Updated: April 24, 2014
Health Authority: United States: Food and Drug Administration
United States: Institutional Review Board

8. Infusion of Specially Treated Umbilical Cord Stem Cells After Chemoradiation

Treatment for Blood Cancers

Conditions:	Acute Lymphocytic Leukemia; Acute Myeloid Leukemia; Myelodysplastic Syndrome; Non-Hodgkin Lymphoma; Chronic Myelogenous Leukemia
Intervention:	Procedure: Expansion of umbilical cord stem cells
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT00089596
Obsolete Identifiers:	NCT00301704
Other Study ID Numbers:	CB001
Study First Received:	August 6, 2004
Last Updated:	April 11, 2007
Health Authority:	United States: Food and Drug Administration

Πηγή: www.clinicaltrials.gov

ΚΑΝΟΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ ΣΑΚ-ΟΠΑ

Ημεδαποί και διεθνείς οργανισμοί πιστοποίησης / διαπίστευσης/ αδειοδότησης

1. Ε.ΣΥ.Δ, www.esyd.gr
2. Ε.Μ.Α / CAT committee, www.ema.europa.eu
3. Ε.Ο.Μ / www.eom.gr
4. NETCORD / FACT / www.netcord.org
5. FDA/ www.fda.gov
6. AABB/ www.aabb.org

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Φιλγραστίμη

Ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η λειτουργία των αιμοποιητικών κυττάρων ρυθμίζονται κατά ένα μέρος από διαλυτά πολυπεπίδια, τις κυτοκίνες. Μια ομάδα κυτοκινών, οι αυξητικοί παράγοντες της αιμοποίησης, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων σε καλλιέργειες *in vitro*. Ειδικότερα ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (Granulocyte Colony Stimulating Factor/GCSF) διεγείρει εκλεκτικά την αύξηση και ωρίμανση των ουδετεροφίλων. Η κύρια εφαρμογή του είναι η ελάττωση της διάρκειας της ουδετεροπενίας που προκαλείται από τα αντικαρκινικά φάρμακα και άρα η μείωση της συχνότητας των λοιμωδών επιπλοκών.

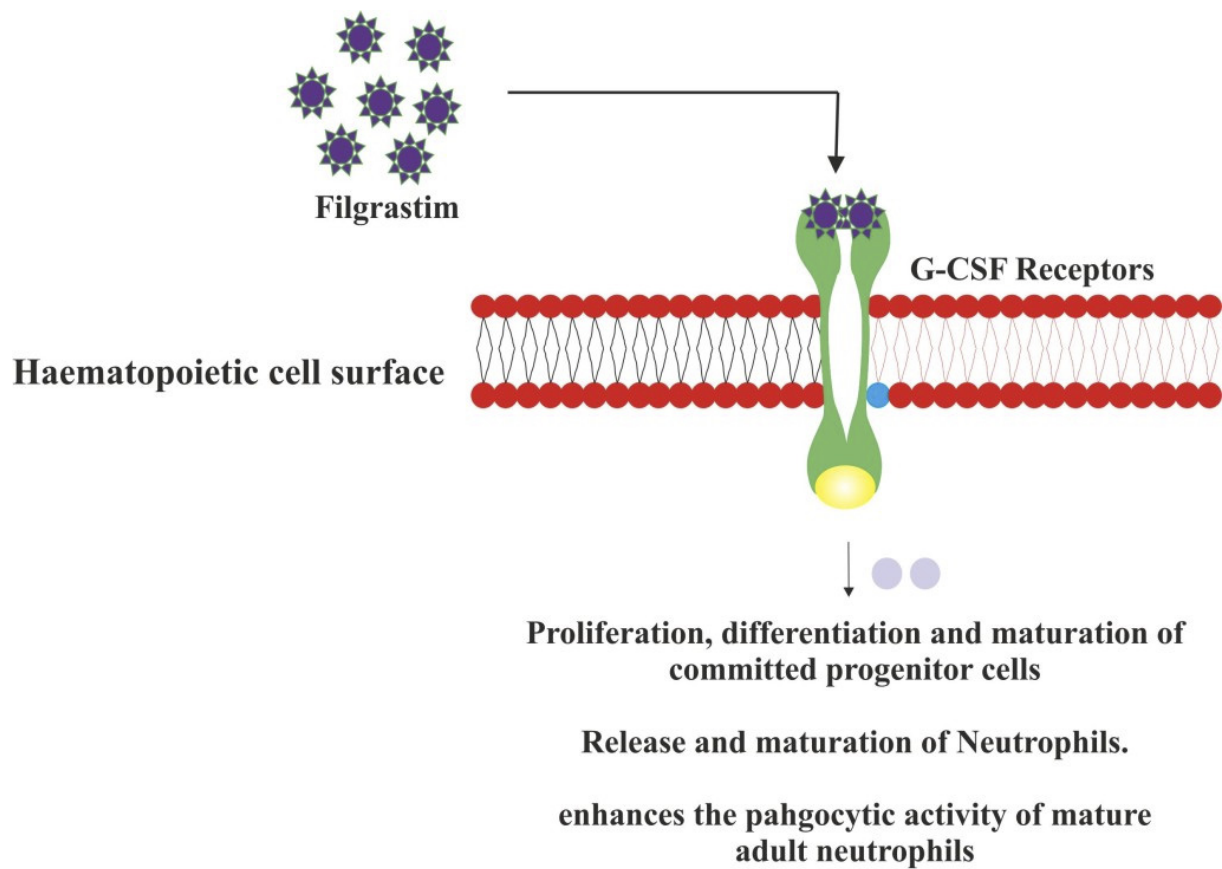
Η φιλγραστίμη και η λενογραστίμη είναι ανασυνδυασμένες γλυκοπρωτεΐνες (r-HuGCSF) ισοδύναμες με το G-CSF του ανθρώπου. Τα δύο προϊόντα διαφέρουν ως προς τη γλυκοζυλίωση του μορίου τους.

Η πεγκφιλγραστίμη είναι παράγωγο της φιλγραστίμης μετά από σύζευξή της με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η οποία αυξάνει και τη διάρκεια δράσης της.

Απεικόνιση Μορίου (3D) Φιλγραστίμης



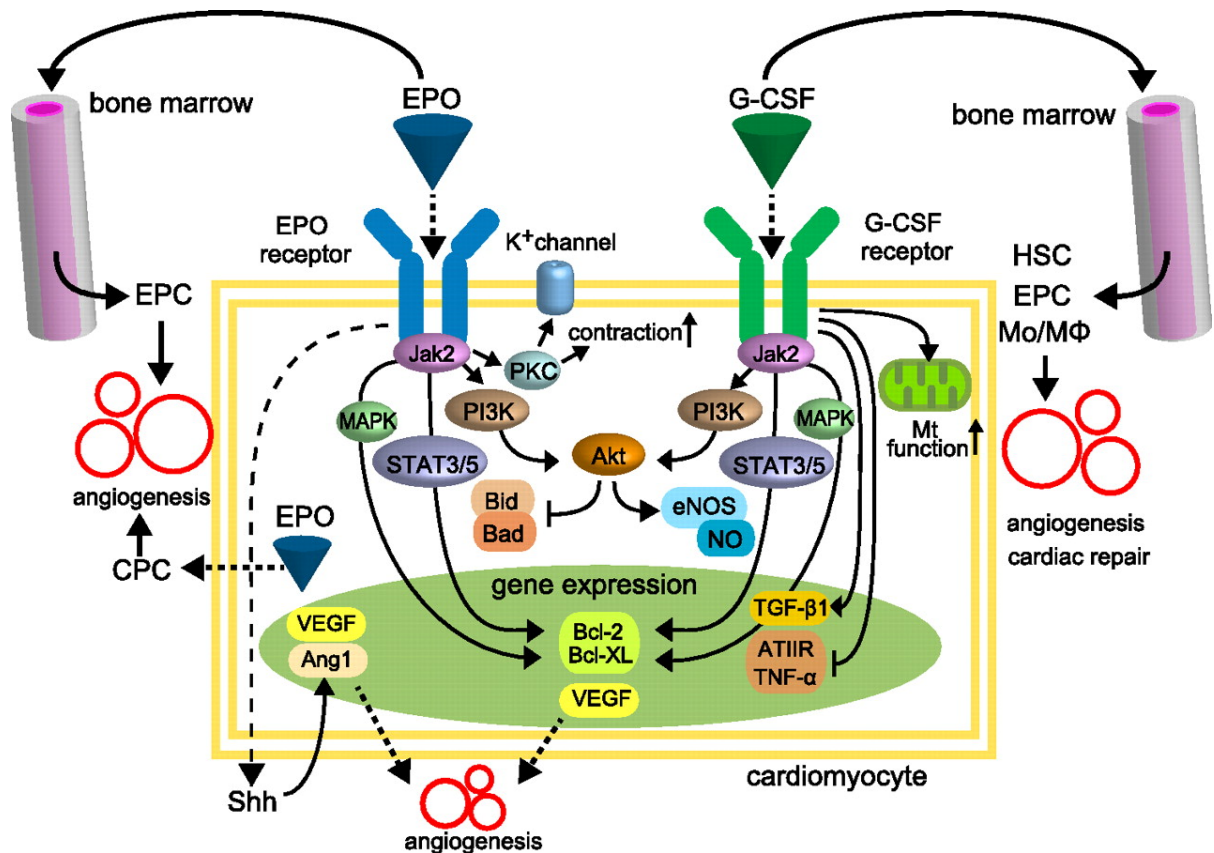
Μοριακός Μηχανισμός Δράσης Φιλγραστίνης



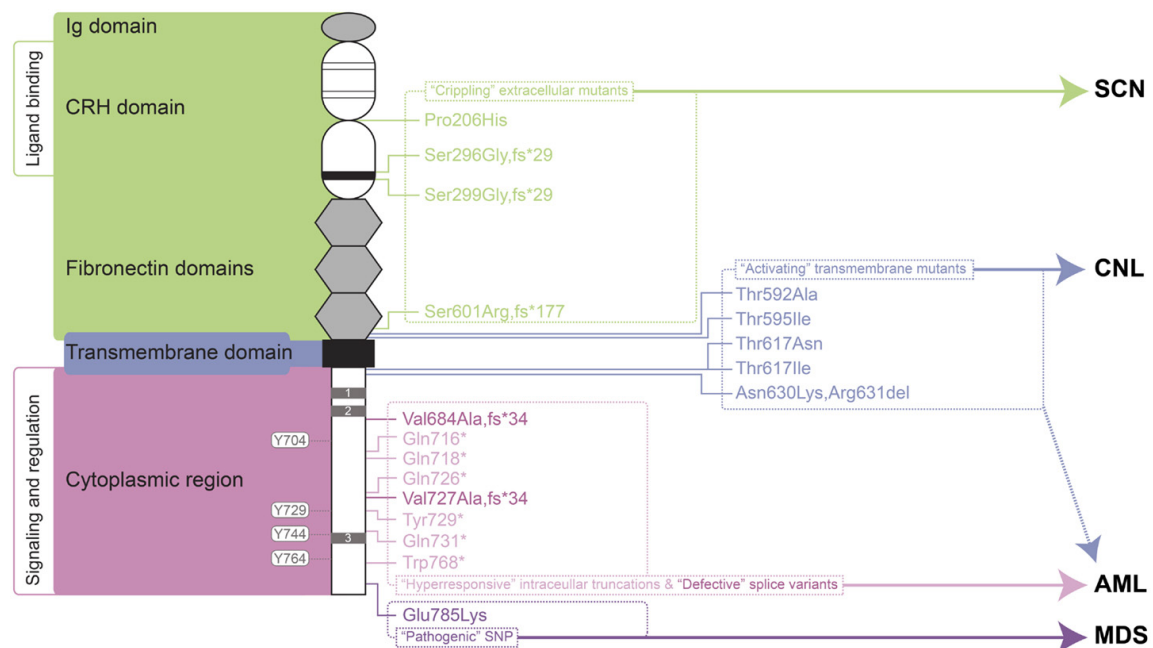
Filgrastim : Mode of action

Πηγή: www.drugdetails.com

Μοριακό δίκτυο σηματοδότησης των παραγόντων EPO και G-CSF στα καρδιομυοκύτταρα

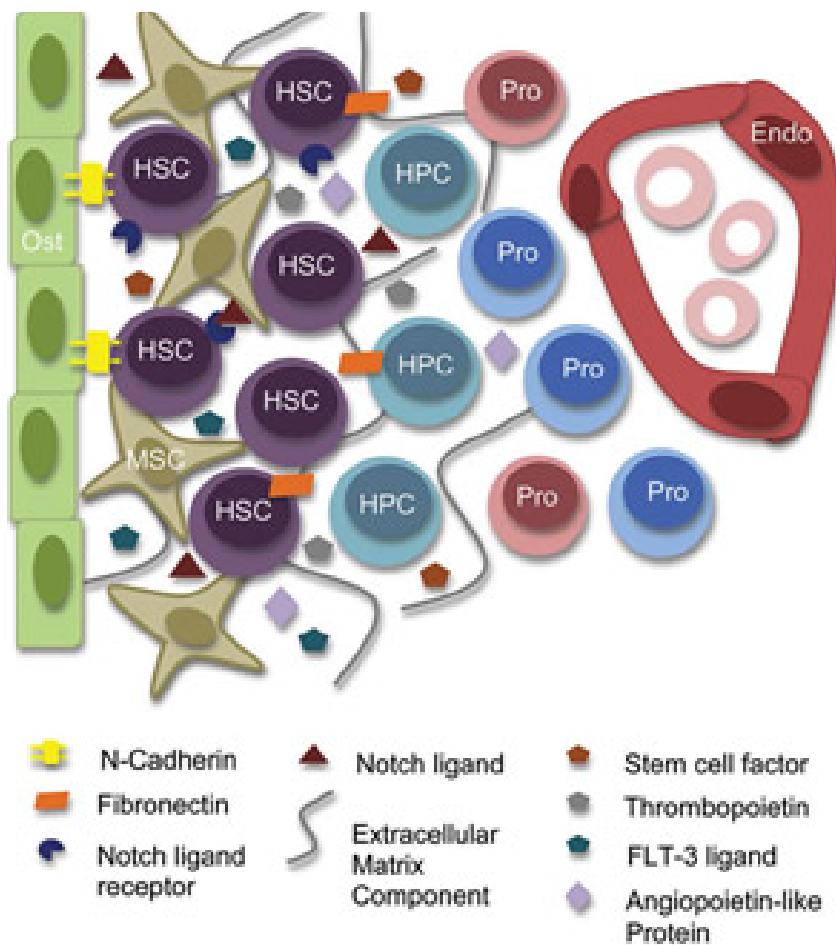


Μεταλλάξεις του υποδοχέα της φιλγραστίμης στον εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο χώρο και συσχέτιση με τις μυελογενείς διαταραχές



Ref: Front. Oncol., 01 May 2014 | <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00093>

Ρυθμιστικά στοιχεία σχετικά με τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ΣΑΚ



The hematopoietic stem cell niche and some of its key regulatory components relevant to HSC expansion. HSC = hematopoietic stem cell. HPC = hematopoietic progenitor cell with further lineage commitment. Endo = endothelial cell lining a blood vessel containing erythrocytes. MSC = Mesenchymal stem cell. Ost = Osteoblast.

Ref: Ex-Vivo Expansion of Stem Cells: Inspiration From a Highly Specialized Biologic Niche Kelsie Storm, MD

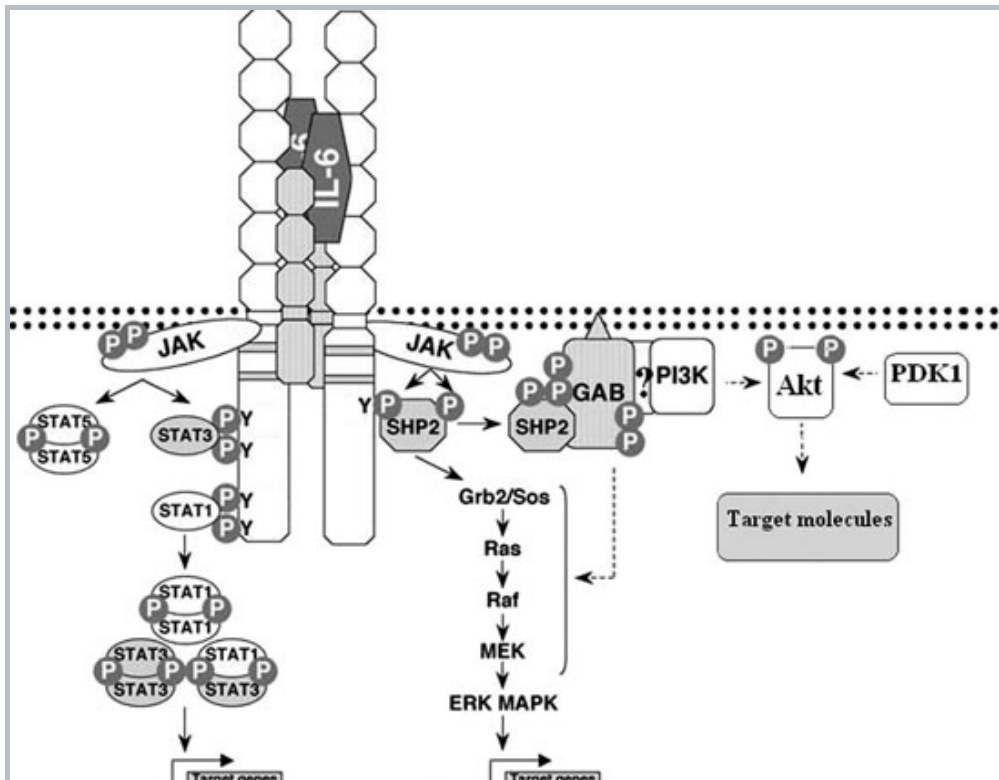
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΕΣ

ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-6 (IL-6)

Ο υποδοχέας gp130 δεν έχει δραστικότητα κινάσης, αλλά μετά τον σχηματισμό του δραστικού υποδοχέα (εξαμερές), συνδέεται στην κυτταροπλασματική του πλευρά με τις Janus Kinases (JAK), οι οποίες είναι κυτταροπλασματικές (non-receptor) τυροσινικές κινάσες. Μετά την πρόσδεση της IL-6 στον υποδοχέα IL-6Rα, ο gp130 σχηματίζει ομοδιμερή. Η δημιουργία του πρωτεϊνικού συμπλέγματος θεωρείται ότι οδηγεί σε στενή επαφή των Jak κινασών, η οποία με τη σειρά της καταλήγει στην αυτό-ενεργοποίηση των κινασών. Οι ενεργοποιημένες Jak κινάσες φωσφορυλιώνουν τυροσινικά υπολείμματα της κυτταροπλασματικής πλευράς του gp130, όπως και άλλα μόρια-στόχους των σηματοδοτικών οδών.

Ο υποδοχέας gp130 στον άνθρωπο έχει έξι τυροσινικά αμινοξέα στην κυτταροπλασματική του περιοχή. Η πρώτη κυτταροπλασματική τυροσίνη (Y683, δηλαδή το 683ο αμινοξύ του μορίου του gp130) δεν αποτελεί μέρος μίας έως τώρα γνωστής σηματοδοτικής αλληλουχίας και φωσφορυλιώνεται σε μικρότερο βαθμό. Η δεύτερη τυροσίνη (Y759) αποτελεί μέρος του μοτίβου (αλληλουχίας αμινοξέων) Y759 S(erine)T(hreonine)V(aline), το οποίο είναι ανάλογο του μοτίβου για τη σύνδεση με την πρωτεϊνική τυροσινική φωσφατάση SHP-2. Συγκεκριμένα, η SHP-2 φωσφορυλιώνεται μετά από διέγερση με IL-6 και η τυροσίνη Y759 είναι αναγκαία για την gp130-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της SHP-2. Τα υπόλοιπα τυροσινικά υπολείμματα (Y767, Y814, Y905, Y915) σχηματίζουν YXXQ(glutamine) μοτίβα, όπου X συμβολίζει οποιοδήποτε αμινοξύ. Τα μοτίβα αυτά είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων STAT. Σε συντομία, η ενεργοποίηση των Jak από την IL-6 οδηγεί στη δραστηριοποίηση δύο κυρίως σηματοδοτικών ακολουθιών: της οδού των Jak/Stat και της οδού της MAPK.



