

Κλινική μελέτη

Ποιότητα μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος: Ο ρόλος των μαιευτικών παραμέτρων και των συνθηκών συντήρησης και μεταφοράς τους

Ο. Αναστασίου^{1,2}Ε. Τάκη³Ο. Χατζόγλου¹Π. Δεληγιαννίδης¹Θ. Θεοδορίδης²Ι. Μπόντης²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας: Καθοριστικό παράγοντα επιτυχίας της μεταμόσχευσης με αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα ομφαλοπλακουντιακού αίματος (ΟΠΑ) αποτελεί η ποιότητα μονάδας ΟΠΑ, και ιδιαίτερα η κυτταρική «δόση» που περιέχει. Στόχος της εργασίας ήταν να αναλυθούν οι μαιευτικοί παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των δειγμάτων ΟΠΑ καθώς και να προσδιοριστούν οι ευνοϊκότερες συνθήκες συντήρησης και μεταφοράς των δειγμάτων μέχρι την επεξεργασία τους.

Υλικά & Μέθοδοι: Αναλύθηκαν 296 δείγματα ΟΠΑ μετά από έγγραφη συναίνεση των γονέων. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν ο τρόπος τοκετού (φυσιολογικός - ΦΤ ή καισαρική τομή-ΚΤ), οι εβδομάδες κύησης, ο όγκος δείγματος συλλογής, ο αριθμός CD45+ και CD34+ κυττάρων, οι μικροβιακές μολύνσεις. 36 δείγματα συντηρήθηκαν για 24 και 48 ώρες στους 4°C και 18°C και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητά τους.

Αποτελέσματα: Ενώ ο όγκος του αίματος, η συγκέντρωση των CD45+ και CD34+ κυττάρων δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη διαδικασία συλλογής (ΦΤ ή ΚΤ), σημαντική συσχέτιση παρουσιάζεται μεταξύ των εβδομάδων κύησης και του βάρους του παιδιού με τη συγκέντρωση του δείγματος σε εμπύρνα κύτταρα. Αναφορικά με τις συνθήκες και χρόνους συντήρησης των δειγμάτων πριν την επεξεργασία, πτώση της βιωσιμότητας παρατηρείται τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες με μεγαλύτερη απώλεια όταν αυτά συντηρούνται στους 18°C.

Συμπεράσματα: Για τη συγκέντρωση μονάδων ΟΠΑ κατάλληλων προς μεταμόσχευση πρέπει να συλλέγονται τουλάχιστον 60ml ΟΠΑ από νεογνά >36 εβδομάδων και >2300g σωματικού βάρους. Η επεξεργασία των μονάδων πρέπει να πραγματοποιείται κατά τις πρώτες 24 ώρες μετά τον τοκετό.

Λέξεις κλειδιά: Βλαστικά κύτταρα, ομφαλοπλακουντιακό αίμα, κυτταρική δόση, κρυοσυντήρηση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠΑ) έχει εξελιχθεί σε μια σημαντική πηγή βλαστικών κυττάρων για μεταμόσχευση σε ένα μεγάλο εύρος αιματολογικών ασθενειών αλλά και μη αιματολογικών κακοηθειών και διαταραχών. Ασθένειες, όπως π.χ. η οξεία μυελογενής λευχαιμία (Acute Myeloid Leukemia) (Ooi et al, 2004), μεταβολικές διαταραχές όπως η Νόσος του Krabbe (Escolar et al, 2005) και ανοσοανεπάρκειες όπως το σύνδρομο Wiskott Aldrich (Slatter et al, 2006) έχουν

¹Τράπεζα κρυοσυντήρησης ομφαλοπλακουντιακού αίματος

LIAISON Stem Cell Banking

²Α' Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

³Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αλληλογραφία:

