



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάπτυξη γέλης αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό και
ομφαλοπλακουντιακό αίμα με σκοπό την εφαρμογή του στην
αναγεννητική ιατρική**

GRADUATE THESIS

**Development of platelet gel derived from peripheral and umbilical cord
blood and its possible application in regenerative medicine**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Κωνσταντίνος Παπανδρέου

Konstantinos Papandreou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Ευστάθιος Μιχαλόπουλος

Efstathios Michalopoulos



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

Development of platelet gel derived from peripheral and umbilical cord blood for its application in regenerative medicine

NAME OF STUDENT:

Konstantinos Papandreou

Registration Number: 62115007

kwstaspdr@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Efstathios Michalopoulos

AIGALEO 2020

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Κωνσταντίνος Παπανδρέου.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στην Ελληνική τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠΑ).

Θέλω να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της ΕΛ.Τ.ΟΠΑ. για την συνεργασία και την στήριξη που μου πρόσφεραν κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Συγκεκριμένα, θέλω να ευχαριστήσω τον εισηγητή μου κύριο Ευστάθιο Μιχαλόπουλο ο οποίος μου πρόσφερε αυτή την ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτήν την ερευνητική εργασία στην ΕΛ.Τ.ΟΠΑ. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Παναγιώτη Μαλλή ο οποίος στάθηκε δίπλα μου σε όλη την διάρκεια που εργαζόμουν στην ΕΛ.Τ.ΟΠΑ. και μου έμαθε όλη την δουλειά του εργαστηρίου και ο οποίος με βοήθησε πραγματικά στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας σε όλους τους τομείς.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω και την κυρία Αικατερίνη Σταυροπούλου, η οποία ως διευθύντρια της ΕΛ.Τ.ΟΠΑ με έκανε δεκτό να εργαστώ στο εργαστήριο της ΕΛ.Τ.ΟΠΑ.

Περίληψη

Εισαγωγή: Το PRP (Platelet rich plasma) Το οποίο αποτελεί προϊόν του αίματος μπορεί να προέρχεται είτε από ομφαλοπλακουντιακό είτε από περιφερικό αίμα και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλούς τομείς της αναγεννητικής ιατρικής και ειδικά στο κομμάτι της αναδόμησης ιστών και της επούλωσης πληγών. Η λειτουργία του βασίζεται σε αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων.

Σκοπός: Κύριος στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να παρασκευασθεί PRP και γέλη αιμοπεταλίων από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα με σκοπό να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά τους. Δευτερογενώς, ήταν η εφαρμογή αυτής της γέλης σε κυτταροκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από βαρτόναιο γέλη (WJ-MSCs) και να διερευνηθεί πως επηρεάζεται η ανάπτυξη τους παρουσία της γέλης αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό αίμα (PBGEL) και ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UCGEL).

Μέθοδος: Για να πραγματοποιηθούν τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 39 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος οι οποίες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία δύο φυγοκεντρήσεων ώστε να προκύψουν στο τέλος 22 μονάδες PRP. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο μονάδες από περιφερικό αίμα οι οποίες ήταν ήδη pooled. Οι πρώτες 12 μονάδες PRP από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα ενώθηκαν μεταξύ τους για να γίνει ένα Pool και στη συνέχεια, αυτή η rolled μονάδα, υποβλήθηκε σε επεξεργασία ώστε να παρασκευασθεί ένα προϊόν PRP στα 10 με 12 ml, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τις υπόλοιπες 10 μονάδες PRP από ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Όλες οι μονάδες PRP καταψύχονταν στους -20°C με αποτέλεσμα οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων να λύονται και να απελευθερώνουν τα συστατικά τους στο πλάσμα, το προϊόν που προκύπτει λέγεται Platelet Lysate (PL). Τα platelet lysate από το περιφερικό (PBPL) και από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UCPL) μετρήθηκαν ως προς τη συγκέντρωσή τους σε πρωτεΐνη. Τα επόμενα πειράματα αφορούσαν την εφαρμογή του PL στις κυτταροκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από βαρτόναιο γέλη (WJ-MSCs). Τα κύτταρα απομονώθηκαν από ομφάλιο λώρο και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό 20% (αMEM/FBS) μέχρι Passage 3 ή 4. Μετά, δημιουργήθηκαν τρεις συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας κατά τις οποίες τα WJ-MSCs αναπτύσσονταν παρουσία του PL και του PG από το περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Η πρώτη συνθήκη αφορούσε την καλλιέργεια των MSCs παρουσία ενός medium από PL περιφερικού και ομφαλοπλακουντιακού αίματος (MSCs + UC/PBPL Medium), η δεύτερη συνθήκη αφορούσε την ανάπτυξη MSCs πάνω από την γέλη αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό και

ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UC/PBGEL + MSCs), το οποίο δημιουργήθηκε μετά την προσθήκη ίσου όγκου γλυκονικού ασβεστίου στο PL και η Τρίτη συνθήκη αφορούσε την ανάπτυξη MSCs κάτω από το γέλη αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα (MSCs + UC/PBGEL).