Εικόνα 1. Ενδοκυττάριας αλληλουχίας μεταβίβασης του σήματος που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση της IL-6 στους υποδοχείς της. Με τη δημιουργία του δραστικού εξαμερούς και τη στενή επαφή των ενδοκυττάρων τμημάτων των gp130 υποδοχέων, οι Jak κινάσες ενεργοποιούνται, αυτοφωσφορυλιώνονται και φωσφορυλιώνουν τυροσίνες στους gp130 υποδοχείς. Όπως φαίνεται αριστερά στο σχήμα, οι STAT παράγοντες προσδένονται σε συγκεκριμένες φωσφοτυροσίνες των gp130 και στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται από τις Jak κινάσες. Οι φωσφορυλιωμένοι STAT παράγοντες σχηματίζουν όμο- και έτερο-διμερή, μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Για την ενεργοποίηση της οδού της MAPK και της PI3K από την IL-6 (δεξιά στο σχήμα), ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος. Η πρόσδεση της SHP2 στον υποδοχέα και η φωσφορυλίωσή της από την Jak, οδηγεί από μόνη της αλλά και σε συνδυασμό με την ένωση της SHP2 με τις πρωτεΐνες Gab1 και PI3K στην ενεργοποίηση της οδού της MAPK. Η διαδικασία μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η συμμετοχή της Gab1 στη σήμανση της IL-6, αλλά και η ενεργοποίηση της οδού της PI3K δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, κάτι που συμβολίζεται με το ερωτηματικό στο σημείο επαφής της Gab1 με την PI3K στο σχήμα. Η τροποποίηση ορισμένων φωσφολιπιδίων από την ενεργοποιημένη PI3K έχει ως επακόλουθο τη μετακίνηση της κινάσης Akt στην κυτταρική μεμβράνη και την ενεργοποίησή της μέσω φωσφορυλίωσης από την πρωτεΐνη PDK1. Η ενεργοποιημένη Akt δρα στη συνέχεια φωσφορυλιώνοντας ποικίλα μόρια-στόχους.

Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής ακολουθίας των JAK/STAT

Γενικά

Οι πρωτεΐνες STAT είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι συνδέονται σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες στην κυτταροπλασματική πλευρά του υποδοχέα gp130 και διμερίζονται μετά από φωσφορυλίωση σε τυροσινικά υπολείμματα από τις Jak κινάσες. Μετά από τον διμερισμό, οι STATs μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου και ενεργοποιούν γονίδια-στόχους. Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί επτά STAT πρωτεΐνες (STAT1 έως 4, 5a, 5b και 6) στους ανθρώπους και στους μύες. Η σύνδεση της IL-6 με τον υποδοχέα gp130 επάγει την ενεργοποίηση των STAT1, 3 και 5.

Jaks που εμπλέκονται στη δράση της IL-6

Οι Jaks είναι ενδοκυττάριας τυροσινικές κινάσες με μοριακό βάρος 120-140 kDa. Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί τέσσερα μέλη: Jak1, Jak2 και Tyk2, οι οποίες εκφράζονται κυρίως, και Jak3, η οποία εντοπίζεται κυρίως σε κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς.

Η IL-6 οδηγεί στην ενεργοποίηση των Jak1, Jak2 και Tyk2. Ποιες κινάσες εμπλέκονται καθώς και σε ποιο βαθμό, ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων. Επίσης ένα άλλο ερώτημα ήταν εάν οι διαφορετικές Jak είναι ισότιμες ή ακολουθούν κάποια ιεραρχία. Έρευνες με κυτταρικές σειρές ινοσαρκώματος έδειξαν ότι παρουσία sIL-6Ra, η δράση της IL-6 σχετιζόταν με την Jak1. Παρατηρήθηκε επίσης ότι ακόμα και φωσφορυλιωμένες Jak2 και Tyk2 δεν μπορούσαν να αντικαταστήσουν την Jak1 σε κύτταρα με έλλειψη Jak1.

Σύνδεση των Jak με τον υποδοχέα

Η σύνδεση του υποδοχέα gp130 με τις Jak ρυθμίζεται από αλληλουχίες που εντοπίζονται κοντά στην πλασματική μεμβράνη και ονομάζονται Box1 και Box2. Οι περιοχές αυτές παρατηρούνται σε πολλούς υποδοχείς κυτοκινών. Η αλληλεπίδραση της gp130 με την Jak1 είναι πολύ ισχυρή και σταθερή, καθώς η Jak1 δεν διαχέεται όπως μία τυπική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, αλλά η κινητικότητά της είναι παραπλήσια με την κινητικότητα του διαμεμβρανικού υποδοχέα gp130.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT (Signal Transducer and Activation of Transcription)

Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί και κλωνοποιηθεί επτά γονίδια STAT πρωτεϊνών σε τρεις γονιδιακούς τόπους, κάτι που αποδεικνύει ότι η οικογένεια των STAT πρωτεϊνών έχει

προκύψει από γονιδιακό διπλασιασμό. Οι STAT παράγοντες στα θηλαστικά συμβολίζονται ως STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b και 646. Μιας και STAT πρωτεΐνες δεν βρίσκονται σε μονοκύτταρους οργανισμούς, η εμφάνιση των STAT πρωτεϊνών ίσως να σχετίζεται με την εξέλιξη των πολυκυττάρων οργανισμών. Οι STATs είναι πρωτεΐνες με αρκετά διατηρημένη δομή. Αποτελούνται από 750-850 αμινοξέα (STAT1, 750 αμινοξέα και STAT3, 770 αμινοξέα) και το μόριο τους αποτελείται από αρκετές δομικές περιοχές με διαφορετική λειτουργία, όπως μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA στο μέσο του μορίου και μία περιοχή ενεργοποίησης (transactivation) στο καρβόξυ-τελικό άκρο.

Ρύθμιση της δραστηριότητας των STATs

Με εξαίρεση τον STAT4, οι παράγοντες STAT εκφράζονται αυθόρμητα. Έτσι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των STAT (δηλ. η μεταγραφή των γονιδίων των STAT πρωτεϊνών) δεν παίζει ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των STAT. Η δραστηριότητα των STAT ρυθμίζεται κυρίως με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση σε αμινοξέα τυροσίνης και σερίνης.

Η ενεργοποίηση των STATs απαιτεί την παροδική σύνδεση τους με τους υποδοχείς κυτοκινών και τη φωσφορυλίωση τους από τις JAK κινάσες. Ουσίες που δρουν μέσω υποδοχέων ίδιου τύπου συνήθως ενεργοποιούν τους ίδιους STAT παράγοντες. Για παράδειγμα όλες οι IL-6-type κυτοκίνες ενεργοποιούν κυρίως τον STAT3 και σε μικρότερο βαθμό τον STAT1 παράγοντα μέσω του κοινού υποδοχέα gp130/131.

Σε συνδυασμό με τη φωσφορυλίωση σε τυροσινικά αμινοξέα, έχουν αναφερθεί και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των STAT παραγόντων, όπως η μεθυλίωση και η φωσφορυλίωση σε υπολείμματα σερίνης.

Μεταφορά των STAT στον πυρήνα

Οι STATs ενεργοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, αλλά εκτελούν τη λειτουργία τους στον πυρήνα. Εξαιτίας του μεγέθους τους, οι STATs πρέπει να μεταφερθούν ενεργά μέσω των πυρηνικών πόρων. Συνήθως, η μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα καθορίζεται από μία αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization sequence, NLS).

Μία προσεκτική εξέταση της αμινοξικής αλληλουχίας δεν φανερώνει τυπικές αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLSs) σε όλους τους παράγοντες STAT. Έτσι, η μεταφορά των STATs στον πυρήνα πραγματοποιείται εκτός των τυπικών αλληλουχιών πυρηνικού εντοπισμού, είτε μέσω μη τυπικών αλληλουχιών είτε μέσω μίας πρωτεΐνης που συνδέεται

με τους ενεργοποιημένους STATs και περιέχει αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού. Πράγματι, ενεργοποιημένοι STAT5b και STAT3 συνδέονται με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ο οποίος ως γνωστό περιέχει δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού. Ωστόσο ένας τέτοιος μηχανισμός δεν έχει βρεθεί για καμία άλλη STAT πρωτεΐνη και ως εκ τούτου δεν μπορεί να γενικευθεί.

Η συσσώρευση των STAT στον πυρήνα, διεγείρεται από τον διμερισμό των STAT1 σε απάντηση στη φωσφορυλίωση σε τυροσινικά αμινοξέα. Ωστόσο η φωσφορυλίωση από μόνη της δεν είναι αναγκαία για τη μεταφορά των STAT στον πυρήνα, καθώς STAT πρωτεΐνες που είχαν διμεριστεί τεχνητά, δηλ. χωρίς φωσφορυλίωση, εξακολουθούν να μεταφέρονται στον πυρήνα.

Τέλος αξίζει να αναφερθεί, ότι σύμφωνα με τελευταίες έρευνες υφίσταται μία διαρκής παλινδρόμηση των STAT πρωτεϊνών μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος ανεξάρτητη από εξωκυτάρια διέγερση και φωσφορυλίωση. Η εύρεση μη φωσφορυλιωμένων STAT πρωτεϊνών στον πυρήνα έρχεται σε συμφωνία με τον ήδη αναγνωρισμένο ρόλο τους ως μεταγραφικών συνενεργοποιητών (transcription co-factors).

STATs και γονιδιακή ρύθμιση

Μετά τον διμερισμό και τη μεταφορά τους στον πυρήνα, οι STATs προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες "ενισχυτές" και διεγείρουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις ίσως και να καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων αναγνωρίστηκαν πολλά γονιδια-στόχοι των IL-6 type κυτοκινών και σε ορισμένες περιπτώσεις βρέθηκαν και περιοχές των υποκινητών σε αυτά τα γονίδια που συνδέονται με ενεργούς STAT παράγοντες.

Ανάμεσα στα γονίδια στόχους των IL-6 type κυτοκινών, αυτά που ρυθμίζονται μέσω των STAT παραγόντων είναι : 1. γονίδια των πρωτεϊνών οξείας φάσης (κυρίως τύπου II) όπως το γονίδιο της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, της $\alpha 1$ - αντιχυμοθρυψίνης, της πρωτεΐνης που συνδέεται με τη λιποπολυσακχαρίδη (LBP) και του ιστικού αναστολέα της μεταλλοπρωτεΐνάσης (TIMP)-1, 2. γονίδια για μεταγραφικούς παράγοντες όπως Jun B, c-Fos, IRF-1 (interferon regulatory factor) και C/EBP δ (CCAAT enhancer binding protein) και 3. γονίδια για μία ποικιλία διαφορετικών μορίων όπως το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP), η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp90, καθώς και για τους αρνητικούς ρυθμιστές της Jak/Stat οδού, socs1/jab/ssi1 και socs3/jab2/cis3/ssi2. Είναι αρκετά ενδιαφέρον ότι τα

γονίδια του υποδοχέα gp130 και του STAT3 είναι επίσης στόχοι της Jak/Stat οδού δημιουργώντας έτσι ένα μηχανισμό αυτορύθμισης.

Από τη μελέτη των υποκινητών των γονιδίων-στόχων των IL-6-type κυτοκινών μπορούν να εξαχθούν δύο συμπεράσματα. Πρώτον, οι περιοχές πρόσδεσης των STATs βρίσκονται συχνά κοντά σε ανάλογες περιοχές άλλων μεταγραφικών παραγόντων, φανερώνοντας μία αλληλεπίδραση των παραγόντων για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα έχει προταθεί η συνεργασία του STAT3 με τον παράγοντα C/EBPβ/NF-IL-6 και τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Δεύτερον, οι θέσεις πρόσδεσης στο DNA των STATs βρίσκονται συχνά διαδοχικά, κάτι που φανερώνει ότι ίσως τα διμερή των STATs δρουν ως πολυμερή με σύνδεση σε πολλαπλές θέσεις DNA. Τέτοιος πολυμερισμός έχει αναφερθεί για τον STAT1 και το αμινο-τελικό άκρο του μορίου του STAT1 φαίνεται πως έχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή.

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ ΤΗΣ MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MARK)

Γενικά

Ο διμερισμός του υποδοχέα της IL-6 δεν οδηγεί μόνο στην ενεργοποίηση της οδού των Jak/Stat, αλλά και στην επαγωγή της οδού της MAPK. Οι πρώτες έρευνες πάνω στην ενεργοποίηση της MAPK μέσω της gp130 φανέρωσαν τον σημαντικό ρόλο της φωσφατάσης SHP2 σε αυτή τη λειτουργία.

Ο ρόλος της Gab1 στην ενεργοποίηση της MAPK

Όπως αναφέρθηκε και η πρωτεΐνη Gab1 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της MAPK από την IL-6. Πράγματι σε εμβρυονικούς ινοβλάστες διαγονιδιακών μυών με έλλειψη του γονιδίου της Gab1, η δραστηριότητα της ERK MAPK μετά από ενεργοποίηση με IL-6 ήταν μειωμένη. Με την ανακάλυψη αυτή φανερώθηκε η πολυπλοκότητα της ενεργοποίησης της MAPK από την IL-6.

Η Gab1 (Grb2-associating binder 1) είναι μία πρωτεΐνη συνδέτης με μοριακό βάρος 90-120 kDa. Εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, περιέχει τυροσινικά αμινοξέα που υφίστανται φωσφορυλίωση καθώς και πολλαπλά λειτουργικά μοτίβα, όπως μία περιοχή πλούσια σε προλίνη και περιοχές σύνδεσης με την Grb2, SHP2, PI3K, κ.ά.. Σε απάντηση στη διέγερση με IL-6, η Gab1 φωσφορυλιώνεται σε τυροσινικά αμινοξέα. Είναι ενδιαφέρον, ότι για τη φωσφορυλίωση της Gab1 δεν είναι απαραίτητη μία απ'ευθείας σύνδεση της με τον υποδοχέα gp130, ενώ πρέπει να αναφερθεί ότι και η Gab2 φωσφορυλιώνεται από τις Jak στην περίπτωση των gp130 υποδοχέων.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η Gab1 συμμετέχει στην ενεργοποίηση της MAPK δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σύμφωνα με ορισμένες έρευνες η φωσφορυλιωμένη Gab1 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την SHP2 και την p85 υπομονάδα της PI3K. Το σύμπλεγμα των SHP2/Gab1/PI3K οδηγεί στην ενεργοποίηση της οδού Ras/Raf/ERK MAPK όπως αποδεικνύεται από μελέτες όπου η έκφραση των Gab1 και Gab2 ενεργοποιεί την ERK MAPK, ενώ η wortmannin (αναστολέας της PI3K) καθώς και μία dominant negative μορφή της PI3K αναστέλλουν την ενεργοποίηση αυτή. Ωστόσο ο μηχανισμός αυτός δεν μπορεί να γενικευθεί αφού η σύνδεση της SHP2 με την PI3K παρουσιάζει κυτταρική εξειδίκευση.

Η οικογένεια των IL-6 type κυτοκινών δεν ενεργοποιεί μόνο τις ERK1/2 δηλ. MAPK που εμπλέκονται στις κυτταρικές διεργασίες και προάγουν την κυτταρική επιβίωση, αλλά και

τα μέλη των MAPK κινασών που ενεργοποιούνται από το stress: p38 και JNK. Οι σηματοδοτικές ακολουθίες που καταλήγουν στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών αυτών ωστόσο είναι ακόμα ελάχιστα κατανοητές.

Επίδραση της οδού gr130-MAPK στα γονίδια

Μεταξύ των πολλαπλών επιδράσεων της οδού της MAPK στη γονιδιακή ρύθμιση (της οποίας η ανάλυση ξεφεύγει από τους στόχους της εργασίας), αξίζει να αναφερθεί, ότι η ενεργοποίηση της MAPK από την IL-6 οδηγεί και στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-IL6 (nuclear factor-IL-6).

Η ενεργοποίηση του NF-IL6 απαιτεί φωσφορυλίωση από αρκετές κινάσες εκ των οποίων και η MAPK. Έρευνες απέδειξαν ότι η MAPK φωσφορυλιώνει τον NF-IL6 στην Thr235 (θρεονίνη στη θέση-αμινοξύ 235 του μορίου), με αποτέλεσμα την αποκάλυψη της περιοχής του παράγοντα που είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της μεταγραφής. Η έκφραση του NF-IL6 διεγείρεται σημαντικά από την LPS, TNF, IL-1 και IL-6 και πιθανώς ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε ανοσολογικές απαντήσεις όπως η παραγωγή των πρωτεϊνών οξείας φάσης.

Ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της κινάσης 3 της φωσφατιδυλinoσιτόλης (PI3K)

Η ιντερλευκίνη-6 οδηγεί και στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της PI3K. Η κινάση αυτή τροποποιεί συγκεκριμένα φωσφολιπίδια, κάτι που έχει ως συνέπεια την ανάκτηση της πρωτεϊνικής κινάσης B/Akt στην πλασματική μεμβράνη. Εκεί η B/Akt ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την PDK1 (φωσφοινοσιτόλη-εξαρτώμενη κινάση 1).

Η Akt είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε μία ανενεργή μορφή. Μετά από διέγερση από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, μεταξύ των οποίων και η IL-6, η Akt ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης στην Thr308 (θρεονίνη) και Ser478 (σερίνη). Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει με τη σειρά της πρωτεΐνες στόχους όπως η caspase-9, ο μεταγραφικός παράγοντας FKHR (forkhead transcriptional factor), η πρωτεΐνη GSK-3b και ο προ-αποπτωτικός παράγοντας Bad, των οποίων η φωσφορυλίωση προάγει την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη.

Για παράδειγμα, σε καρδιακά μυοκύτταρα ο υποδοχέας gr130 διαβιβάζει σήματα μέσω αυτής της οδού, κάτι που προστατεύει από την απόπτωση που προκαλεί η δοξορουβικίνη.

Σε καρκινικά βασικά κύτταρα η οδός της PI3K συμμετέχει στην από την IL-6 επαγόμενη προστασία της κυτταρικής επιβίωσης με ενεργοποίηση του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Mcl-1. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι, η διέγερση της PI3K μετά από αγωγή με IL-6 παρουσιάζει κυτταρική εξειδίκευση. Έτσι, σε αντίθεση με την Hep3B σειρά ηπατικών κυττάρων, η σειρά HepG2 δεν παρουσιάζει ενεργοποίηση της PI3K μετά από διέγερση με IL-6.

Οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η IL-6 επάγει την ενεργοποίηση της PI3K δεν έχουν ακόμα πλήρως ανακαλυφθεί. Μετά από διέγερση με IL-6 η συνδετική (adaptor) πρωτεΐνη Gab1 συνδέεται με την PI3K89. Επίσης η PI3K σχετίζεται με τη συνδετική πρωτεΐνη IRS-1 (insulin receptor substrate-1) σε απάντηση στη διέγερση με OSM (IL-6 type κυτταροκίνη). Έτσι, ίσως τόσο η IRS-1 όσο και η Gab1 συνδέουν την gp130 με την PI3K. Επίσης οι Hideshima et al., πρότειναν τη συμμετοχή της SHP2 στην οδό μεταξύ της p130 και της PI3K, με βάση δεδομένα από τη διέγερση κυττάρων πολλαπλού μυελώματος με IL-6.