Αναστασίου Όλγα

LIAISON Stem Cell Banking

Θερμοκοιτίδα επιχειρήσεων THERMI I

9ο χλμ Θεσ/νίκης - Θέρμης, 57001

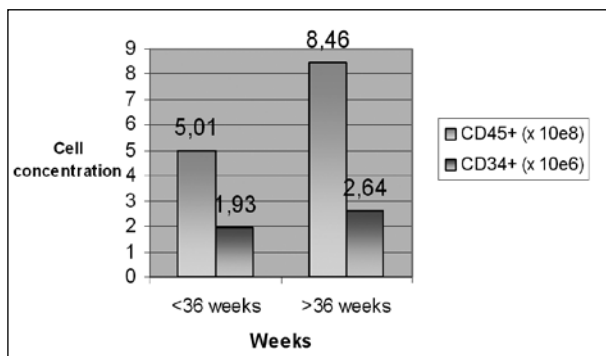
Τηλ.: 2311999980

Φαξ: 2311999982

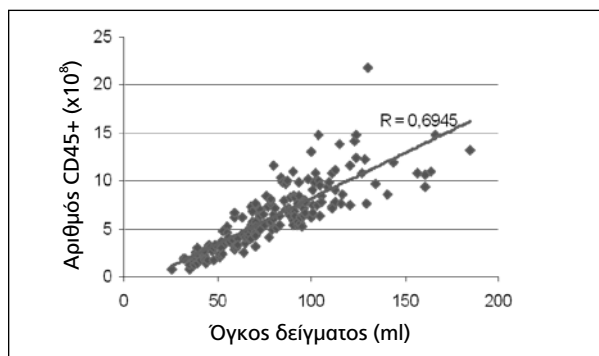
E-mail: anastasiou@liaison.com.gr

Κατατέθηκε: 15/6/09

Εγκρίθηκε: 17/8/09



Σχήμα 1. Συσχέτιση συγγέντρωσης CD45+ & CD34+ κυττάρων με την εβδομάδα κύησης.



Σχήμα 2. Συσχέτιση όγκου ΟΠΑ (ml) και αριθμού CD45+ κυττάρων.

θεραπευτεί επιτυχώς με μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Η πρώτη μεταμόσχευση ΟΠΑ ανακοινώθηκε το 1989 σε παιδί με αναιμία Fanconi από τους Gluckman et al, ενώ έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί περισσότερες από 7000 μεταμοσχεύσεις παγκοσμίως.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του ΟΠΑ σε σχέση με τα μοσχεύματα του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος είναι η γρήγορη και άμεση διαθεσιμότητα του μοσχεύματος (εντός 20-30 ημερών από τη στιγμή που θα ζητηθεί), η ανώδυνη συλλογή του, η εύκολη μεταφορά του και η μικρή πιθανότητα ιογενούς επιμόλυνσης. Επιπλέον, τα αιμοποιητικά κύτταρα του ΟΠΑ έχουν μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα από τα αντίστοιχα του μυελού ενώ παρουσιάζουν και μειωμένη επίπτωση της νόσου μοσχεύματος κατά ξενιστή (Graft versus Host Disease – GvHD) που αποτελεί σοβαρή επιπλοκή της μεταμόσχευσης (Davey et al, 2004; Grewal et al, 2003). Τέλος σε αντίθεση με το μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα, όπου απαιτείται απόλυτη γενετική ταυτότητα για να μπορέσουν να μεταμοσχευθούν, μεταμοσχεύσεις ΟΠΑ μπορούν να πραγματοποιηθούν και με απλοταυτοσημες μονάδες, κάτι που διευκολύνει την εύρεση συγγενούς ή μη, συμβατού δότη (Veys et al, 2003).

Οι περιορισμοί της ευρείας χρήσης του ΟΠΑ οφείλονται στον περιορισμένο αριθμό σε βλαστικά κύτταρα και στη μη διαθεσιμότητα, με την έννοια της επανασυλλογής του μοσχεύματος σε περίπτωση που χρειασθεί κυτταρική θεραπεία μετά τη μεταμόσχευση.

Ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την έκβαση της μεταμόσχευσης ΟΠΑ είναι η ποσότητα/συγγέντρωση κυττάρων που θα χορηγηθεί στον ασθενή. Χαρακτηριστικά, βάσει του ευρωπαϊκού οργανισμού μεταμοσχεύσεων ΟΠΑ EUROCORD πρέπει να χορηγούνται τουλάχιστον $>1.5 \times 10^7$ /kg εμπύρνηνα κύτταρα στις περιπτώσεις κακοηθών νοσημάτων και $> 3 \times 10^7$ ανά κιλό ασθενούς στις μη – κακοήθεις ασθένειες. Ο σημαντικότερος περιορισμός του ΟΠΑ ως πηγή μοσχευμάτων είναι ο

σχετικά περιορισμένος αριθμός εμπύρνηνων κυττάρων που περιέχει, με αποτέλεσμα ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων να μην περιέχουν την ελάχιστη απαιτούμενη δόση κυττάρων σύμφωνα με τις διεθνείς προδιαγραφές και να απορρίπτονται. Αν και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα μιας μονάδας ΟΠΑ είναι πολλοί, σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν περιγενετικοί και μητρικοί παράγοντες (Jones et al, 2003; Nakagawa et al, 2004) καθώς και εργαστηριακοί, όπως ο χρόνος επεξεργασίας των δειγμάτων (Shlebak et al, 1999).

Στόχος της παρούσης μελέτης αποτελεί η ανάλυση των μαιευτικών παραμέτρων που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των δειγμάτων ΟΠΑ καθώς και να προσδιοριστεί ο ελάχιστος όγκος συλλογής που αναλογεί στην απαιτούμενη αυτή κυτταρική δόση. Παράλληλα αναλύθηκαν οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων, όπως η θερμοκρασία συντήρησής τους και η χρονική καθυστέρηση μέχρι την επεξεργασία τους, με στόχο τη βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυσυντήρησής τους.

ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλογή ΟΠΑ

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 296 δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος τα οποία συλλέχθηκαν μετά από έγγραφη συναίνεση των γονέων. Οι συλλογές πραγματοποιήθηκαν μετά από φυσιολογικό τοκετό ή καισαρική τομή πριν την αποκόλληση του πλακούντα (in utero) με χρήση ασκού συλλογής ΟΠΑ (Macopharma) και κατόπιν πλήρους απολύμανσης του ομφαλίου λώρου σύμφωνα με τις τυποποιημένες διαδικασίες – λειτουργίες (ΤΔΛ) της τράπεζας.

Τα δείγματα ΟΠΑ αξιολογήθηκαν, επεξεργάστηκαν και κρυσυντήρηθηκαν το αργότερο 24 ώρες μετά τη συλλογή.

Ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων ΟΠΑ

Όλες οι διαδικασίες ανάλυσης και επεξεργασίας

των δειγμάτων ΟΠΑ διεξάχθηκαν σε απόλυτα καθαρό χώρο (grade C clean room). Η δειγματοληψία από τις μονάδες ΟΠΑ έγινε κάτω από στείρες συνθήκες σε θαλάμους νηματικής ροής (class II laminar flows). Πριν και μετά τη διαδικασία μείωσης όγκου του ΟΠΑ με το αυτοματοποιημένο κλειστό σύστημα SEPAX (Parasavvas et al, 2007) μικροδείγματα αφαιρέθηκαν για μικροβιολογική, αιματολογική και κυτταρομετρική ανάλυση.

Η μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το διαγνωστικό (IVD- In Vitro Diagnostics) σύστημα BACTAlert (Biomerieux), ο πλήρης αιματολογικός έλεγχος με τον αιματολογικό αναλυτή CellTac ενώ η κυτταρομετρική ανάλυση με το όργανο BD FACSCalibur σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ISHAGE για την καταμέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε το IVD BD Trucount kit με αντισώματα anti CD45+, anti CD34+ & 7ADD για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας.

Αξιολόγηση της βιωσιμότητας

Για το τμήμα της μελέτης που αφορά την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές 4, 24 και 48 ώρες μετά τη συλλογή, συμπεριλήφθησαν μόνο τα δείγματα που επεξεργάστηκαν άμεσα (1-4 ώρες μετά τη συλλογή), (n = 36). Μικροδείγματα ελήφθησαν τα οποία συντηρήθηκαν για 24 ή 48 ώρες στους 4°C & 18°C.