Σύνδεση του υποδοχέα gp130 με "non-Jak" κινάσες

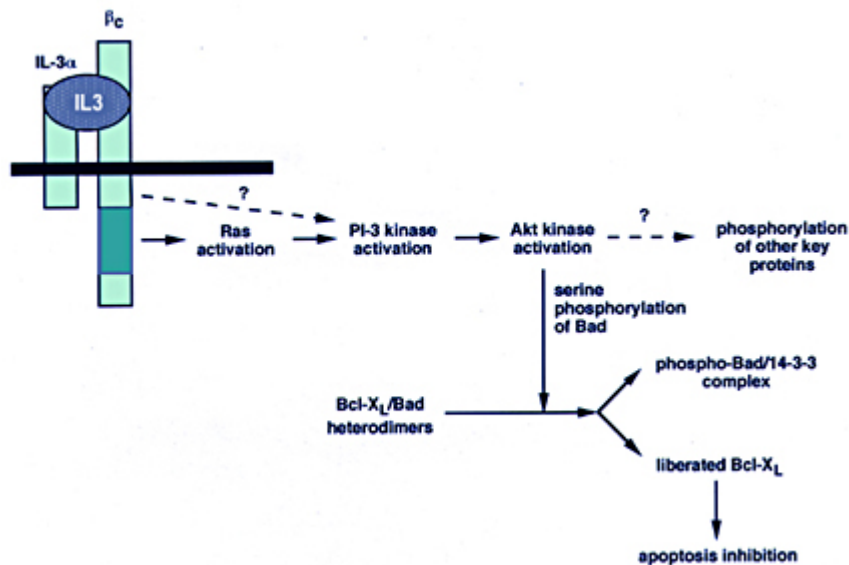
Υπάρχουν πολλές εργασίες που περιέγραψαν τη συμμετοχή και άλλων πρωτεϊνικών κινασών (όπως οι Src και οι Tec κινάσες) στη μετάδοση σημάτων των IL-6-type κυτοκινών. Η συμμετοχή των "non-Jak" κινασών στους μοριακούς μηχανισμούς δράσης της IL-6 αναμένεται να διευκρινιστεί στο μέλλον.

Πηγή: **Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της Ιντερλευκίνης-6 (IL-6)** Συγγραφείς: Θεόδωρος Βασιλακόπουλος, Δημήτριος Τουμπανάκης

INTERLEUKIN-3 (IL-3)

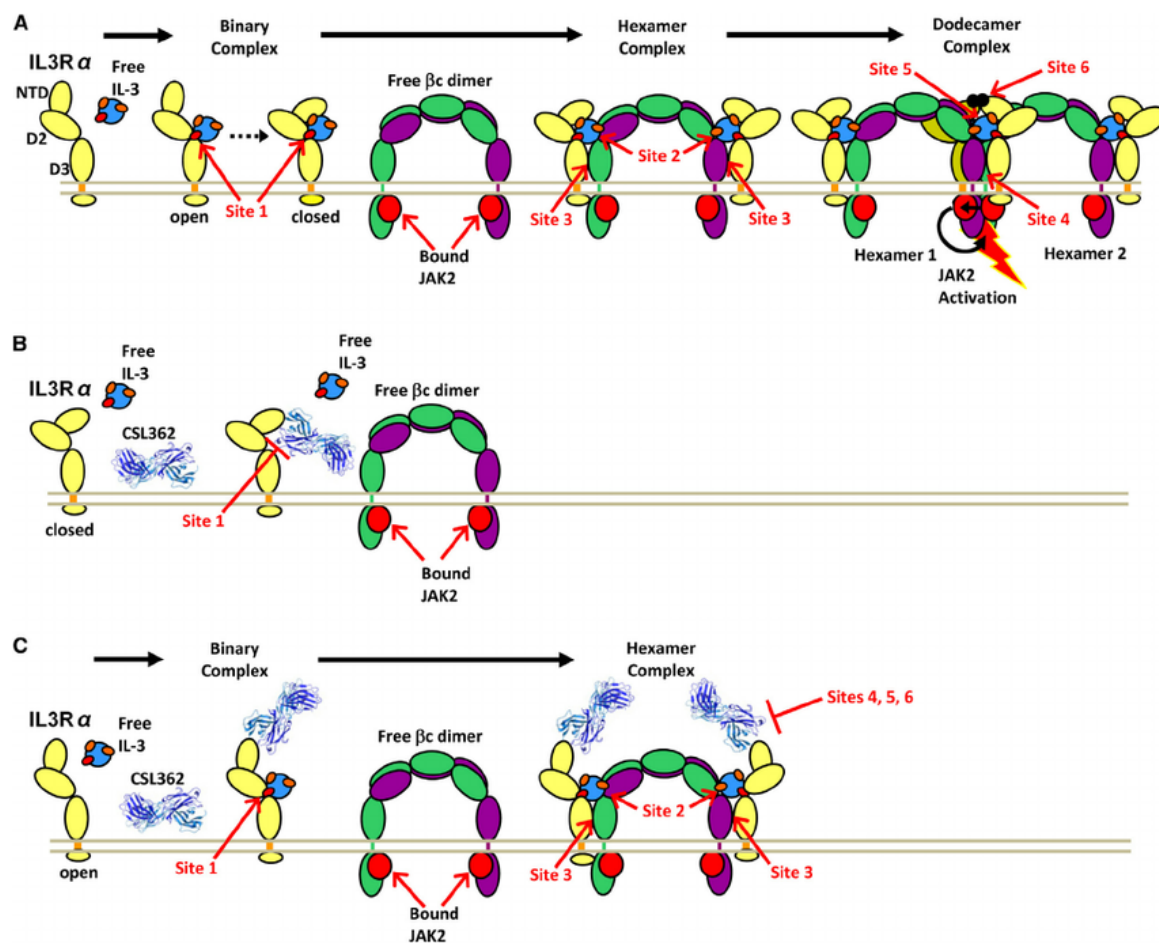
Μία κυτταροκίνη που παράγεται από ενεργοποιημένα Τ κύτταρα και προάγει τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών.

Ενδοκυττάρια σηματοδοτική αλληλουχία της IL-3



Ref: REGULATION OF SURVIVAL PATHWAYS BY IL-3 AND INDUCTION OF APOPTOSIS FOLLOWING IL-3 WITHDRAWAL, Daniel E. Johnson Departments of Medicine and Pharmacology, University of Pittsburgh, and the University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, PA, USA

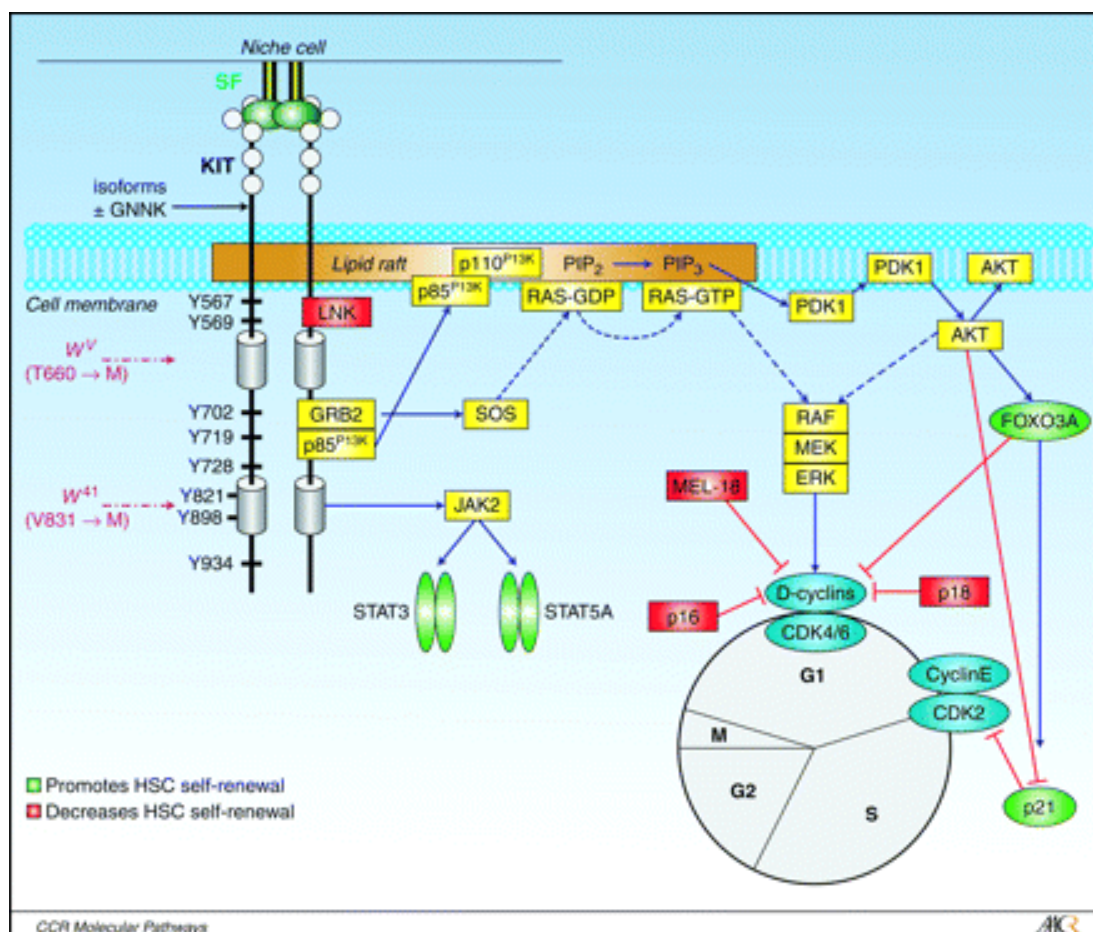
Μοριακός μηχανισμός δράσης της IL-3



Ref: Dual Mechanism of Interleukin-3 Receptor Blockade by an Anti-Cancer Antibody
Article · July 2014 · Cell Reports Sophie E. Broughton, Angel F. Lopez

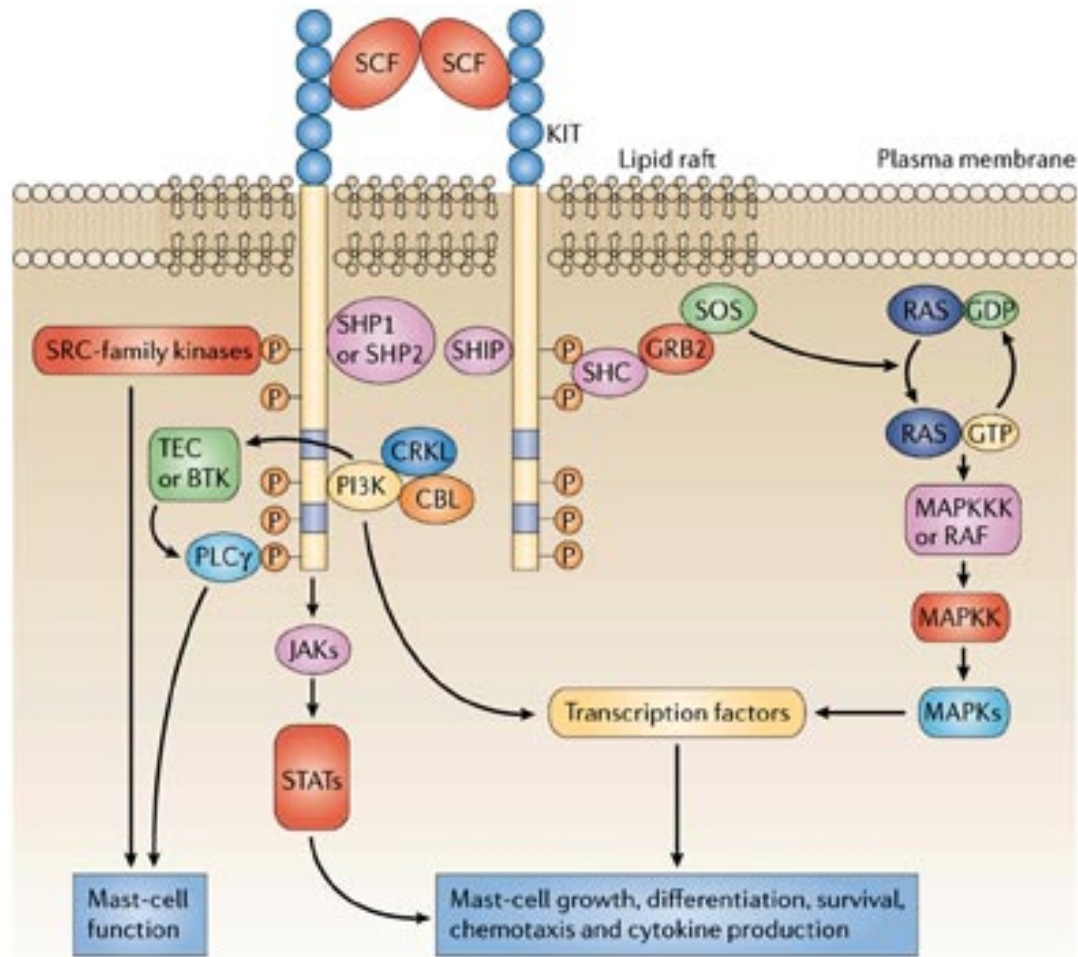
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ- SCF (C-KIT)

Ο παράγοντας SCF ή C-KIT (CD117) προάγει τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών στελεχαίων κυττάρων μέσω του παρακάτω μοριακού μηχανισμού δράσης:



Ref: Clin Cancer Res April 1, 2008 vol. 14 no. 7 1926-1930

Μηχανισμός πρόσδεσης του αυξητικού παράγοντα SCF στον υποδοχέα C-KIT μετά από ετεροδιμερισμό.

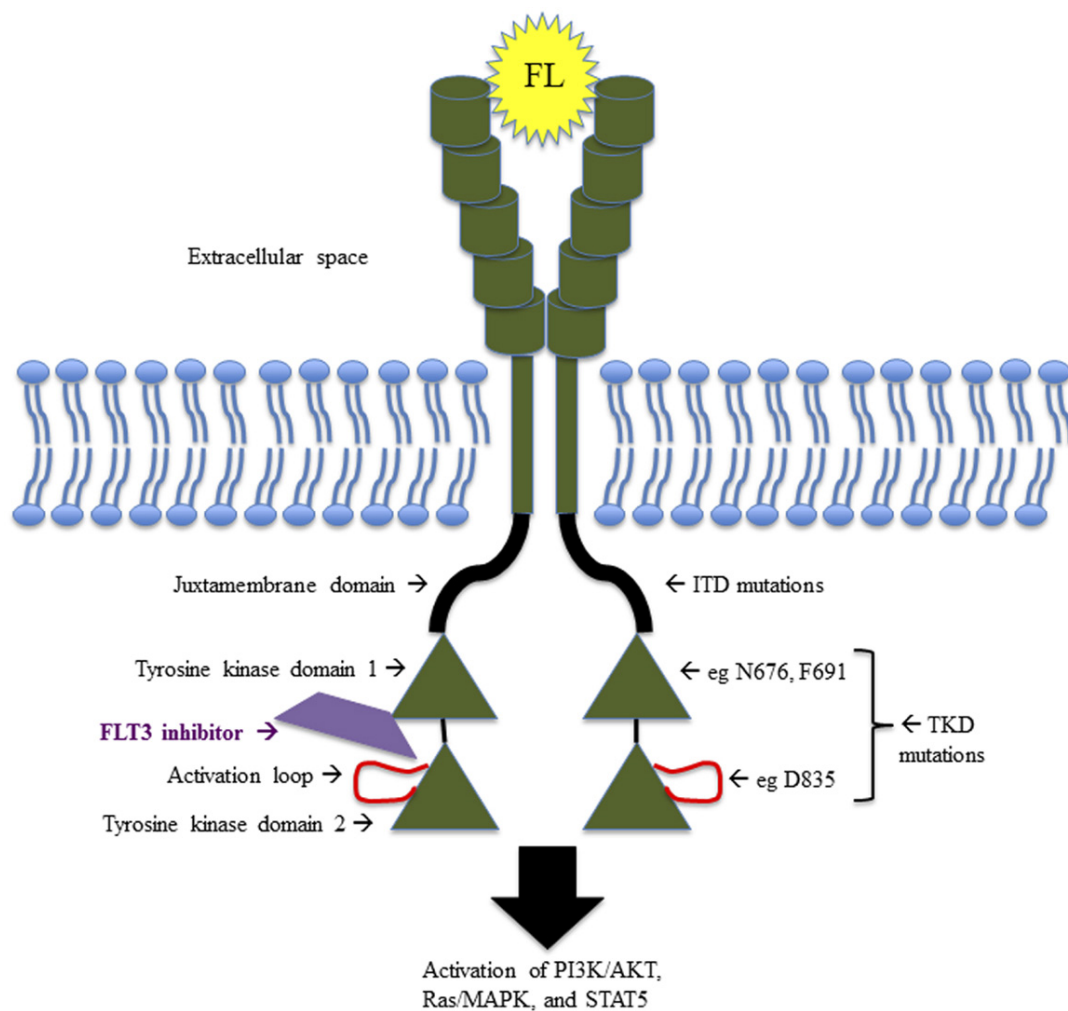


Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Ref: Nature Reviews

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ FLT-3 LIGAND

Αποτελεί τον προσδέτη του υποδοχέα flt3/flk2, που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης τύπου III και προάγει τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών στελεχαιών κυττάρων μέσω του παρακάτω μοριακού μηχανισμού δράσης:



Ref: Front. Oncol.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μίας σύντομης μεθόδου για την με βάση την φιλγραστίμη κατάλληλη φαρμακολογική προετοιμασία, εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των αποψυγμένων ΣΑΚ του ΟΠΑ. Με την χρήση των εξωσωματικώς πολλαπλασιασμένων ΣΑΚ του ΟΠΑ αναμένεται να ενισχυθεί η ολική επιβίωση των ασθενών ελεύθερης νόσου, να μειωθούν οι δείκτες νοσηρότητας και θνησιμότητας των μεταμοσχευμένων και να αυξηθεί σημαντικά η λειτουργική ανάκτηση των μοσχευμάτων του ΟΠΑ στους ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής σχεδιάστηκαν και αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τις προβλεπόμενες διαδικασίες, οι έλεγχοι της επαναληψιμότητας, της αναπαραγωγικότητας και της ακρίβειας των μεθόδων για τα παρακάτω ερευνητικά πρωτόκολλα:

I. Πρωτόκολλο απομόνωσης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα με σκοπό την κρυοσυντήρηση τους σε υγρό άζωτο.

II. Πρωτόκολλο αιματολογικού αναλυτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λευκοκυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος μετά την ερυθραφαίρεση.

III. Πρωτόκολλο κυτταρομετρίας ροής για τον ανοσοφαινοτυπικό προσδιορισμό των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

IV. Πρωτόκολλο αυτόματου βακτηριολογικού ελέγχου αναεροβίων και αεροβίων βακτηρίων των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

V. Πρωτόκολλο προσδιορισμού δυναμικού διαφοροποίησης (αιμοποιητικής πολυδυναμίας) των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και καλλιέργειας αποικιών με τη μέθοδο METHOCULT.

VI. Πρωτόκολλο αυτόματου προσδιορισμού της βιωσιμότητας των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+ με το λουμινομετρικό σύστημα GloMax.

VII. Πρωτόκολλο εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων STEMSPAN SFEM II - CC100.

VIII. Αξιολόγηση *in vitro* του τελικού πρωτοκόλλου εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων STEMSPAN SFEM II - CC100.

IX. Αποτελέσματα εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των ΣΑΚ του ΟΠΑ μετά από φαρμακολογική προετοιμασία με τους παράγοντες φιλγραστίμη.

Ακολούθως περιγράφονται αναλυτικά:

I. Πρωτόκολλο απομόνωσης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα με σκοπό την κρυοσυντήρησή τους σε υγρό άζωτο.

Το πρωτόκολλο I χρησιμοποιείται για την επεξεργασία και απομόνωση των CD45+CD34⁺ κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, με τη χρήση του Hydroxyethyl starch (HES) 10%, ως παράγοντα διαχωρισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων και σκοπό την κρυοσυντήρησή τους σε υγρό άζωτο.

Η παρούσα διαδικασία διεξάγεται αμέσως μετά την συλλογή και άφιξη του αμόλυντου σε μολυσματικά νοσήματα, ομφαλοπλακουντιακού αίματος στο εργαστήριο.

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ:

DMSO, Millipore φίλτρα (υδρόφιλη μεμβράνη πολυφλουοροαιθυλενίου), Σύριγγες των 60mL, cryotubes, κρυοανθεκτικές ετικέτες, barcode printer, αιμοστατικές λαβίδες, αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur, φυγόκεντρος ασκών, ζυγός ακριβείας, άδειοι ασκοί, falcon 50 mL, σύστημα άσηπτης συγκόλλησης ασκών.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ:

1. Ζυγίζουμε τον ασκό με το αίμα: A gr
2. Αφαιρούμε 30 gr (βάρος του ασκού)

$$A - 30 (\text{ασκός}) = B (\text{βάρος αίματος} + \text{αντιπηκτικού}).$$

3. Μετατρέπουμε το σε όγκο, διαιρώντας με το ειδικό βάρος (1,053).

$$B : 1,053 = C (\text{όγκος αίματος και αντιπηκτικού})$$

4. Υπολογίζουμε τον όγκο που συνέλλεξε ο γιατρός αφαιρώντας από το C το 21 (όγκος αντιπηκτικού).

$$C - 21 = E (\text{όγκος συλλογής γιατρού})$$

5. Φυγοκεντρούμε τον ασκό στα 450 RCF για 10 λεπτά να γίνει καθίζηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τη χρήση HETASTARCH.

6. Μετά την φυγοκέντρωση, διαχωρίζουμε το πλάσμα από τη στιβάδα των ερυθρών με αιμοστατικές λαβίδες και μεταφέρουμε σε σωλήνες falcon των 50.

7. Φυγοκεντρούμε τα falcons στα 450 RCF για 10 λεπτά.

8. Μετά την φυγοκέντρωση, διαχωρίζουμε με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur και μεταφέρουμε τον ορό σε falcon για να χρησιμοποιηθεί για μικροβιολογικό και ορολογικό έλεγχο.

9. Το συμπύκνωμα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μεταφέρεται σε cryotubes.

10. Προσθέτουμε την απαιτούμενη ποσότητα του DMSO:HES 10% στα κύτταρα (από διάλυμα 1:1 προσθέτουμε το ¼ του τελικού όγκου του συμπυκνώματος), τα οποία έχουμε πάνω σε μια παγοκύστη για να διατηρείται το δείγμα σε θερμοκρασία 4 °C.

11. Κρατάμε λίγα μL για την κυτταρομετρία και τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας.

12. Σε κάθε cryotube επικολλάται μια ειδική κρυοανθεκτική ετικέτα στην οποία έχει εκτυπωθεί το barcode του δείγματος με τα αναλυτικά στοιχεία. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την καταχώριση και εκτύπωση του barcode είναι το freezerworks, το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης των καταχωρημένων στοιχείων οποιαδήποτε στιγμή με την ειδική συσκευή ταυτοποίησης (barcode scanner).

13. Αφού συμπληρωθεί ο κατάλληλος αριθμός cryotubes, μεταφέρονται στο μηχάνημα βαθμιαίας κατάψυξης Rate Freezer.

Ξεκινάμε την βαθμιαία κατάψυξή τους, που σκοπό έχει τα κύτταρα να αποκτήσουν σταδιακά τους -150°C.

II. Πρωτόκολλο αιματολογικού αναλυτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λευκοκυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος πριν την ερυθραφαίρεση.

Το πρωτόκολλο II χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό έλεγχο του αρχικού αίματος από τον ομφάλιο λώρο πριν οποιαδήποτε κατεργασία, με σκοπό την μέτρηση του αριθμού του λευκοκυτταρικού πληθυσμού.

Η παρούσα διαδικασία διεξάγεται αμέσως μετά την συλλογή και άφιξη του δείγματος στο εργαστήριο και πριν την περαιτέρω επεξεργασία.

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ:

Σωληνάρια erppendorf, αποστειρωμένες σύριγγες των 2,5 ml με βελόνα, αυτόματος αιματολογικός αναλυτής Beckman Coulter Ac-T 5diff, Coulter ACT 5 Diff Dilluent (8547169), Coulter ACT 5 Diff Fix (8547171), Coulter ACT 5 Diff Hgb Lyse (8547168), Coulter Clenz Cleaning Agent (8448222), Coulter ACT 5 Diff Wbc Lyse (8547170), Coulter AcT 5diff Control Plus Normal (7502484-C)

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ:

Ο αυτόματος αιματολογικός αναλυτής Beckman Coulter Ac-T 5diff απαιτεί τουλάχιστον 53 μl ολικού αίματος για να πραγματοποιήσει τις απαραίτητες αναλύσεις. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C). Από το τελικό κυτταρικό προϊόν, με αποστειρωμένη σύριγγα και σε θάλαμο νηματικής ροής λαμβάνονται περίπου 0,5 ml ολικού αίματος και τοποθετούνται σε σωληνάκι erpendorf. Τα δημογραφικά στοιχεία του δείγματος καταγράφονται στον κεντρικό υπολογιστή του πληροφοριακού συστήματος LIS (sLIS/ Infomed). Με τον τρόπο αυτό κάθε δείγμα λαμβάνει έναν αύξοντα αριθμό κάθε ημέρα, που υποδηλώνει και τη σειρά που θα τοποθετηθεί στον αναλυτή. Το δείγμα αναδεύεται αρκετές φορές με περιστροφή και ακολουθεί μέτρηση τοποθετώντας το δείγμα στην κατάλληλη βελόνα του αναλυτή και πιέζοντας ταυτόχρονα το διακόπτη μέτρησης που βρίσκεται πίσω από την κατακόρυφη βελόνα. Σε ένα λεπτό λαμβάνονται τα αποτελέσματα στην οθόνη του αναλυτή και μεταφέρονται αυτόματα στον κεντρικό υπολογιστή του συστήματος LIS, από όπου και επιβεβαιώνονται και εκτυπώνονται.

Συγκεκριμένα, υπολογίζονται τα εξής:

- Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων
- Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων
- Αιμοσφαιρίνη (HGB)
- Αιματοκρίτης (HCT)
- Μέσος όγκος ερυθρών (MCV)
- Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH)
- Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (MCHC)
- Εύρος κατανομής ερυθρών (RDW)
- Αριθμός αιμοπεταλίων (PLT)
- Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (MPV)
- Πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα (NEUT)
- Λεμφοκύτταρα (LYM)
- Μεγάλα μονοπύρηνα (MONO)

- Πολυμορφοπύρρηνα ηωσινόφιλα (EOS)
- Πολυμορφοπύρρηνα βασεόφιλα (BASO)

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, ένα δείγμα εξετάστηκε δέκα διαδοχικές φορές κατά τη διάρκεια μιας ημέρας και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Συγκεκριμένα, παρακάτω φαίνεται ο πίνακας επαναληψιμότητας:

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	20/10/2008		
											mean	SD	CV%
RBC	2,5	2,47	2,46	2,49	2,47	2,47	2,46	2,5	2,48	2,48	2,48	0,01	0.40
HGB	9,3	9,1	9,2	9,3	9,2	9,2	9,2	9,2	9,3	9,3	9,2	0,1	1,08
HCT	27,3	26,9	26,9	27,4	27,1	27,1	26,9	27,3	27,2	27,2	27,1	0,2	0,73
MCV	109	109	109	110	110	110	109	109	109	110	109	1	0,92
MCH	37,2	37	37,4	37,4	37,4	37,5	37,4	36,9	37,3	37,5	37,3	0,2	0,54
MCHC	34	34	34,3	34,1	34,1	34,2	34,4	33,8	34,1	34,2	34,1	0,2	0,59
RDW	11,4	12	11,8	11,4	11,7	11,4	11,8	12	11,6	11,5	11,7	0,2	1,71
WBC	8,5	8,4	8,6	8,6	8,5	8,7	8,5	8,5	8,5	8,6	8,5	0,1	1,18
NEUT	52,1	51,5	53	52,1	51,5	50,3	51,2	51,5	47,2	52,3	51,3	1,6	3,12
LYM	34,8	36,1	34,6	35,7	35,6	37,1	35,9	36,2	36,8	35,1	35,8	0,8	2,23
MONO	11	10	9,9	9,9	11,1	10,4	11	10,2	13,9	10,2	10,8	1,2	11,11
EOS	1,4	1,7	1,9	1,6	1,3	1,4	1,2	1,4	1,4	1,6	1,5	0,2	13,33
BASO	0,7	0,7	0,6	0,7	0,5	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,1	14,28
PLT	150	152	143	151	154	146	146	156	156	157	151	5	3,31
MPV	7,6	7,6	7,8	7,8	7,8	7,9	7,9	7,5	7,5	7,8	7,7	0,2	2,60

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου, ένα δείγμα ελέγχου (normal control) εξετάστηκε 10 φορές για δέκα ημέρες (μία φορά κάθε μέρα) και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Συγκεκριμένα, παρακάτω φαίνεται ο πίνακας αναπαραγωγικότητας:

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10			
	20/10	21/10	22/10	23/10	24/10	25/10	27/10	29/10	30/10	31/10	mean	SD	CV%
RBC	4,73	4,62	4,66	4,68	4,73	4,83	4,71	4,75	4,72	4,77	4,72	0,06	0,42
HGB	14,4	14,2	14,2	14,2	14,2	14,3	14,2	14,3	14,3	14,1	14,2	0,1	0,70
HCT	42,6	39,1	39,8	39,9	40,1	41,2	40,4	40,6	40,6	41,1	40,5	1,0	2,47
MCV	90	85	85	85	85	85	86	86	86	86	86	2	2,33
MCH	30,4	30,7	30,5	30,4	30,1	29,7	30,2	30,1	30,2	29,6	30,2	0,3	1,00
MCHC	33,8	36,2	35,8	35,6	35,5	34,8	35,2	35,1	35,1	34,4	35,2	0,7	1,99
RDW	12,5	12,8	13	12,9	13,8	13,3	13,2	13,6	13,5	13,3	13,2	0,4	3,03
WBC	7,6	7,5	7,5	7,5	7,6	7,6	7,7	7,9	7,8	7,9	7,7	0,2	2,60
NEUT	69,1	67,8	68,3	65,6	68,5	67,1	66,8	67,0	62,2	65,8	66,8	2,0	3,00
LYM	25,7	27,3	26,5	29,0	25,9	26,8	26,6	26,9	31,3	27	27	1,7	6,30
MONO	0,6	0,6	0,4	0,8	0,7	0,6	0,7	0,8	1,6	1,2	0,8	0,4	50
EOS	4,6	4,3	4,8	4,6	4,9	5,5	5,9	5,4	4,9	6,0	5,1	0,6	11,76
BASO													
PLT	248	220	230	217	229	237	260	212	233	210	230	16	6,96
MPV	8,8	8,5	8,7	8,5	8,5	8,7	8,8	8,7	8,5	8,4	8,6	0,1	1,16

ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η διευρυμένη αβεβαιότητα της μεθόδου με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$U=2U_c$$

όπου U η διευρυμένη αβεβαιότητα και U_c η τυπική αβεβαιότητα, η οποία ισούται:

$$U_c = \sqrt{\left(\frac{SD}{\bar{X}}\right)^2}$$

όπου SD η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων και $\bar{X}$ η μέση τιμή της αναπαραγωγικότητας.

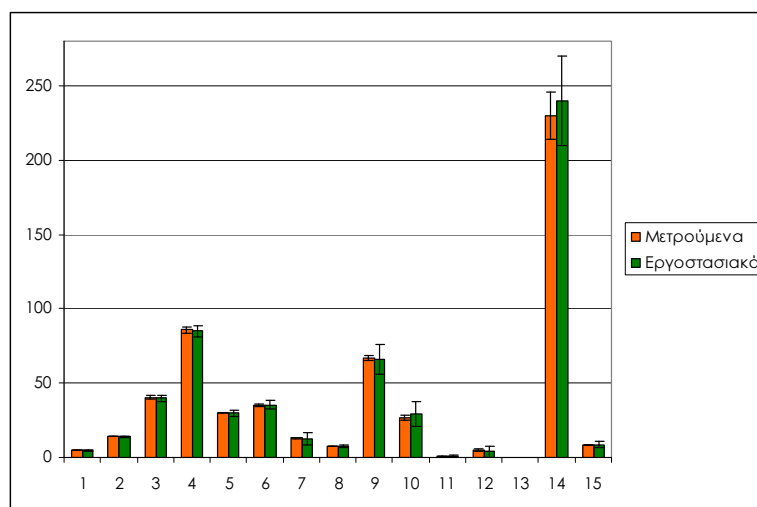
Επομένως, συγκεντρωτικά, για τις εξεταζόμενες παραμέτρους, οι τιμές της αβεβαιότητας και της διευρυμένης αβεβαιότητας φαίνονται παρακάτω

	U _c	U
RBC	0,01	0,02
HGB	0,01	0,02
HCT	0,02	0,04
MCV	0,02	0,04
MCH	0,01	0,02
MCHC	0,02	0,04
RDW	0,03	0,06
WBC	0,03	0,06
NEUT	0,03	0,06
LYM	0,06	0,12
MONO	0,50	1,00
EOS	0,12	0,24
BASO		
PLT	0,07	0,14
MPV	0,01	0,02

ΑΚΡΙΒΕΙΑ (ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΩΝ ΤΙΜΩΝ CONTROLS ΜΕ ΤΙΣ ΕΝΔΕΔΕΙΓΜΕΝΕΣ):

Η σύγκριση της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των μετρούμενων τιμών για τις εξεταζόμενες παραμέτρους με τις αντίστοιχες ενδεδειγμένες τιμές φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

	Μετρούμενα		Εργοστασιακά	
	mean	SD	mean	SD
RBC	4,72	0,06	4,68	0,075
HGB	14,2	0,1	14	0,25
HCT	40,5	1,0	39,8	1,0
MCV	86	2	85	2
MCH	30,2	0,3	29,9	1,0
MCHC	35,2	0,7	35,2	1,5
RDW	13,2	0,4	12,5	2,0
WBC	7,7	0,2	7,3	0,5
NEUT	66,8	2,0	66,0	5,0
LYM	27	1,7	29,2	4,0
MONO	0,8	0,4	1,0	0,5
EOS	5,1	0,6	3,8	1,75
BASO	0			
PLT	230	16	240	15
MPV	8,6	0,1	8,7	1,0



Paired t-test

	t value	df	p
RBC	1,3170	18	0,2044
HGB	2,3489	18	0,2308
HCT	1,5662	18	0,1349
MCV	1,1180	18	0,2783
MCH	0,9087	18	0,3755
MCHC	0,0000	18	1,0000
RDW	1,0853	18	0,2921
WBC	1,2403	18	0,2308

NEUT	0,4698	18	0,6442
LYM	1,6007	18	0,1269
MONO	0,9877	18	0,3364
EOS	1,2340	18	0,6750
BASO	-	18	-
PLT	1,4419	18	0,1665
MPV	0,3147	18	0,7556

Δεν παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ως εκ τούτου το πρωτόκολλο κρίθηκε κατάλληλο για τις αναλύσεις που πραγματοποιούνται.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ:

Κάθε δεύτερη μέρα πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος καλής λειτουργίας του αιματολογικού αναλυτή Beckman Coulter Ac-T 5diff. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα Coulter AcT 5diff Control Plus High και Low τα οποία φυλάσσονται σε θερμοκρασία συντήρησης 2-8⁰C. Πριν την χρήση τους, αναδεύονται αρκετές φορές με αναστροφή, ενώ η θερμοκρασία τους, πριν την ανάλυση πρέπει να είναι στους 22-25⁰C. Τα αποτελέσματα της μέτρησης πρέπει να είναι μέσα σε προκαθορισμένα όρια που δίνονται από τον κατασκευαστή (ενδεδειγμένο εύρος). Ο έλεγχος καλό είναι να προηγείται των κανονικών μετρήσεων, ειδικά χρειάζεται τουλάχιστον μισή ώρα ύστερα από την τελευταία μέτρηση ώστε να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος.

Οι τιμές αυτές των controls τοποθετούνται σε διαγράμματα Levey-Jennings (στα οποία τοποθετούνται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις $\pm 1SD$ και $\pm 2SD$ και αξιολογούνται σύμφωνα με τους κανόνες του Westgard.

Σε περίπτωση που οι τιμές του δείγματος ελέγχου αποκλίνουν από το ενδεδειγμένο εύρος του κατασκευαστή, τότε βαθμονομείται ο αιματολογικός αναλυτής. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται υπολογίζοντας και αλλάζονται ανάλογα έναν ή περισσότερους παράγοντες βαθμονόμησης (Calibration Factors), μπαίνοντας στο μενού για τη βαθμονόμηση (CALIBRATION): WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, RDW και MPV. Ο υπολογισμός πραγματοποιείται με τη μέθοδο των τριών, όπου οι τρεις παράμετροι είναι η υπολογισμένη τιμή για την αντίστοιχη παράμετρο, η ενδεδειγμένη τιμή για την ίδια

παράμετρο και ο παράγοντας για την ίδια παράμετρο, ενώ η άγνωστη παράμετρος είναι η νέα τιμή του παράγοντα.

Επιπλέον, σε όλες τις παραπάνω δοκιμές πραγματοποιείται εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος.

ΕΚΔΟΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ:

Συγκεκριμένα, εκδίδονται αποτελέσματα ως εξής:

- Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων: x.xx ($\times 10^6/\mu\text{l}$)
- Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων: x.x ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
- Αιμοσφαιρίνη (HGB): x.x (gr/dL)
- Αιματοκρίτης (HCT): x.x (%)
- Μέσος όγκος ερυθρών (MCV): x (fL)
- Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH): x.x (pg)
- Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (MCHC): x.x (gr/dL)
- Εύρος κατανομής ερυθρών (RDW): x.x (%)
- Αριθμός αιμοπεταλίων (PLT): x ($\times 10^6/\mu\text{l}$)
- Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (MPV): x.x (fL)
- Πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (NEUT): x.x (%)
- Λεμφοκύτταρα (LYM): x.x (%)
- Μεγάλα μονοπύρρηνα (MONO): x.x (%)
- Πολυμορφοπύρρηνα ηωσινόφιλα (EOS): x.x (%)
- Πολυμορφοπύρρηνα βασεόφιλα (BASO): x.x (%)

III. Πρωτόκολλο κυτταρομετρίας ροής για τον ανοσοφαινοτυπικό προσδιορισμό των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Το πρωτόκολλο III χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό έλεγχο του επεξεργασμένου και εμπλουτισμένου αίματος από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, με σκοπό τον εντοπισμό των εμυρήνων (CD45^+) και στελεχιαίων αιμοποιητικών ($\text{CD45}^+/\text{CD34}^+$) κυττάρων.