Στατιστική ανάλυση

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το χ^2 και unpaired t tests. Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μαιευτικοί - περιγεννητικοί παράγοντες και ποιότητα δειγματος ΟΠΑ

131 δείγματα ΟΠΑ συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια φυσιολογικού τοκετού (ΦΤ) και 165 μετά από καισαρική τομή (ΚΤ). Ο όγκος του αίματος, η ποσότητα και συγκέντρωση των CD45+ και CD34+ κυττάρων δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη διαδικασία συλλογής (Πίνακας 1). Το ποσοστό των επιμολύνσεων κατά τη λήψη ήταν 7,8% σε ΦΤ, όμως 4 επιμολυσμένα δείγματα βρέθηκαν και μετά από ΚΤ (4,6%) παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες καισαρικής τομής θεωρούνται στείρες. Μετά από ταυτοποίηση, βρέθηκε ότι τα μικρόβια που εμφανίζονται συχνότερα στα επιμολυσμένα δείγματα είναι τα εξής: Staphylococcus epidermis, Bifidobacterium & Bacteroides, αποδεικνύοντας τη μη επαρκή απολύμανση του ομφάλιου λώρου στο σημείο της παρακέντησης.

Σε αντίθεση με το είδος τοκετού που δε φαίνεται να επηρεάζει τη διαδικασία συλλογής, σημαντική συσχέτιση παρουσιάζεται μεταξύ των εβδομάδων κύησης και του βάρους του παιδιού με τη συγκέντρωση του δείγματος

Πίνακας 1. Σύγκριση συλλογής ΟΠΑ (όγκος και κυτταρική συγκέντρωση) κατά τη διάρκεια Φυσιολογικού τοκετού (ΦΤ) και καισαρικής τομής (ΚΤ).

	ΦΤ (n= 131)	ΚΤ (n=165)
Όγκος ml	81,24	82,11
CD45+ (x 108) cells	8,6 +/- 4,2 7,9 +/- 3,8	
CD34 (x 106)cells	2,6 +/- 2,2	2,4 +/- 2

Ο αριθμός των κυττάρων αναγράφεται με τη μορφή μέσου όρου +/- τυπικής απόκλισης (mean +/- standard deviation)

σε εμπύρηννα κύτταρα, με τα δείγματα πρόωγων νεογνών <36 εβδομάδων να παρουσιάζουν σημαντικά ελαττωμένη συγκέντρωση κυττάρων (Σχήμα 1). Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα δειγμάτων νεογνών με σωματικό βάρος <2300g τόσο για τα CD45+ (5,5 vs 8,43 x 10⁸) όσο και για τα CD34+ (1,1 vs 2,6 x 10⁸) κύτταρα.

Τέλος βρέθηκε θετική συσχέτιση του όγκου ΟΠΑ και του αριθμού CD45+ κυττάρων (r = 0.7) (Σχήμα 2), με δείγματα < 60ml να περιέχουν στατιστικά μικρότερο και ανεπαρκή αριθμό κυττάρων (2,75 x 10⁸ vs 7,6 x 10⁸ CD45+, p < 0,001).

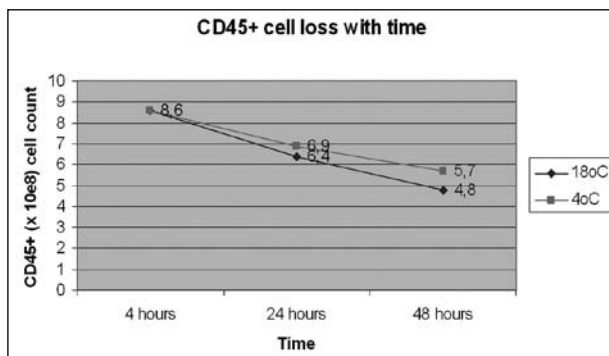
Επίπτωση της χρονικής καθυστέρησης επεξεργασίας & των συνθηκών διατήρησης των δειγμάτων ΟΠΑ στην ποιότητα τους

Οι καταλληλότερες συνθήκες θερμοκρασίας για τη συντήρηση του δείγματος μέχρι την επεξεργασία του δεν έχουν οριστεί από τις διεθνείς προδιαγραφές και η πλειονότητα των τραπέζων, σύμφωνα με τις ΤΔΔ τους, διατηρούν τα δείγματα έως 48 ώρες μετά τη συλλογή σε θερμοκρασία δωματίου. Με σκοπό να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες που εξασφαλίζουν τη βιωσιμότητα κυττάρων, μικροδείγματα συντηρήθηκαν στους 18 και 4°C για 24 και 48 ώρες.