Η παρούσα διαδικασία διεξάγεται μετά την επεξεργασία του δείγματος και την απομόνωση του λευκοκυτταρικού κλάσματος (buffy coat).

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ:

Σωληνάρια RIA, STEM – KITTM (REF: IM3630), Flow Check (REF: 6605359), Flow-Set (REF: 6607007), Stem-Trol (Ref#IM3632), μικροπιπέτα 100-1000μL (διακριβωμένη), πιπέτα 2-20μL (διακριβωμένη), πιπέτα 20-200μL (διακριβωμένη), πιπέτα 0,5-10 μL (διακριβωμένη).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ:

Για κάθε δείγμα ετοιμάζουμε 3 σωληνάκια RIA. Στα δύο πρώτα μεταφέρουμε με διακριβωμένη πιπέτα 100μL λευκοκυτταρικού κλάσματος (buffy coat) και προσθέτουμε με διακριβωμένη πιπέτα 20μL από το μείγμα των Μονοκλωνικών Αντισωμάτων Anti-human CD45-FITC και Anti-human CD34-PE, καθώς και 20μL 7AAD. Στο τρίτο σωληνάκι βάζουμε με διακριβωμένη πιπέτα 100μL λευκοκυτταρικού κλάσματος (buffy coat), 20μL ισοκλωνικό αντίσωμα CD45-FITC/isoclonic control-PE Reagent και 20μL 7AAD. Κάνουμε vortex για 5 sec και επωάζουμε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολουθεί προσθήκη με διακριβωμένη πιπέτα 2ml του αραιωμένου 1/10 (1x) λυτικού διαλύματος (NH₄Cl) και κάνουμε vortex για 5 sec. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Αναδεύουμε ήπια με αναστροφή 3-5 φορές το φιαλίδιο Stem-Count Fluorospheres και προσθέτουμε με διακριβωμένη πιπέτα 100μL σε κάθε ένα από τα τρία σωληνάκια. Στη συνέχεια τοποθετούνται τα σωληνάρια στις αριθμημένες καρουζέλες και ακολούθως αυτές τοποθετούνται στο μηχάνημα. «Τρέχουμε» το πάνελ για την αυτόματη ανάλυση δηλώνοντας τον αριθμό της καρουζέλας, τη θέση του κάθε σωληναρίου και το calibration factor των Stem-Count Fluorospheres.

ΟΡΘΟΤΗΤΑ:

Η ορθότητα της μεθόδου είναι επικυρωμένη από τον κατασκευαστή (STEM-KIT, REF: IM3630).

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, ένα συντηρημένο δείγμα εξετάστηκε δέκα διαδοχικές φορές κατά τη διάρκεια μιας ημέρας και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου, δείγματα ελέγχου (CD34⁺) εξετάστηκαν 8 φορές για οκτώ ημέρες (μία φορά κάθε μέρα) και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Συγκεκριμένα, παρακάτω φαίνεται ο πίνακας αναπαραγωγιμότητας:

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	mean	SD	CV%	LOD	LOQ
CD34 ⁺ (Cells/μl)	215	208	203	193	179	178	184	203	195,4	14,0	7,1	41,9	140

ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η διευρυμένη αβεβαιότητα της μεθόδου με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$U=2U_c$$

όπου U η διευρυμένη αβεβαιότητα και U_c η τυπική αβεβαιότητα, η οποία ισούται:

$$U_c = \sqrt{\left(\frac{SD_r}{\bar{X}_1}\right)^2 + \left(\frac{SD_{d1}}{\bar{X}_2}\right)^2 + \left(\frac{SD_{d2}}{\bar{X}_3}\right)^2 + \left(\frac{SD_{d3}}{\bar{X}_4}\right)^2 + \left(\frac{SD_{d4}}{\bar{X}_5}\right)^2}$$

όπου SD_r η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων, $\bar{X}_1$ η μέση τιμή της επαναληψιμότητας, SD_{d1} η τυπική απόκλιση της διακρίβωσης για την πιπέτα 100-1000 μl και $\bar{X}_2$ η μέση τιμή

των διακριβωμένων τιμών της πιπέτας 100-1000 μL , SD_{d2} , SD_{d3} , $\bar{X}_3$ και $\bar{X}_4$, οι αντίστοιχες τιμές για τις πιπέτες 1-10 μL , 2-20 μL και 20-200 μL .

Επομένως, συγκεντρωτικά, για τις εξεταζόμενες παραμέτρους, οι τιμές της αβεβαιότητας και της διευρυμένης αβεβαιότητας φαίνονται παρακάτω:

	U_c	U
CD34^+	0,94	1,88

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ:

Καθημερινά πραγματοποιείται έλεγχος με τα σφαιρίδια FlowCheck (REF: 6605359), ακολουθώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο, ενώ εβδομαδιαία πραγματοποιείται έλεγχος με τα σφαιρίδια Flow-Set (REF: 6607007). Μια φορά την εβδομάδα πραγματοποιείται και έλεγχος θετικών δειγμάτων με STEM-TROL (REF: IM3632).

Μηνιαίως (ή σε κάθε αλλαγή KIT) πραγματοποιείται βαθμονόμηση της εφαρμογής stemCXP, χρησιμοποιώντας Flow-SetTM, QuickCOMP 2 Kit (REF: 177017), καθώς και Stem-TrolTM Control Cells. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούμε 4 σωληνάκια: 1- FlowSet, 2 έως 4: 100 μL αίματος με τις τρεις διαδοχικές χρωστικές του QuickCOMP 2 Kit με 15 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και στο 4: 100 μL αίμα+20 μL αντισώματα του STEM-KIT+20 μL 7AAD+20 μL STEM-trol με επώαση 20 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και ακολουθεί προσθήκη 2ml (1x) NH_4Cl με επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Στο τέλος προσθέτουμε και 100 μL StemCount Fluorospheres.

Ετησίως (ή όποτε υπάρχει ανάκαμψη από σοβαρή βλάβη) πραγματοποιείται έλεγχος με το IMMUNO-BRITETM (REF: 6603473).

Τα αποτελέσματα της μέτρησης πρέπει να είναι ανάμεσα σε προκαθορισμένα όρια που δίνονται από τον κατασκευαστή. Ο έλεγχος καλό είναι να προηγείται των κανονικών μετρήσεων, ώστε τα κύτταρα από τα δείγματα να μην παρεμβάλλονται στις μετρήσεις για τον έλεγχο.

Στα υγρά απόβλητα του εργαστηρίου προστίθεται χλωρίνη του εμπορίου και απορρίπτονται στην αποχέτευση.

Επιπλέον, σε όλες τις παραπάνω δοκιμές πραγματοποιείται εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος με το σύστημα NEQAS.

Οι τιμές αυτές των controls τοποθετούνται σε διαγράμματα Levey-Jennings (στα οποία τοποθετούνται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις $\pm 1SD$ και $\pm 2SD$ και αξιολογούνται σύμφωνα με τους κανόνες του Westgard).

Σε περίπτωση που αποτύχει ο έλεγχος ευθυγράμμισης των πολλαπλασιαστών (Flow Check) ή ο έλεγχος ευθυγράμμισης των ανιχνευτών (Flow Set) πραγματοποιείται επανάληψη της διαδικασίας. Αν και πάλι αποτύχουν, ελέγχεται ότι υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα IsoFlow (Sheath Fluid). Κάνουμε priming στο όργανο, ελέγχουμε ότι ΔΕΝ υπάρχουν καθόλου φυσαλίδες αέρα στα σωληνάρια και επαναλαμβάνουμε. Αν και πάλι αποτύχει η διαδικασία, τότε σταματούμε και καλούμε τεχνικό.

Σε περίπτωση που η μέτρηση έχει πρόβλημα ή δεν έχει καλή επαναληψιμότητα, αρχικά επαναλαμβάνεται. Αν και πάλι επιμένει το πρόβλημα, ελέγχουμε στο δείγμα μας, μήπως τυχόν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα. Ελέγχουμε, επίσης, μήπως τυχόν υπάρχει κάποιο πήγμα στα δείγμα. Αν και πάλι αποτύχουν, ελέγχεται ότι υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα IsoFlow (Sheath Fluid). Κάνουμε priming στο όργανο και επαναλαμβάνουμε. Αν και πάλι αποτύχει η διαδικασία, τότε σταματούμε και καλούμε τεχνικό.

Όταν, τέλος, το όργανο ΔΕΝ λειτουργεί ή αποτύχει ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας, τότε καλούμε άμεσα τεχνικό και φροντίζουμε να διασφαλιστεί η αμεσότερη ανάλυση των δειγμάτων.

ΕΚΔΟΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ:

Τα αποτελέσματα που περιλαμβάνονται στη φόρμα αποτελεσμάτων αφορούν στον αριθμό των βιώσιμων εμπύρηνων λευκοκυττάρων ($CD45^+$), τα οποία εκφράζονται με τη μορφή $a, a \times 10^8$, καθώς και των βιώσιμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με τη μορφή $a, a \times 10^6$.

IV. Πρωτόκολλο αυτόματου βακτηριολογικού ελέγχου αναερόβιων και αερόβιων βακτηρίων των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων $CD45+CD34+$ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Το πρωτόκολλο IV χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση και ανίχνευση αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων σε υλικό από ομφαλοπλακουντιακό αίμα στο αυτόματο σύστημα αιμοκαλλιέργειών BacT/ALERT 3D.

Η παρούσα διαδικασία διεξάγεται χρησιμοποιώντας πλάσμα από το αρχικό δείγμα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος που παραλαμβάνεται στο εργαστήριο.

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ:

Αποστειρωμένες σύριγγες 10 ml, αλκοόλη, αποστειρωμένος βαμβakoφόρος στυλεός, BacT/ALERT SA (Standard Aerobic, Cat#259789), BacT/ALERT SN (Standard Anaerobic, Cat#259790).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ:

Το αυτόματο σύστημα αιμοκαλλιιεργειών BacT/ALERT 3D χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών σε δείγμα ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Το σύστημα και οι φιάλες καλλιέργειας παρέχουν τόσο ένα σύστημα μικροβιακής ανίχνευσης όσο και ένα μέσο καλλιέργειας με τις κατάλληλες θρεπτικές και περιβαλλοντικές συνθήκες για τους οργανισμούς που απαντώνται συνήθως στις λοιμώξεις του αίματος. Οι εμβολιασμένες φιάλες τοποθετούνται μέσα στο όργανο όπου επωάζονται και παρακολουθούνται συνεχώς για πέντε (5) μέρες για την παρουσία μικροοργανισμών. Σε περίπτωση θετικού δείγματος το χρώμα του αέριο-διαπερατού αισθητήρα που βρίσκεται στον πυθμένα της κάθε φιάλης μεταβάλλεται από μπλε-πράσινο σε κίτρινο (παράγεται CO₂). Συγκεκριμένα, στην ετικέτα κάθε φιάλης σημειώνεται το όνομα του κάθε δείγματος, ο αύξων αριθμός και η ημερομηνία επεξεργασίας. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε θάλαμο νηματικής ροής. Αφαιρούμε το πλαστικό καπάκι από κάθε φιάλη και απολυμαίνουμε το ελαστικό διάφραγμα με έναν αποστειρωμένο βαμβakoφόρο στυλεό εμποτισμένο με αλκοόλη. Στη συνέχεια με μία σύριγγα γίνεται λήψη του δείγματος (περίπου 10 ml σε κάθε φιάλη) και το μεταφέρουμε στις φιάλες εφαρμόζοντας άσηπτη τεχνική. Πρώτα γίνεται η μεταφορά του δείγματος στην αναερόβια φιάλη, έτσι ώστε το τυχόν οξυγόνο που έχει εγκλωβιστεί στη σύριγγα να μην μεταφερθεί στη φιάλη. Στη συνέχεια μεταφέρονται οι φιάλες στο σύστημα και αρχειοθετούνται με barcode στον H/Y του συστήματος. Η λίστα εργασίας ετοιμάζεται αυτόματα από το σύστημα LIS του εργαστηρίου, μαζί με τις αιματολογικές και ορολογικές εξετάσεις.

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, δέκα δείγματα εξετάστηκαν εις διπλούν. Τα δείγματα περιελάμβαναν πέντε αρνητικά και πέντε θετικά, σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα του συστήματος. Συγκεκριμένα, παρακάτω φαίνεται ο πίνακας επαναληψιμότητας:

Δείγμα	Αποτελέσματα	
	Θετικό	Αρνητικό
# 1α (SN)	+	
# 1β (SN)	+	
# 2α (SN)	+	
# 2β (SN)	+	
# 3α (SN)	+	
# 3β (SN)	+	
# 4α (SA)	+	
# 4β (SA)	+	
# 5α (SA)	+	
# 5β (SA)	+	
# 6α (SN)		-
# 6β (SN)		-
# 7α (SN)		-
# 7β (SN)		-
# 8α (SN)		-
# 8β (SN)		-
# 9α (SA)		-
# 9β (SA)		-
# 10α (SA)		-
# 10β (SA)		-

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ:

Η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου δεν μπορεί να ελεγχθεί, δεδομένου ότι τα δείγματα είναι μοναδικά και επιπλέον δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα δείγματα ελέγχου.

ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ:

Η αβεβαιότητα της μεθόδου δεν μπορεί να ελεγχθεί, δεδομένου ότι πρόκειται για ποιοτική μέθοδο.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ:

Η θερμοκρασία στους επωαστικούς θαλάμους ελέγχεται με ψηφιακό θερμόμετρο και καταγράφεται ημερησίως.

ΕΚΔΟΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ:

Τα αποτελέσματα εκδίδονται ανά δείγμα και περιλαμβάνει την ποιοτική έκφραση «Θετικό» ή «Αρνητικό» για τις αερόβιες και τις αναερόβιες συνθήκες.

V. Πρωτόκολλο προσδιορισμού δυναμικού διαφοροποίησης (αιμοποιητικής πολυδυναμίας) των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και καλλιέργειας αποικιών με τη μέθοδο METHOCULT.

Το πρωτόκολλο V χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του δυναμικού διαφοροποίησης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων παρατηρώντας τον σχηματισμό των αποικιών σε μέσο κυτταροκαλλιέργειας.

Η παρούσα διαδικασία διεξάγεται αμέσως μετά την απόψυξη κρυοσυντηρημένων δειγμάτων ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ:

Culture Medium RPMI-1640, Fetal Bovine Serum (FBS), Ficoll-Paque® PLUS, Methocult GF H84444, μικροπιπέτα 100-1000μL, falcon 15mL (nunc™), φυγόκεντρο Centrifuge 5810R s/n: 0035238 (eppendorf), κλίβανος (37⁰C-διακριβωμένος), αυτόματος αιματολογικός αναλυτής (Beckman Coulter Ac-T 5diff), αποστειρωμένες πιπέτες pasteur , υδατόλουτρο, τριβλία Petri 35mm.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ:

1. Αποψύχουμε το δείγμα σε υδατόλουτρο στους 37⁰C. Στο υδατόλουτρο θερμαίνουμε και το διάλυμα RPMI-1640 + 2% FBS. Ταυτόχρονα αποψύχουμε σε θερμοκρασία δωματίου και το Methocult GF H84444. Προσθέτουμε ίσο όγκο του διαλύματος RPMI-1640 + 2% FBS (2 ml σε 2 ml δείγματος) σταγόνα-σταγόνα. Αναδεύουμε και προσθέτουμε RPMI 1640+2% FBS σε τελικό όγκο 12 ml. Φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου, 1500 rpm για 5 λεπτά. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 12 ml RPMI 1640 + 2% FBS. Επαναλαμβάνουμε τον κύκλο πλυσίματος και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 600 μl RPMI 1640 + 2% FBS. Αναδεύουμε το δείγμα καλά και αφαιρούμε 100 μL για την ποσοτική μέτρηση των κυττάρων σε έναν αυτόματο αιματολογικό αναλυτή (Beckman Coulter Ac-T 5Diff).

2. Προσθέτουμε 500 μl RPMI 1640 + 2% FBS και αναδεύουμε.

3. Προσθέτουμε 1,5 ml Ficoll-Paque® PLUS σε ένα κωνικό σωλήνα των 15 ml. Το Ficoll-Paque® PLUS πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προσεχτικά βάζουμε 1 ml κυτταρικού διαλύματος πάνω στο Ficoll-Paque® PLUS, έτσι ώστε να σχηματιστεί μια διακριτή στοιβάδα.

5. Φυγοκεντρούμε σε 400 x g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σβησμένα τα φρένα.

6. Με μια αποστειρωμένη πιπέτα παστέρ απομακρύνουμε την υπερκείμενη στοιβάδα με προσοχή, ώστε να μην διαταράξουμε την μεσαία λευκή στοιβάδα με τα μονοπύρρηνα κύτταρα.

7. Μεταφέρουμε προσεκτικά τη στοιβάδα με τα μονοπύρρηνα κύτταρα σε ένα νέο κωνικό σωλήνα των 15 ml. Αυτή η στοιβάδα περιέχει σε κανονικές συνθήκες τα λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια, μονοκύτταρα και τα αιμοποιητικά κύτταρα.

8. Προσθέτουμε RPMI 1640 + 2% FBS μέχρι να φτάσουμε τελικό όγκο 12 ml και φυγοκεντρούμε στα 300 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με αναμμένα τα φρένα.

9. Προσεκτικά και γρήγορα απομακρύνουμε το υπερκείμενο χωρίς να διαταράξουμε το ίζημα και την επαναδιαλύουμε σε 10 mL RPMI 1640 + 2% FBS.

10. Φυγοκεντρούμε το δείγμα πάλι σε 300 x g σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά με αναμμένα τα φρένα και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

11. Επαναδιαλύουμε προσεκτικά σε 1 με 2 mL RPMI 1640 + 2% FBS και καταγράφουμε τον τελικό όγκο.

Η συγκέντρωση για τη στρώση των κυττάρων πρέπει να υπολογιστεί ανάλογα (μεταξύ 5×10^4 και 2×10^5 κύτταρα ανά 1.1 ml καλλιέργειας.)

12. Αφαιρούμε 100 μ l για την ποσοτική μέτρηση των κυττάρων σε έναν αυτόματο αιματολογικό αναλυτή (Beckman Coulter AcT 5Diff)

13. Ετοιμάζουμε τρία τριβλία των 35mm και σημειώνουμε την ημερομηνία.

14. Προσθέτουμε 0.3 ml κυττάρων σε 3 ml MethoCult® tube.

15. Αναδεύουμε έντονα το μίγμα και το αφήνουμε για 5 λεπτά, ώστε να εξαφανιστούν οι φυσαλίδες.

16. Για να βάλουμε το μίγμα στα τρυβλία χρησιμοποιούμε 16άρα αποστειρωμένη βελόνα με σύριγγα των 3 cc.

17. Για την απομάκρυνση του αέρα από την σύριγγα τοποθετούμε τη βελόνα κάτω από την επιφάνεια του υγρού και τραβάμε περίπου 1 ml. Απαλά πατάμε τη σύριγγα αδειάζοντας το μίγμα και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία μέχρι να μην μείνει καθόλου αέρας.

18. Με τη σύριγγα βάζουμε 1.1 ml από το μίγμα κυττάρων με το θρεπτικό (methylcellulose) σε κάθε τρυβλίο.

19. Απλώνουμε ομοιόμορφα το μίγμα σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου μέχρι να ακουμπήσει τα τοιχώματα του.

20. Τοποθετούμε τις καλλιέργειες σε έναν δίσκο και τον βάζουμε σε επωαστήρα με 37°C, 5% CO² και >95% υγρασία για 14-16 ημέρες.

Τα τρυβλία παρατηρούνται μετά από 14-16 ημέρες σε ανάστροφο μικροσκόπιο και οι αποικίες που έχουν σχηματιστεί φωτογραφίζονται.

VI. Πρωτόκολλο αυτόματου προσδιορισμού της βιωσιμότητας των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+ με το λουμινομετρικό σύστημα GloMax.

Το πρωτόκολλο Z περιγράφει τη διαδικασία επεξεργασίας του ομφαλοπλακουντιακού αίματος προς έλεγχο βιωσιμότητας των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων CD45+CD34+.

Η παρούσα διαδικασία διεξάγεται αμέσως μετά την απόψυξη κρυοσυντηρημένων δειγμάτων ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

O.P.A.: Ομφαλοπλακουντιακό αίμα

S/N: Serial Number

DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DMSO: Dimethyl-sulphoxide

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ:

Κρυοανθεκτικά φιαλίδια των 4,5mL, DPBS, μικροπιπέτα 100-1000μL (διακριβωμένη), πιπέτα 2-20μL (διακριβωμένη), πιπέτα 10-100μL (διακριβωμένη), falcon 15mL (nunc™), GLOMAX™ 96 microplate luminometer s/n:B 035 (Promega), CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Cat-No. G9290 (Promega), 96 well plates Cat-No. 436110 (nunc™), reaction tubes Cat.-No. 616 201 (greiner bio-one), stripettor (costar), 10ml stripettor pipette, φυγόκεντρος Centrifuge 5810R s/n: 0035238 (eppendorf), κλίβανος (37⁰C-διακριβωμένος), Promega LightPlate – Glomax KIT (P/N: 9101-036).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ:

1. Τα κρυοσυντηρημένα δείγματα αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου(20-25⁰C) για 20 λεπτά.
2. Με το stripettor προσθέτουμε 2mL DPBS και το τοποθετούμε στον κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία στους 37⁰C, για 20 λεπτά.
3. Ακολουθεί ανάδευση του δείγματος και μεταφορά σε σωλήνα των 15mL στους οποίους υπάρχουν 3mL DPBS.
4. Στη συνέχεια συμπληρώνεται με DPBS μέχρι ο συνολικός όγκος φτάσει στα 10mL, αναδεύεται ελαφρώς και φυγοκεντρείται στις 1500rpm χωρίς φρένα για 5λεπτά.
5. Το υπερκείμενο το οποίο περιέχει DPBS και DMSO (προστέθηκε στο δείγμα ομφαλοπλακουντιακού αίματος κατά την διαδικασία κρυοσυντήρησής του-Βλέπε Πρωτόκολλο απομόνωσης CD34 κυττάρων από το αίμα του ομφαλίου λώρου με χρήση Hetastarch 10% με σκοπό την κρυοσυντήρησή τους στους -196⁰C) απομακρύνεται με την βοήθεια του stripettor.

6. Διαλύεται το ίζημα προσθέτοντας 3mL DPBS και κάνοντας συνεχείς αναδεύσεις μέχρι να διαλυθεί πλήρως.
7. Συνεχίζοντας συμπληρώνεται με DPBS μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει στα 10mL, αναδεύεται ελαφρώς και φυγοκεντρείται στις 1500rpm χωρίς φρένα για 5λεπτά.
8. Μετά την φυγοκέντρωση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και αναδεύοντας, διαλύεται το ίζημα, που αποτελείται μόνο από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, σε 1mL DPBS.
9. Μεταφέρονται 5μL από τα διαλυμένο δείγμα σε 995μL DPBS που βρίσκονται στα reaction tubes και αναδεύεται ελαφρώς.
10. Μεταφέρονται 100μL από το συνολικό 1mL από τα reaction tubes σε ένα πηγαδάκι των plates και αμέσως μετά εγχύονται 50μL από το διάλυμα AAF-Glo™ Substrate (CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay kit).
11. Τοποθετείται το plate στο GLOMAX™ 96 microplate luminometer για 15 λεπτά.
12. Μετά το πέραςμα του χρόνου αυτού και με την χρήση του κατάλληλου λογισμικού του υπολογιστή (GLOMAX) το luminometer μετράει τα κύτταρα τα οποία έχουν λυθεί και εκκρίνουν πρωτεάσες και τα εμφανίζει σε μορφή φύλλου του excel στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το σύστημα.
13. Μετά την παραπάνω μέτρηση προστίθενται στο πηγαδάκι αυτό και 50μL Assay Buffer (CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay kit) και τοποθετείται το plate στο GLOMAX™ 96 microplate luminometer για άλλα 15 λεπτά.
14. Μετά το πέραςμα του χρόνου αυτού το λουμινόμετρο μετράει το συνολικό αριθμό των κυττάρων (που έχουν λυθεί) και τα εμφανίζει στο ίδιο φύλλο του excel.

15. Τελειώνοντας, μετά την αφαίρεση των νεκρών από το συνολικό αριθμό των κυττάρων και την διαίρεση του ποσού αυτού με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων προκύπτει το ποσοστό της βιωσιμότητας των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα, έπειτα από απόψυξη από τους -196°C.

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, ένα δείγμα εξετάστηκε δέκα φορές κατά τη διάρκεια μιας ημέρας και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Συγκεκριμένα, παρακάτω φαίνεται ο πίνακας επαναληψιμότητας:

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
Νεκρά (RLU)	324968	324968	336206	321702	321540	318387	320370	322752	317712	310779
Ολικά (RLU)	2593883	2593883	2756944	2634675	2672311	2643659	2616943	2564504	2559346	2577299
Ζωντανά (RLU)	2268915	2268915	2420738	2312973	2350771	2325272	2296573	2241752	2241634	2266520
Βιωσιμότητα (%)	87	87	88	88	88	88	88	87	88	88

Η μέση τιμή της βιωσιμότητας υπολογίζεται ίση με 88,7 ενώ η τυπική απόκλιση ίση με 0,48, ενώ η CV=0,54%. LOD=1.584 και LOQ=4.8.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου 10 δείγματα χωρίστηκαν σε 10 ίσα μέρη και κρυοσυντηρήθηκαν. Εξετάστηκε η βιωσιμότητα σε 10 διαδοχικές ημέρες και για τα 10 δείγματα. Συγκεκριμένα, στον παρακάτω πίνακα:

	Hμ1	Hμ2	Hμ3	Hμ4	Hμ5	Hμ6	Hμ7	Hμ8	Hμ9	Hμ10	mean	SD	CV%
#1	88	87	88	89	88	86	87	88	87	86	87,4	0,97	1,11
#2	91	90	92	90	89	90	88	91	90	90	90,1	1,10	1,22

#3	98	97	96	97	95	96	97	96	97	97			
											96,6	0,84	0,87
#4	94	93	94	95	94	96	94	95	92	91			
											93,8	1,48	1,56
#5	89	90	87	91	90	88	92	90	91	90			
											89,8	1,46	1,63
#6	95	93	94	95	96	92	91	95	96	91			
											93,8	1,93	2,06
#7	93	93	92	90	94	91	92	93	94	93			
											92,5	1,27	1,38
#8	95	93	94	95	94	94	95	95	92	92			
											93,9	1,20	1,28
#9	84	85	89	86	87	88	83	82	84	82			
											85	2,45	2,88
#10	88	88	87	90	85	84	87	85	86	85			
											86,5	1,85	2,14

ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ:

Για να ελεγχθεί η διευρυμένη αβεβαιότητα της μεθόδου με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$U=2U_c$$

όπου U η διευρυμένη αβεβαιότητα και U_c η τυπική αβεβαιότητα, η οποία ισούται:

$$U_c = \sqrt{\left(\frac{SD_r}{\bar{X}_1}\right)^2 + \left(\frac{SD_{d1}}{\bar{X}_2}\right)^2 + \left(\frac{SD_{d2}}{\bar{X}_3}\right)^2 + \left(\frac{SD_{d3}}{\bar{X}_4}\right)^2}$$

όπου SD_r η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων, $\bar{X}_1$ η μέση τιμή της επαναληψιμότητας, SD_{d1} η τυπική απόκλιση της διακρίβωσης για την πιπέτα 100-1000 μl και $\bar{X}_2$ η μέση τιμή των διακριβωμένων τιμών της πιπέτας 100-1000 μl, SD_{d2} , SD_{d3} , $\bar{X}_3$ και $\bar{X}_4$, οι αντίστοιχες τιμές για τις πιπέτες 2-20μL και 20-200μL.

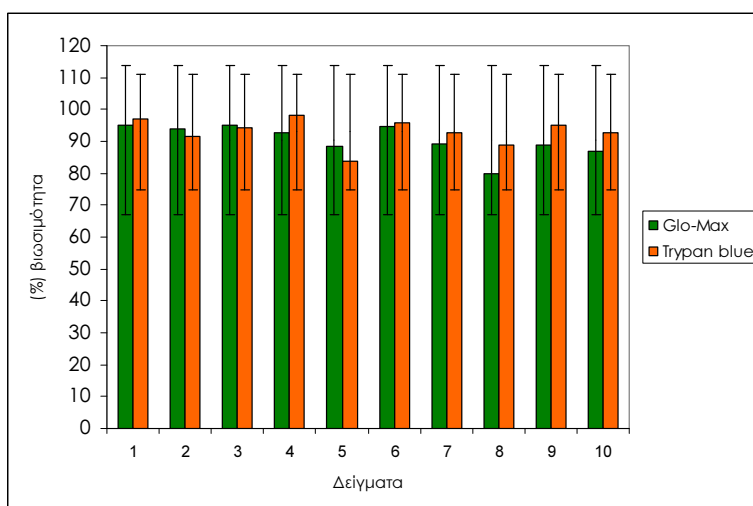
Επομένως, συγκεντρωτικά, για τις εξεταζόμενες παραμέτρους, οι τιμές της αβεβαιότητας και της διευρυμένης αβεβαιότητας φαίνονται παρακάτω:

	U_c	U
Βιωσιμότητα	0,01	0,02

ΑΚΡΙΒΕΙΑ:

Για να ελεγχθεί η ακρίβεια της μεθόδου, μετρήθηκε η βιωσιμότητα σε 10 δείγματα με το Glo-Max και ταυτόχρονα με την παραδοσιακή μέθοδο με το μπλε της τρυπάνης (Trypan Blue). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

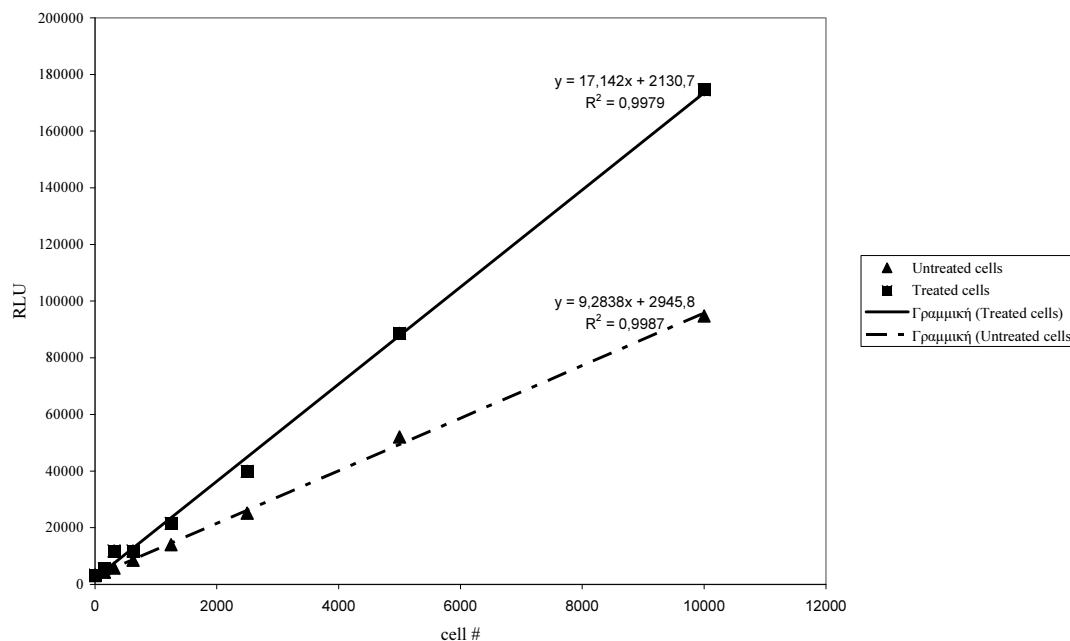
	Βιωσιμότητα (%)	
	Glo-Max	Trypan Blue
#01	95	97
#02	94	92
#03	95	94
#04	93	98
#05	88	84
#06	95	96
#07	89	93
#08	80	89
#09	89	95
#10	87	93
Mean	90,4	93
SD	4,84	4,25



Εφαρμόστηκε t-test και βρέθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($t = 1.2765$, $df=18$, $p=0.2180$)

ΑΚΡΙΒΕΙΑ:

Για να ελεγχθεί η γραμμικότητα της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις κυττάρων, σύμφωνα με το εσωκλειστο του KIT CytoTox Glo. Μετρήθηκαν τα RLU τόσο σε «ζωντανά», ώστε και σε «νεκρά κύτταρα». Η γραμμικότητα φαίνεται παρακάτω.



ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ:

Για να ελεγχθεί η λειτουργία του οργάνου χρησιμοποιείται το LightPlate Glomax KIT, μία φορά το μήνα. Όταν το όργανο λειτουργεί σωστά, τότε στο αντίστοιχο φύλλο του Excel, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο του οργάνου, η ένδειξη είναι OK.

ΕΚΔΟΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ:

Τα αποτελέσματα αποστέλλονται στον συνδεδεμένο υπολογιστή σε φύλλο του Microsoft Excel ως μετρήσεις των σχετικών μονάδων οπτικής πυκνότητας (RLUs). Για να υπολογιστεί το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας αφαιρούμε από τα RLU των ολικών κυττάρων τα RLU των νεκρών κυττάρων και διαιρούμε προς τα RLU των ολικών κυττάρων.

VII. Πρωτόκολλο εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων STEMSPAN SFEM II - CC100.

VIII. Αξιολόγηση *in vitro* του τελικού πρωτοκόλλου εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων STEMSPAN SFEM II - CC100.

Αναλύονται διεξοδικά ακολούθως:

VII. Επιλογή του τελικού πρωτοκόλλου εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων **STEMSPAN SFEM II - CC100.**

VIII. Αξιολόγηση *in vitro* του τελικού πρωτοκόλλου εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων **STEMSPAN SFEM II - CC100.**

Μετά από συγκριτικά αποτελέσματα 12 μηνών επιλέχθηκε το πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού STEM SPAN με τη προσθήκη των παραγόντων του υλικού SFEM II CC100.

Το βασικό καλλιεργητικό υλικό ελεύθερο ορού για τον πολλαπλασιασμό των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων που επιλέχθηκε είναι το **SFEM II**.

Το υλικό SFEM II συνίσταται από τα παρακάτω:

1. Bovine Serum Albumin
2. Insulin, Human, Recombinant
3. Transferrin, Human (Iron-Saturated)
4. 2-Mercaptoethanol
5. Iscove's MDM
6. Supplements

Το υλικό CC100 συνίσταται από το παρακάτω διάλυμα κυτοκινών:

1. rh Flt-3 Ligand
2. rh Stem Cell Factor
3. rh IL-3
4. rh IL-6

Παρακάτω ακολουθούν τα αποτελέσματα του ερευνητικού πρωτοκόλλου που επιλέχθηκε σε σύγκριση με λοιπά πρωτόκολλα εξωσωματικού πολλαπλασιασμού που αποδεικνύουν τη συγκεκριμένη επιλογή. Στο προηγούμενο χρονικό διάστημα χρησιμοποιήθηκε ένα *KIT STEM SPAN SFEM II CC100* για τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό (ex vivo expansion) 10 δειγμάτων στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων ομφαλοπλακουντιακού αίματος με εργαστηριακά αποτελέσματα TNC, CD34+ expansion rates : +/- 10% από τα προβλεπόμενα του κατασκευαστή.

Προετοιμάστηκαν και κρυοσυντηρήθηκαν 10 κρυοφιαλίδια αποτελούμενα από 100.000 κύτταρα TNC / ml για την επιλογή και αξιολόγηση των πρωτότυπων μικρομοριακών προσδετών.

1. Επιλέχθηκαν 10 μοσχεύματα ομφαλίου αίματος κατόπιν συναίνεσης των δοτών με τα εξής ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά κατά προδιαγραφές NETCORD:
 - α. Αρχικός όγκος αίματος: > 60 c.c , TNC: > 5.00x10.8
 - β. Αρνητικός έλεγχος για τα εξής αντιγόνα: HBV, HCV, HIV1/2
 - γ. Χρονικό διάστημα φύλαξης των μοσχευμάτων σε συνθήκες 18-22 ο C πριν την επεξεργασία: < 24 ωρών
2. Ως μέθοδος απομόνωσης των μονοπύρηνων κυττάρων του ομφαλίου αίματος μετά από έρευνα της βιβλιογραφίας και της προηγούμενης εμπειρίας επιλέχθηκε η μέθοδος με την χρήση του αντιδραστηρίου Ficoll-HyPaque σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Σχετικές πληροφορίες και το σχετικό εσώκλειστο οδηγίων χρήσης θα περιλαμβάνεται στο παράρτημα της διατριβής.
3. Ως μέθοδος ανοσομαγνητικού διαχωρισμού των CD34+ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από το μονοπύρηνο κλάσμα επιλέχθηκε η μέθοδος Minimals με την χρήση επιτραπέζιου μαγνήτη της εταιρείας MiltenyiBiotec.

4. Επιλέχθηκε το θρεπτικό μέσο **STEMSPAN** της εταιρείας **STEMCELL technologies** για την καλλιέργεια των ΣΑΚ ως πρότυπο δείγμα ελέγχου των κυτταροκαλλιιεργειών σε σύγκριση με το υπό μελέτη δείγμα.

Το ερευνητικό πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού των ΣΑΚ αποτελεί τροποποίηση δημοσιευμένων ερευνητικών πρωτοκόλλων με τα εξής κύρια χαρακτηριστικά:

- α. Βραχύ χρονικό διάστημα εκτέλεσης : < 12 ημερών
 - β. Ανακαλλιέργεια (cell passage) και προσθήκη θρεπτικού μέσου ανά 2-3 ημέρες
 - γ. Χρήση αιμοποιητικών παραγόντων και κυτοκινών με ελάχιστη τοξικότητα και γνωστή κλινική ένδειξη
 - δ. Προσθήκη των νέων υπό μελέτη μικρομοριακών αγωνιστών σε μικρές συγκεντρώσεις και εξαρτώμενες από την συγκέντρωση των κυττάρων : > αρχική συγκέντρωση : 100.000 κύτταρα ανα ml και τελικό αποτέλεσμα πολλαπλασιασμού των CD45+ CD34+ : > **X 10 folds**
 - ε. Συνθήκες επώασης των κυττάρων σε επωαστήρα THERMO: 37ο C / 0- 5% CO₂
5. Επιλέχθηκαν ελεύθερα χρήσης λογισμικά HTVS- Drug Design – Structure Based Receptor Fitting Softwares με αποκλειστικό σκοπό την χρήση τους στην διεξαγωγή των ερευνητικών εργασιών της διατριβής και την ανακάλυψη **νέων μικρομοριακών αγωνιστών** πεπτιδικής μορφής (προσπάθειες πεπτιδικής μορφής ήδη έχουν ετοιμαστεί και έχουν δημοσιευτεί στο παγκόσμιο συνέδριο ISCT – Απρίλιος 2014)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΙΧ. Αποτελέσματα εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των ΣΑΚ του ΟΠΑ μετά από φαρμακολογική προετοιμασία με τον παράγοντα φιλγραστίμη.