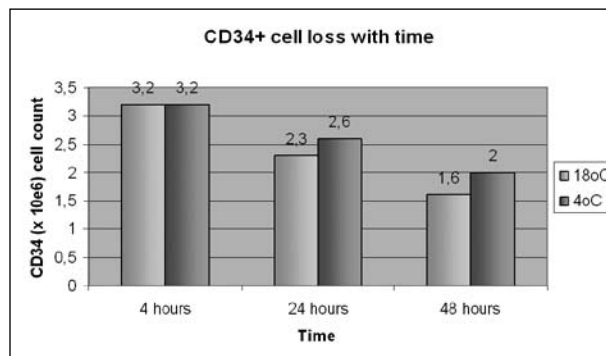
Για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4°C, η απώλεια βιώσιμων CD45+ κυττάρων ήταν 13,6% και 29,5% στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, ενώ σε θερμοκρασία δωματίου σημαντικά υψηλότερη: 20,2% και 29,6%. Ανάλογα αποτελέσματα σημειώθηκαν και με τα CD34+ κύτταρα, τα οποία εμφανίζονται και πιο ευαίσθητα, καθώς μετά από 48ώρες συντήρησης σε θερμοκρασία δωματίου, μόλις το 58,7% των κυττάρων επιβιώνουν (Σχήματα 3, 4). Οι διαφορές αυτές στη βιωσιμότητα μεταξύ 4°C και 18°C είναι στατιστικά σημαντικές (p<0,05) και για τους 2 τύπους κυττάρων (CD45+, CD34+).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα βλαστικά κύτταρα του ομφαλοπλακουντιακού



Σχήμα 3. Απώλεια βιώσιμων CD45+ κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες συντήρησης σε θερμοκρασίες 4°C & 18°C.



Σχήμα 4. Απώλεια βιώσιμων CD34+ κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες συντήρησης σε θερμοκρασίες 4°C & 18°C.

αίματος αποκτούν όλο και μεγαλύτερη εφαρμογή τόσο στην κλινική πράξη όσο και στην έρευνα. Στις μεταμοσχεύσεις, το ΟΠΑ αποτελεί πλέον μια έγκυρη εναλλακτική πηγή βλαστικών κυττάρων, αντί του μυελού των οστών ή του περιφερικού αίματος και παρουσιάζει, όπως είδαμε, πολλά πλεονεκτήματα. Σήμερα, η συνιστώμενη δόση εμπύρηνων κυττάρων για μεταμοσχεύσεις ΟΠΑ είναι τουλάχιστον $1.5 \times 10^7/\text{kg}$ για ενήλικες και $3 \times 10^7/\text{kg}$ για τα παιδιά (Mancinelli et al, 2006). Έτσι, καθίσταται όλο και πιο σημαντικό να καθοριστούν οι καλύτερες διαδικασίες επιλογής δοτών και επεξεργασίας των μονάδων, για τη βελτίωση της ποιότητας τους και την αποφυγή κρουσυντήρησης ανεπαρκών σε κύτταρα δειγμάτων ΟΠΑ.

Έχει διαπιστωθεί ότι διάφοροι μαιευτικοί παράγοντες συσχετίζονται με τη συγκέντρωση τόσο εμπύρηνων όσο και CD34+ κυττάρων στο ΟΠΑ. Στο τμήμα αυτό της παρούσης εργασίας αποδείχθηκε ότι το βάρος του νεογέννητου και το στάδιο κύησης έχουν μια θετική συσχέτιση με την αύξηση στη συγκέντρωση κυττάρων, υποστηρίζοντας δεδομένα που βρέθηκαν και σε προηγούμενες μελέτες (Chivu et al, 2007; Mohyeddin et al, 2004). Οι παράμετροι που διερευνήθηκαν και δε βρέθηκαν να έχουν κάποια συσχέτιση με την κυτταρική συγκέντρωση ΟΠΑ ήταν ο τύπος τοκετού (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή) και το φύλο του νεογνού, αν και μερικές εργασίες δείχνουν αυξημένη συγκέντρωση στα θήλαα απ' ό,τι στους άρρηνες (Nakagawa et al, 2004).

Αυτά τα αποτελέσματα, τόσο για τις συγκεντρώσεις εμπύρηνων όσο και προγονικών CD34+ κυττάρων υποδηλώνουν ότι οι πιο «πολύτιμες» μονάδες ΟΠΑ για κρουσυντήρηση και κατ' επέκταση για μεταμόσχευση προέρχονται από μεγαλύτερα σε βάρος νεογνά, που γεννιούνται με φυσιολογική διάρκεια κυοφορίας. Αυτό θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει και το ανοσοποιητικό σύστημα των νεογνών αφού ο χαμηλός αριθμός των εμπύρηνων κυττάρων είναι συνυφασμένος με χαμηλό

αριθμό λεμφοκυττάρων (McGuckin et al, 2007).

Παράλληλα με τους περιγεννητικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των δειγμάτων ΟΠΑ σημαντικό ρόλο παίζουν και παράγοντες επεξεργασίας, όπως η θερμοκρασία και ο χρόνος συντήρησης τους πριν την επεξεργασία και κατάψυξη τους.

Τα δημοσιευμένα αποτελέσματα για τα αποδεκτά χρονικά περιθώρια και θερμοκρασίες συντήρησης των δειγμάτων ΟΠΑ παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα: Ο Antonenas et al (2006) αναφέρει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells HSCs) είναι 2 έως 8°C, αναφέροντας απώλειες των CD34+ κυττάρων 9,4% και 28% σε 24 και 72 ώρες αντίστοιχα σε θερμοκρασία 2 έως 8°C. Όταν τα δείγματα διατηρήθηκαν σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου οι απώλειες έφτασαν το 21,9% και 43,3% στις 24 και 72 ώρες. Ο Hubel et al (2003) για τα ίδια χρονικά διαστήματα βρίσκει ανάλογες ανακτήσεις HSCs: 95% και 81% στους 4°C και 88% και 56% μετά την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Εν αντιθέσει, κατά τη μελέτη του Isoyama (1996) τα εμπύρηννα κύτταρα μπορούν να συντηρηθούν χωρίς πρόβλημα σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες ή και περισσότερο. Για άλλους η συντήρηση σε θερμοκρασία δωματίου είναι επίσης ευνοϊκότερη αφού αναφέρουν ανάκτηση εμπύρηνων κυττάρων της τάξης του 95% μετά από 48 ώρες (Campos et al, 1995)! Σε μια προσπάθεια επίλυσης των παραπάνω αντιφατικών δεδομένων, στα πλαίσια της παρούσης μελέτης, δείγματα συντηρήθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (το μέγιστο 72 ώρες) τόσο σε συνθήκες ψύξης (4°C) όσο δωματίου (20°C) και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα των εμπύρηνων και αρχέγονων αιμοποιητικών CD34+ κυττάρων. Βρέθηκε ότι η εκτεταμένη διατήρηση των δειγμάτων στην «υγρή» τους φάση πριν την κατάψυξη αποφέρει σημαντικές απώλειες στη βιωσιμότητα των διάφορων

κυτταρικών πληθυσμών και ιδιαίτερα των αρχέγονων CD34+ κυττάρων. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με αυτούς που υποστηρίζουν την άποψη ότι πρέπει η επεξεργασία και κρυσταλλοποίηση των μονάδων ΟΠΑ να πραγματοποιείται, το συντομότερο δυνατό μετά τη συλλογή. Αν η άμεση επεξεργασία τους δεν είναι δυνατή, τα δείγματα πρέπει να αποθηκεύονται στους 4°C.

Summary

Anastasiou O, Taki E, Xatzoglou O, Deligiannidis P, Theodoridis T, Mpontis J.