Κάθε δείγμα (N=4) των ΣΑΚ-ΟΠΑ εκτέθηκε σε φαρμακολογική προετοιμασία για 24 ώρες με τον παράγοντα φιλγραστίμη και εν συνεχεία ανακαλλιιεργήθηκε στο καλλιιεργητικό υλικό StemSpan CC100 με την προσθήκη των κυτταροκινών πρώιμου και τελικού σταδίου.

Η συνολική χρονική διάρκεια του εξωσωματικού πολλαπλασιασμού διήρκεσε 8 ημέρες συμπεριλαμβανομένου και της φαρμακολογικής προετοιμασίας με τον παράγοντα της φιλγραστίμης.

Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά όλα τα αποτελέσματα των μελετών του τελικού πρωτοκόλλου εξωσωματικής έκπτυξης των ΣΑΚ του ΟΠΑ μετά από φαρμακολογική προετοιμασία με τον παράγοντα της φιλγραστίμης

Πίνακας 1: Συγκριτικός πίνακας αριθμού ανα μλ των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-HPCs (CD34+-PE)/ μλ.

UCB-HPCs (CD34+-PE)/ μλ					
Exp#	1	2	3	4	Mean +/- SD
Post-Thawing Day 0	05	01	01	09	04+/- 3.82
Post-Expansion Day 8	205	35	49	382	167.75+/- 162.29
Fold Expansion	41	35	49	42.44	41.86+/- 5.74

Πίνακας 2: Συγκριτικός πίνακας ποσοστιαίας αναλογίας των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-HPCs (CD34+-PE)/ %.

UCB-HPCs (CD34+-PE)/ %					
Exp#	1	2	3	4	Mean +/- SD
Post-Thawing Day 0	3.66	0.23	0.32	4.27	2.12 +/- 2.14
Post-Expansion Day 8	21.95	2.24	2.81	21.79	12.19 +/- 11.17
Fold Expansion	5.99	9.73	8.78	5.10	7.4 +/- 2.20

Πίνακας 3: Συγκριτικός πίνακας απολύτου αριθμού των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-HPCs (CD34+-PE) absolute number / cells.

UCB-HPCs (CD34+-PE absolute number/ cells)					
Exp#	1	2	3	4	Mean +/- SD
Post-Thawing Day 0	51	05	10	82	37+/- 36.39
Post-Expansion Day 8	1417	466	627	1959	1117.25+/- 698.29
Fold Expansion	27.78	93.20	62.70	23.89	51.89+/- 32.60

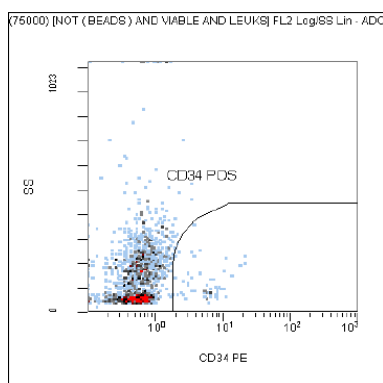
Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας βιωσιμότητας των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-HPCs (CD34+-PE) (7-AAD-/ %).

UCB-HPCs (7-AAD-/ %)					
Exp#	1	2	3	4	Mean +/- SD
Post-Thawing Day 0	70.21	63.91	88.80	87.35	77.56+/-12.41
Post-Expansion Day 8	92.12	95.63	94.88	92.83	93.86+/-1.65

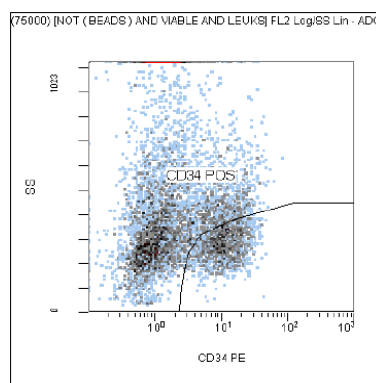
Πίνακας 5: Συγκριτικός πίνακας της έκτασης του πολλαπλασιασμού των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ με το πείραμα – μάρτυρα των UCB-HPCs (CD34+-PE)

UCB-HPCs	Fold expansion CD 34 +	Culture Time: 8 days
Control Group (N=5)	< 05	StemSpan CC100 (IL-3, IL-6, SCF, Flt-3) [32]
Experimental Group (N=4)	41.86	24h- Pharmacological preconditioning + StemSpan CC100

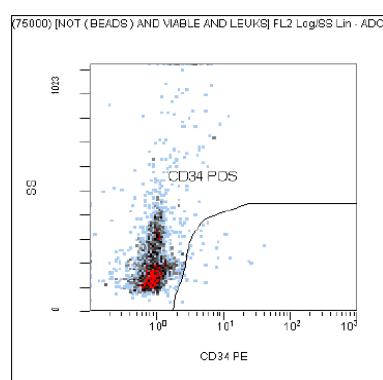
Εικόνα 1: Σύγκριση των διαγραμμάτων κυτταρομετρίας ροής των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-HPCs (I:exp#1, III:exp#2, V:exp#3, VII:exp#4) and post-expansion CD34+ PE-SS (II:exp#1, IV:exp#2, VI:exp#3, VIII:exp#4)



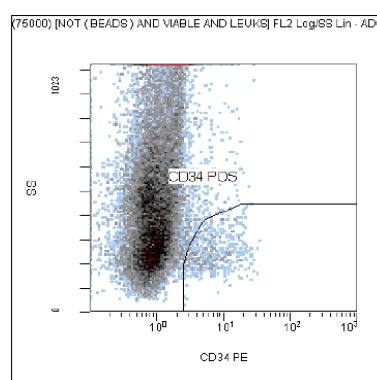
I. Post-thawing CD34+ PE-SS exp#1



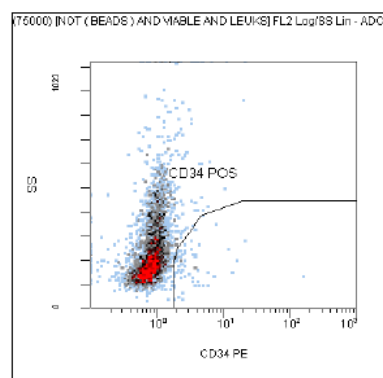
II. Post-expansion CD34+ PE-SS exp#1



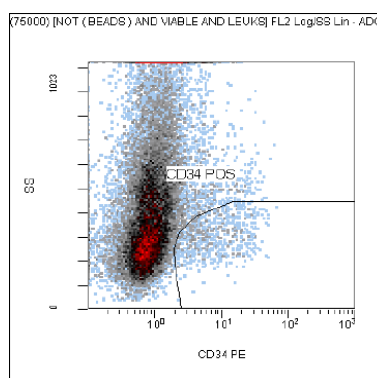
III. Post-thawing CD34+ PE-SS exp#2



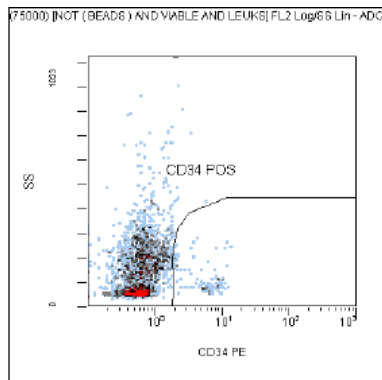
IV. Post-expansion CD34+ PE-SS exp#2



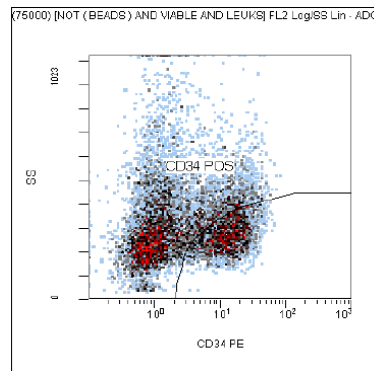
V. Post-thawing CD34+ PE-SS exp#3



VI. Post-expansion CD34+ PE-SS exp#3

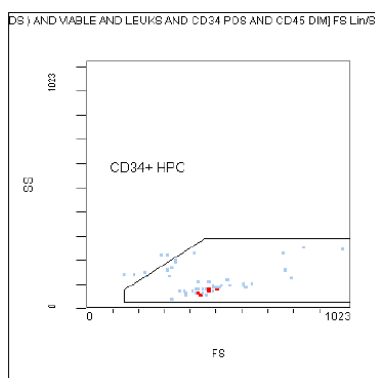


VII. Post-thawing CD34+ PE-SS exp#4

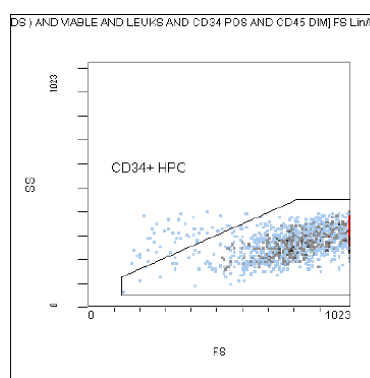


VIII. Post-expansion CD34+ PE-SS exp#4

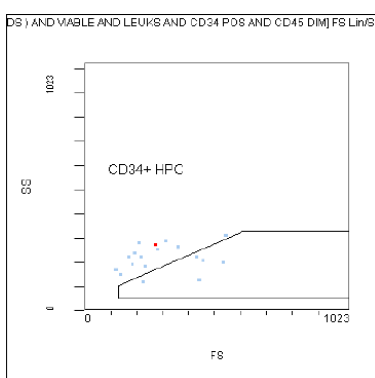
Εικόνα 2: Σύγκριση των διαγραμμάτων κυτταρομετρίας ροής των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-HPCs (I:exp#1, III:exp#2, V:exp#3, VII:exp#4) and post-expansion CD34+ PE-SS (II:exp#1, IV:exp#2, VI:exp#3, VIII:exp#4)



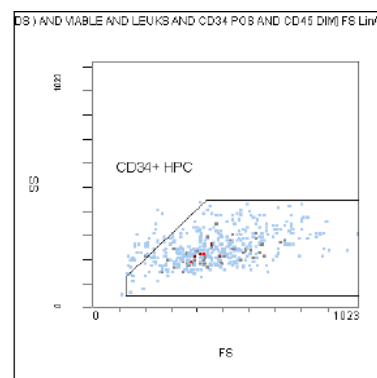
I. Post-thawing CD34+ FS-SS exp#1



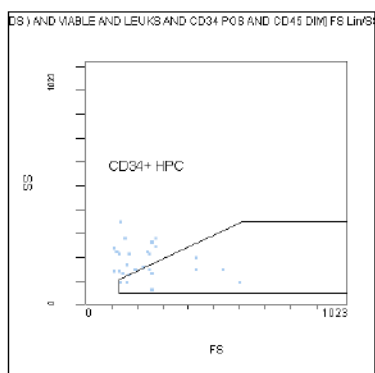
II. Post-expansion CD34+ PE-SS exp#1



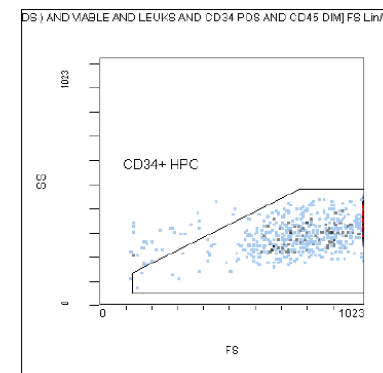
III. Post-thawing CD34+ FS-SS exp#2



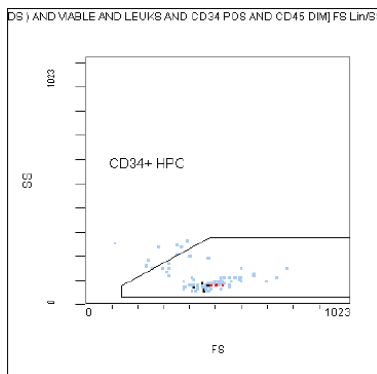
IV. Post-expansion CD34+ PE-SS exp#2



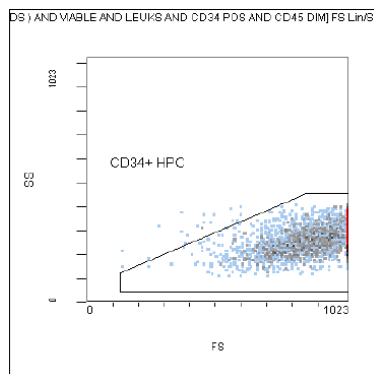
V. Post-thawing CD34+ FS-SS exp#3



VI. Post-expansion CD34+ FS-SS exp#3

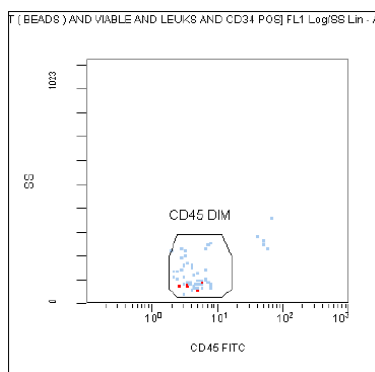


VII. Post-thawing CD34+ FS-SS exp#4

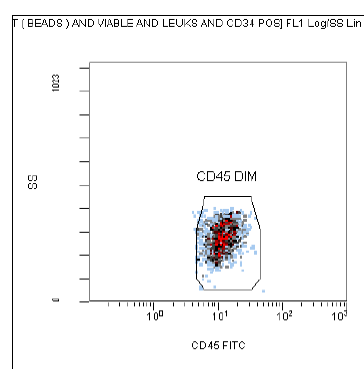


VIII. Post-expansion CD34+ FS-SS exp#4

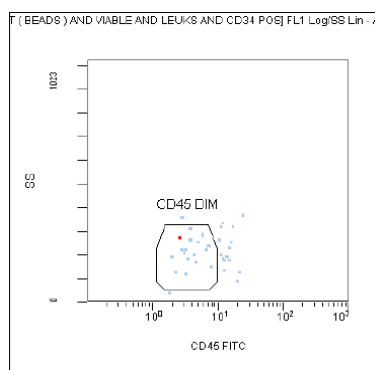
Εικόνα 3: Σύγκριση των διαγραμμάτων κυτταρομετρίας ροής των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-MNCs (I:exp#1, III:exp#2, V:exp#3, VII:exp#4) and post-expansion CD34+ PE-SS (II:exp#1, IV:exp#2, VI:exp#3, VIII:exp#4)



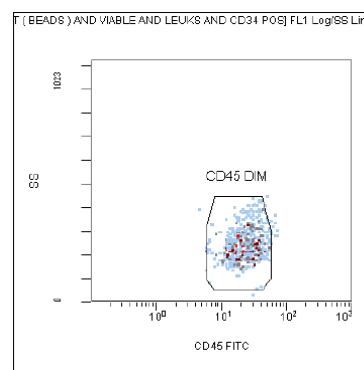
I. Post-thawing CD45+ FITC-SS exp#1



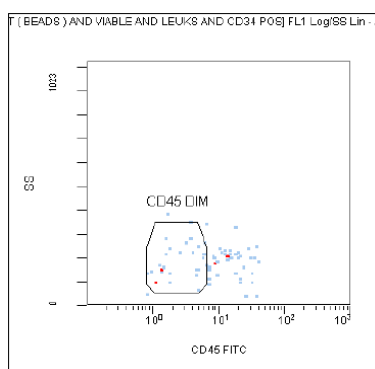
II. Post-expansion CD45+ FITC-SS exp#1



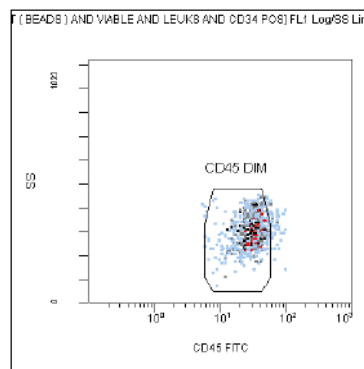
III. Post-thawing CD45+ FITC-SS exp#2



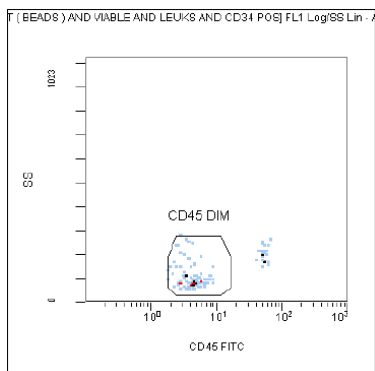
IV. Post-expansion CD45+ FITC-SS exp#2



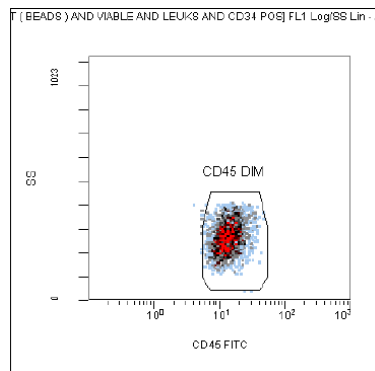
V. Post-thawing CD45+ FITC-SS exp#3



VI. Post-expansion CD45+ FITC-SS

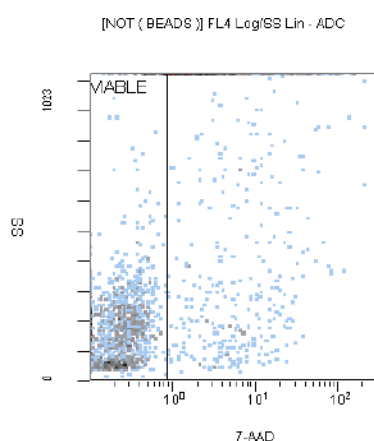


VII. Post-thawing CD45+ FITC-SS exp#4

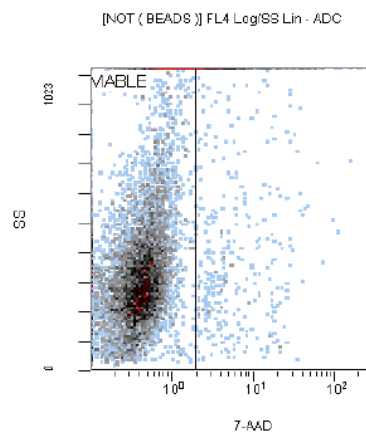


VIII. Post-expansion CD45+ FITC-SS

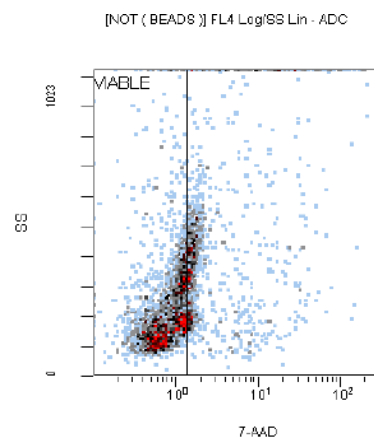
Εικόνα 4: Σύγκριση των διαγραμμάτων βιωσιμότητας κυτταρομετρίας ροής των φαρμακολογικά προετοιμασμένων ΣΑΚ-ΟΠΑ μετά την απόψυξη και μετά τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό UCB-HPCs (I:exp#1, III:exp#2, V:exp#3, VII:exp#4) and post-expansion CD34+ PE-SS (II:exp#1, IV:exp#2, VI:exp#3, VIII:exp#4)



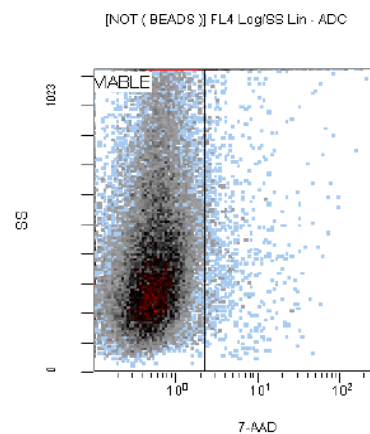
I. Post-thawing CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#1