Quality of cord blood units: The possible roles of obstetric factors and of the storage/transport conditions

Helen Obstet Gynecol 21(3):256-261, 2009

Introduction: A key factor for a successful transplantation with cord blood haemopoietic stem cells is the quality of the cord blood unit (CBU) and specifically its cellular “dose” content. The aim of this study was to analyze the obstetric factors that may influence the quality of CBU samples and to determine the optimal conditions for storing and transport of CBU units prior to processing & cryopreservation. **Materials & Methods:** 296 CBUs have been analysed after written consent of the parents. The parameters studied were the following: type of delivery (vaginal or caesarean section), gestational weeks, volume collection, CD45+ and CD34 + cell concentration, microbial contamination. 36 samples were stored for 24 and 48 hours at 18°C and 4°C and their viability was assessed. **Results:** While the delivery type does not seem to influence the collected blood volume or the CD45 + and CD34 + concentration, a significant correlation was observed between the above parameters and the gestational age and newborn’s weight. Regarding the temperature and storage delays of the units before processing, a drop of cell viability is observed in both 24 and 48 hours with the highest cell loss to be observed when CBUs are maintained at 18°C. **Conclusions:** So as to obtain CBUs suitable for transplantation, at least 60 ml of cord blood should be collected preferably from neonates > 36 weeks and > 2300g weight. The processing of the units should take place during the first 24 hours after collection.

Key words: *Stem cells, cord blood, cell dose, cryopreservation.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Campos L, Roubi N, Guyotat D. Definition of optimal conditions for the collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells. *Cryobiology* 1995; 32:511-5.

2. Chivu SN, Sultana C, Bleotu C, Alexiu I, Hudita D. Optimizing donor selection in order to establish a cord blood banking facility: maternal and obstetric factors impact. *Cent Eur J Med* 2007; 2:180–9.
3. Davey S, Armitage S, Rocha V, Garnier F, Brown J, Brown CJ et al. The London Cord Blood Bank: analysis of banking and transplantation outcome. *Br J Haematol* 2004; 125:358–65.
4. Escolar ML, Poe MD, Provenzale JM, Richards KC, Allison J, Wood S, et al. Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe’s disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 2069-81.
5. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi’s anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989; 321(17):1174-8.
6. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003; 101:4233-44.
7. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Short term liquid storage of umbilical cord blood. *Transfusion* 2003; 43:626-32.
8. Isoyama K, Yamada K, Hirota Y, Ishikawa K, Imai M, Notake Y. Study of the collection and separation of umbilical cord blood for use in hematopoietic progenitor cell transplantation. *Int J Hematol* 1996; 63:95-102.
9. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 503-9.
10. Mancinelli F, Tamburini A, Spagnoli A, Malerba C, Suppo G, Lasorella R et al. Optimizing umbilical cord blood collection: Impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplant Proc* 2006; 38:1174-6.
11. McGuckin CP, Basford C, Hanger K, Habibollah S, Forraz N. Cord blood revelations: the importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother! *Early Hum Dev.* 2007; 83(12):733-41.
12. Mohyeddin Bonab MA, Alimoghaddam KA, Goliaei ZA, Ghavamzadeh AR. Which factors can affect cord blood variables? *Transfusion* 2004; 44:690-3.
13. Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuya H, Kaneko M, et al. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion* 2004; 44:262-7.
14. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Takasugi

- K, Shimohakamada Y et al. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:489-91.
15. Papassavas AC, Gioka V, Chatzistamatiou T et al. A strategy of splitting individual high volume cord blood units into two half subunits prior to processing increases the recovery of cells and facilitates ex vivo expansion of the infused haematopoietic progenitor cells in adults. *Int J Lab Hematology*. January 2007.
16. Shlebak AA, Marley SB, Roberts IA, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Jan;23(2):131-6.
17. Slatter MA, Gennery AR. Umbilical cord stem cell transplantation for primary immunodeficiencies. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6:555-65.
18. Veys P, Amrolia P, Rao K. The role of haploidentical stem cell transplantation in the management of children with haematological disorders. *Br J Haematol*. 2003;123(2):193-206.