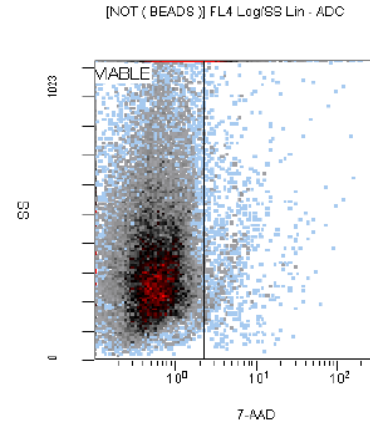
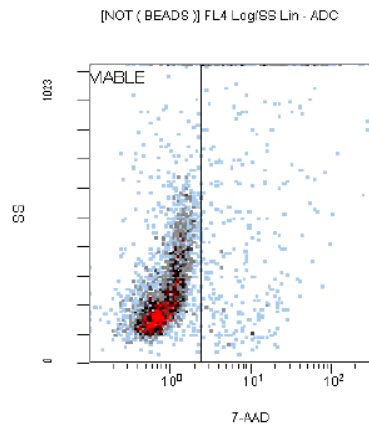
II. Post-expansion CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#1



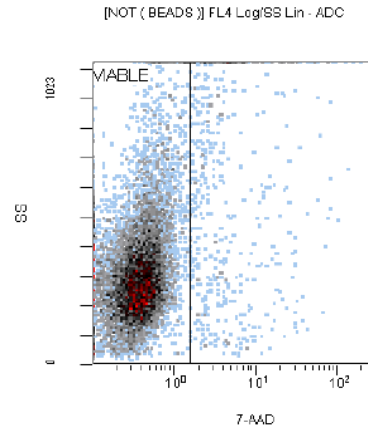
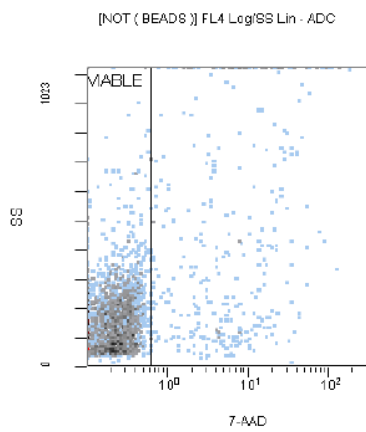
III. Post-thawing CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#2



IV. Post-expansion CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#2



V. Post-thawing CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#3 VI. Post-expansion CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#3



VII. Post-thawing CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#4 VIII. Post-expansion CD45+ CD34+7-AAD-/SS exp#4

Εικόνα 5:



Επιτραπέζιος μαγνήτης MinimaCS για την απομόνωση των CD34+ ΣΑΚ

Εικόνα 6:



Θρεπτικό μέσο επιλογής για τη συντήρηση και τον πολλαπλασιασμό των CD34+ ΣΑΚ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μεταμόσχευση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (Μ-ΣΑΚ) έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για την ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος των ασθενών με λευχαιμία και λοιπών αιματολογικών κακοηθειών σε σύγκριση με το μυελό των οστών και των κινητοποιημένων στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων του περιφερικού αίματος. Ωστόσο, η ανεπαρκής δοσολογία των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων και τα προβλήματα ιστοσυμβατότητας του ομφαλοπλακουντιακού αίματος (ΟΠΑ) πρέπει να επιλυθούν με στόχο τα καλύτερα αποτελέσματα των Μ-ΣΑΚ.

Την τελευταία δεκαετία, πολυάριθμες έρευνες και κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους προσπάθησαν να επωφεληθούν από τους γνωστούς μηχανισμούς των ΣΑΚ σχετικά με την αρχεγονικότητα και την ικανότητα αυτοανανέωσης τους για την εργαστηριακή εξωσωματική έκπτυξη τους.

Ωστόσο, η μακροχρόνια εργαστηριακή καλλιέργεια των ΣΑΚ (>21 ημερών) και η χαμηλή ανάκτηση του επιπέδου των ουδετερόφιλων στους αιματολογικούς ασθενείς μειώνει σημαντικά την μεταμοσχευσιμότητα των εξωσωματικώς εκπτυγμένων ΣΑΚ.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναπτύξαμε μία σύντομη μέθοδο για την με φιλγραστίμη κατάλληλη φαρμακολογική προετοιμασία εξωσωματικό πολλαπλασιασμό των αποψυγμένων ΣΑΚ του ΟΠΑ. Με την χρήση των εξωσωματικώς πολλαπλασιασμένων ΣΑΚ του ΟΠΑ αναμένεται να ενισχυθεί η ολική επιβίωση των ασθενών ελεύθερης νόσου, να μειωθούν οι δείκτες νοσηρότητας και θνησιμότητας των μεταμοσχευμένων και να αυξηθεί σημαντικά η λειτουργική ανάκτηση των μοσχευμάτων του ΟΠΑ στους ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Τα ΣΑΚ του ΟΠΑ αποτελούν κύρια θεραπευτική επιλογή για τους παιδιατρικούς ασθενείς με αιματολογικές διαταραχές που υποβάλλονται σε υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας [1-4]. Ως αιμοποιητικά μοσχεύματα επέχουν σημαντικά πλεονεκτήματα όπως 1) σημαντικά ταχύτερη διαθεσιμότητα των αποθηκευμένων κρυοσυντηρημένων μονάδων ΟΠΑ, κατά μέσο όρο, 25-36 ημέρες νωρίτερα συγκριτικά με τα μοσχεύματα μυελού των οστών 2) την επέκταση του αριθμού των μερικώς συμβατών σε 1 ή 2 HLA-A, -B, και -DR αντιγόνα δωρητών σε σχέση με την επιβίωση, 3) τη χαμηλότερη επίπτωση των αντιδράσεων της νόσου του μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD), 4) μειωμένο κίνδυνο μετάδοσης των συνήθων μολύνσεων, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός και ο ιός Epstein-Barr, 5) μειωμένη επαφή με το δότη των ΣΑΚ-ΟΠΑ λόγω των ευπρόσιτων διεθνών μητρώων και 6) η ευκολότερη αντιπροσώπευση των μειονοτήτων διά μέσου της διευρυμένης πιάσινας των σπάνιων HLA απλοτύπων [5]. Ωστόσο, το κρίσιμο μειονέκτημα των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος είναι ο περιορισμένος αριθμός των ΣΑΚ, καθώς και ο χρόνος συλλογής που μπορεί να συμβεί μόνο μία φορά κατά τον τοκετό. Επιπλέον, σε σύγκριση με τα μοσχεύματα του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος εμφανίζεται καθυστέρηση στην αιμοποιητικής ανασύσταση των ασθενών, με υψηλότερο κίνδυνο αποτυχίας της μεταμόσχευσης και επιπτώσεις στους δείκτες θνησιμότητας των μεταμοσχευμένων [6].

Βάση των ανωτέρω δεδομένων αρκετές ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να αξιολογήσουν διαφορετικές προσεγγίσεις για τον εξωσωματικό πολλαπλασιασμό των ΣΑΚ-ΟΠΑ [33-47]. Ενδεικτικά αναφέρονται τα συστήματα κυτταροκαλλιιεργειών συμπεριλαμβανομένων, του παράγοντα βλαστοκυττάρων (SCF), της θρομβοποιητίνης (TPO), της τυροσινικής κινάσης (FL3t), το σύμπλοκο της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και του διαλυτού υποδοχέα (IL-6 / sIL-6R), ο συνδέτης delta1 Notch, οι πεπτιδικοί παράγοντες της αγγειοποιητίνης και της πλειοτροπίνης [10, 11]. Πρόσφατα, εφαρμόζονται οι τεχνικές της φαρμακολογικής προετοιμασίας επί των βλαστικών κυττάρων με στόχο την ενισχυμένη επιβίωση κατά την κυτταρική έκπτυξη αυτών [12,13]. Φαρμακομόρια και λοιπές ενώσεις αναφέρονται κατά την κλινική βιβλιογραφία τα εξής ο προστατευτικός παράγοντας υποξίας (HIF-1), τροφικοί/ αυξητικοί παράγοντες, ρυθμιστικοί παράγοντες επί της κινάσης (ERK), η κινάση (GSK-3β), οι μεταλλοπρωτεϊνάσες-2 (MMP-2) και Bcl-2 που

εμπλέκονται στην απόκριση σε ερεθίσματα φαρμακολογικής προετοιμασίας [14,15]. Επίσης, αναφέρονται ως παράγοντες προετοιμασίας το υδρόθειο (H₂S) [16], διοξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) [17], και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) [18], η ερυθροποιητίνη (EPO) [19], ο παράγοντας (SDF-1), ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) ή λοιποί φαρμακολογικοί παραγόντες όπως το διαζοξίδιο, η απελίνη, το ισοφλουράνιο, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), και πρωτοπορφυρίνη κοβαλτίου (CoPP) [20-30].

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, αναπτύξαμε μία σύντομη μέθοδο για την με φιλγραστίμη κατάλληλη φαρμακολογική προετοιμασία εξωσωματικού πολλαπλασιασμού των αποψυγμένων ΣΑΚ του ΟΠΑ. Με την χρήση των εξωσωματικώς πολλαπλασιασμένων ΣΑΚ του ΟΠΑ αναμένεται να ενισχυθεί η ολική επιβίωση των ασθενών ελεύθερης νόσου, να μειωθούν οι δείκτες νοσηρότητας και θνησιμότητας των μεταμοσχευμένων και να αυξηθεί σημαντικά η λειτουργική ανάκτηση των μοσχευμάτων του ΟΠΑ στους ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Nikolaos G. Grigoriadis, PharmD.

Abstract

Although umbilical cord blood (UCB) hematopoietic stem cell transplantation (UCBT) has emerged as a promising haematological reconstitution therapy for leukemias and other related disorders, the insufficient UCB stem cell dosage still hinders better clinical outcomes. Previous research efforts, by focusing on ex vivo UCB expansion capabilities have sought to benefit from well-known mechanisms of self-renewal characteristics of UCB stem cells. However, the long-term (>21 days) in vitro culture period and the low neutrophil recovery significantly reduce the transplantability of such ex vivo expanded UCB stem cells. To overcome the latter hurdles in this study, a post-thaw, short-term ex vivo expansion methodology of UCB mononuclear (UCB-MNC) and CD34⁺ cells has been established. Notably, such effort was achieved through pharmacological preconditioned of UCB cultures by filgrastim agent already used in the clinical setting. In crucial cell populations implicated in the promotion of functional engraftment, the progression of free survival rates (PFS), a marked increase of 6.65 to 9.34 fold for UCB-MNC and 35 to 49 fold for CD34⁺ cells has been noticed. Overall, these results indicate that transplantation of pharmacologically-preconditioned ex vivo expansion of UCB stem and progenitor cells keep high promise upon transplantation to enhance therapeutic potential in everyday clinical practice.

Keywords: Post-thaw; ex vivo expansion; pharmacological preconditioning; hematopoietic stem cell transplantation; filgrastim.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- **ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ**

- ΣΑΚ: Στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα
- ΟΠΑ: Ομφαλιοπλακουντιακά μοσχεύματα
- ΕΟΜ: Εθνικός Οργανισμός Μεταμοσχεύσεων
- Ε.ΣΥ.Δ: Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης

- **ΞΕΝΕΣ**

- E.M.A / CAT committee: European Medicines Agency / Committee for Advanced Therapies
- FACT: Foundation of Accreditation for Cellular Therapies
- AABB: American Association of Blood Banks

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gluckman E, Devergie A, Bourdeau-Esprou H, Thierry D, Traineau R, et al. (1990) Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 32(6): 423-425.
2. Wagner J (1993) Umbilical cord blood stem cell transplantation. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 15(2): 169-174.
3. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E (1995) Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 346(8969): 214-219.
4. P. Rubinstein, L. Dobrila, R.E. Rosenfield Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 24; 92(22): 10119–10122. PMID: PMC40747
5. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, et al. (1996) Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 88(3): 795-802.
6. Rocha V, Gluckman E. Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:34–41.
7. Benito AI, Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: Review of current clinical results.
8. Jaroscak J, Martin PL, Waters-Pick B, et al. (1998) A phase I trial of augmentation of unrelated umbilical cord blood transplantation with ex vivo expanded cells. *Blood* 92(Suppl 1): 646a.
9. Stiff P, Pecora A, Parthasarathy M, et al. (1998) Umbilical cord blood transplants in adults using a combination of unexpanded and ex vivo expanded cells: preliminary clinical observations. *Blood* 92(Suppl 1): 646a.
10. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, et al. (2002) Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood and Marrow Transplant* 8(7): 368-376.

11. Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ (2007) Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant* 39: 11–23.
12. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, et al. (2010) Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 16: 232–236.
13. Haider HK, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: Combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2008; 45:554–566. [PubMed: 18561945]
14. Haider HK, Ashraf M. Preconditioning and Stem Cell Survival. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2010; 3:89–102. [PubMed: 20560023]
15. Liu HB, Xue WJ, Ge GQ, Luo XH, Li Y, Xiang HL, Ding XM, Tian PX, Tian XH. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 alpha in MSCs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 401:509–515. [PubMed:20869949]
16. Zeng XJ, Yu SP, Taylor T, Ogle M, Wei L. Protective effect of apelin on cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis. *Stem Cell Research*. 2012; 8:357–367. [PubMed:22289418]
17. Xie XX, Sun AJ, Zhu WQ, Huang ZY, Hu XY, Jia JG, Zou YZ, Ge JB. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with Hydrogen Sulfide Enhances Repair of Myocardial Infarction in Rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2012; 226:29–36. [PubMed:22186034]
18. Zhang J, Chen GH, Wang YW, Zhao J, Duan HF, Liao LM, Zhang XZ, Chen YD, Chen H. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chinese medical journal*. 2012; 125:3472–8.[PubMed: 23044308]
19. Kondo-Nakamura M, Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K. Brief exposure to carbon monoxide preconditions cardiomyogenic cells against apoptosis in ischemia-reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 393:449–454. [PubMed:20152804]
20. Li Y, Lu ZY, Keogh CL, Yu SP, Wei L. Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in

- mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007; 27:1043–1054. [PubMed: 17077815]
21. Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, Zhang D, Zhao T, Ashraf M. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovascular Research*. 2008; 77:134–142. [PubMed: 18006467]
 22. Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2008; 28:644–650.
 23. Chen J, Du XL, Zhang KL. Effects of stromal-derived factor 1 preconditioning on apoptosis of rat bone mesenchymal stem cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences*. 2009; 29:423–426.
 24. Lu G, Ashraf M, Haider KH. Insulin-Like Growth Factor-1 Preconditioning Accentuates Intrinsic Survival Mechanism in Stem Cells to Resist Ischemic Injury by Orchestrating Protein Kinase C α -Erk1/2 Activation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012; 16:217–227. [PubMed: 21923556]
 25. Tilkorn DJ, Davies EM, Keramidas E, Dingle AM, Gerrand YW, Taylor CJ, Han XL, Palmer JA, Penington AJ, Mitchell CA, Morrison WA, Dusting GJ, Mitchell GM. The in vitro preconditioning of myoblasts to enhance subsequent survival in an in vivo tissue engineering chamber model. *Biomaterials*. 2012; 33:3868–3879. [PubMed: 22369961]
 26. Jiang BM, Xiao WM, Shi YZ, Liu MD, Xiao XZ. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress & Chaperones*. 2005; 10:252–262. [PubMed: 16184770]
 27. Cui XJ, Wang HJ, Guo HD, Wang C, Ao H, Liu XQ, Tan YZ. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with Diazoxide, a Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel Opener, Promotes Repair of Myocardial Infarction in Rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2010; 220:139–147. [PubMed: 20139665]
 28. Niagara MI, Haider HK, Jiang SJ, Ashraf M. Pharmacologically preconditioned skeletal myoblasts are resistant to oxidative stress and promote angiomyogenesis via

- release of paracrine factors in the infarcted heart. *Circulation Research*. 2007; 100:545–555. [PubMed: 17234963]
29. Idris NM, Ashraf M, Ahmed RPH, Jiang SJ, Haider KH. Activation of IL-11/STAT3 pathway in preconditioned human skeletal myoblasts blocks apoptotic cascade under oxidant stress. *Regenerative Medicine*. 2012; 7:47–57. [PubMed: 22168497]
 30. Afzal MR, Haider HK, Idris NM, Jiang SJ, Ahmed RPH, Ashraf M. Preconditioning Promotes Survival and Angiomyogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Infarcted Heart via NFkappa B Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010; 12:693–702. [PubMed: 19751147]
 31. Li LF, Zeng H, Chen JX. Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair postmyocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012; 303:H605–H618. [PubMed: 22752632]
 32. Expansion of CD34⁺ human cord blood cells cultured in StemSpan™ Media containing CC100 Cytokine Cocktail. [www.stemcell.com/en/Products]
 33. Petersdorf EW. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Jun;20(2):155-70. Review.
 34. Koh LP, Chao NJ. Umbilical cord blood transplantation in adults using myeloablative and nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004 Jan;10(1):1-22. Review.
 35. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1343-7. Epub 2004 Oct 5.
 36. Castello S, Podestà M, Menditto VG, Ibatici A, Pitto A, Figari O, Scarpati D, Magrassi L, Bacigalupo A, Piaggio G, Frassoni F. Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Hematol*. 2004 Aug;32(8):782-7.
 37. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm J, Ward W, McNiece IK. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(7):368-76.
 38. Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, Gratwohl A, Madrigal A, Niederwieser D, Passweg J, Rocha V, Saccardi R, Schouten

- H, Schmitz N, Socie G, Sureda A, Apperley J; European Group for Blood and Marrow. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Mar;37(5):439-49.
39. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Miller JS, Blazar BR, McGlave PB, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):3064-70. Epub 2007 Jun 14.
 40. Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr Opin Immunol*. 2006 Oct;18(5):565-70. Epub 2006 Aug 8. Review.
 41. Takahashi S. Leukemia: cord blood for allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2007 Nov;19(6):667-72. Review.
 42. Kobari L, Pflumio F, Giarratana M, Li X, Titeux M, Izac B, Leteurtre F, Coulombel L, Douay L. In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. *Exp Hematol*. 2000 Dec;28(12):1470-80.
 43. Duchez P, Dazey B, Douay L, Vezon G, Ivanovic Z. An efficient large-scale thawing procedure for cord blood cells destined for selection and ex vivo expansion of CD34+ cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003 Oct;12(5):587-9.
 44. Dazey B, Duchez P, Letellier C, Vezon G, Ivanovic Z; French Cord Blood Network. Cord blood processing by using a standard manual technique and automated closed system "Sepax" (Kit CS-530). *Stem Cells Dev*. 2005 Feb;14(1):6-10.
 45. Ivanovic Z, Duchez P, Dazey B, Hermitte F, Lamrissi-Garcia I, Mazurier F, Praloran V, Reiffers J, Vezon G, Boiron JM. A clinical-scale expansion of mobilized CD 34+ hematopoietic stem and progenitor cells by use of a new serum-free medium. *Transfusion*. 2006 Jan;46(1):126-31.
 46. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1915-9. Epub 2003 May 8.
 47. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, Einsele H, Gaspar HB, Gratwohl A, Passweg J, Peters C, Rocha V, Saccardi R, Schouten H, Sureda A, Tichelli A, Velardi A, Niederwieser D; European Group for Blood and Marrow

Transplantation. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. Bone Marrow Transplant. 2010 Feb;45(2):219-34. doi: 10.1038/bmt.2009.141. Epub 2009 Jul 6.