Αποτελέσματα: Όλες οι μονάδες PRP μόλις καταψύχονται στους -20°C , τα αιμοπετάλια τους λύνονται και το μίγμα που προκύπτει λέγεται Platelet Lysate. Οι μονάδες από ομφαλοπλακουντιακό αίμα που μετατρέπονταν σε PRP είχαν κατά μέσο όρο final recovery (%) 33 με 40 %. Αυτή η τιμή για το PRP από το περιφερικό αίμα είναι αδύνατο να βρεθεί εφόσον οι μονάδες αυτές ήταν ήδη pooled και δεν ήταν γνωστή η αρχική τους συγκέντρωση σε αιμοπετάλια. Μετρήθηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο PBPL και στο UCPL και βρέθηκε ότι στο PBPL η συγκέντρωση ήταν έως και 25 mg/ml υψηλότερη από το UCPL. Παρατηρήθηκε ότι, γενικότερα, τα κύτταρα αναπτυσσότουσαν καλύτερα στο θρεπτικό υλικό με PL από το περιφερικό αίμα (MSCs+PB medium) και ότι τα κύτταρα που αναπτυσσότουσαν κάτω από την γέλη αιμοπεταλίων προερχόμενη από το περιφερικό αίμα (MSCs+PBGEL) τα κύτταρα παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη. Τα κύτταρα που αναπτυσσότουσαν πάνω στην γέλη αιμοπεταλίων έδειξαν ότι είχαν καλή ανάπτυξη και στις δύο περιπτώσεις (γέλη αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό αίμα PBGEL+MSCs και γέλη αιμοπεταλίων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα UCGEL+MSCs).

Συμπεράσματα: Το PRP από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα έχει συγκεκριμένη διαδικασία παρασκευής η οποία αν ακολουθηθεί όπως υποδεικνύουν τα ανάλογα πρωτόκολλα το τελικό προϊόν θα είναι το επιθυμητό.

Abstract

Introduction: PRP (Platelet rich plasma), which is a blood product, can be derived from either from peripheral blood or umbilical cord blood and has been used in many areas of regenerative medicine, especially in the field of tissue reconstruction and wound healing. Its function is based on growth factors secreted by platelet α -granules.

Purpose: The main goal of this study was to prepare PRP and platelet gel from peripheral and umbilical cord blood in order to study their characteristics. Secondly, the application of this gel in cell cultures of mesenteric cells from walton's gelly (WJ-MSCs) and to investigate how their development is affected in the presence of platelet gel derived from peripheral blood (PBGEL) and umbilical cord blood (UCGEL).

Method: in order to perform the experiments, 39 units of umbilical cord blood were used, which underwent two centrifugal treatments to produce 22 units of PRP. Two units of peripheral blood that were already pooled were also used to produce PRP. The first 12 units of PRP from the umbilical cord blood were joined together to form a pool which then was processed to make a PRP product at 10 to 12 ml, the same procedure was performed for the remaining 10 PRP units from umbilical cord blood. All PRP units were frozen at -20°C resulting in platelet membranes dissolving and releasing their components into the plasma, the resulting product is called Platelet Lysate (PL). Platelet lysate from the peripheral (PBPL) and umbilical cord blood (UCPL) were measured for protein concentration. Subsequent experiments involved the application of PL in cell cultures of mesenchymal stromal cells from walton's gelly (WJ-MSCs). The cells were isolated from umbilical cord and cultured in culture medium 20% (aMEM / FBS) until Passage 3 or 4. Subsequently, three cell culture conditions were created in which WJ-MSCs developed in the presence of PL and PG from the peripheral and umbilical cord blood. The first condition was the culture of MSCs in the presence of a medium of PL from peripheral and umbilical cord blood (MSCs + UC / PBPL Medium), the second condition was the culture of MSCs above the platelet gel derived from peripheral and umbilical cord blood MS. The gel was created after the addition of an equal volume of calcium gluconate to the PL. The third condition concerned the development of MSCs under the platelet gel derived from peripheral and umbilical cord blood (MSCs + UC / PBGEL).

Results: All PRP units after frozen to -20°C caused the platelets to dissolve and the resulting mixture was called Platelet Lysate. Units from umbilical cord blood that were converted to PRP had an average final recovery (%) of 33 to 40%. This value for PRP from the peripheral

blood is impossible to find with accuracy since these units were already pooled so it is impossible to know their initial concentration in platelets. Protein concentration was measured in PBPL and UCPL and it was found that in PBPL the concentration was up to 25 mg/ml higher than UCPL. It was observed that, in general, the cells proliferated better in the culture medium derived from peripheral blood PL (MSCs + PB medium) and when the cells were cultivated under the platelet gel derived from peripheral blood (MSCs + PBGEL) their proliferation was also better compared to that of the cells cultivated under the platelet gel derived from umbilical cord blood. WJ-MSCs cultivated on platelet gel showed good proliferation in both cases (platelet gel derived from peripheral blood PBGEL + MSCs and umbilical cord blood gel UCGEL + MSCs)

Discussion: PRP from peripheral and umbilical cord blood has specific procedures out of which it can be maintained. These procedures if followed as indicated by the relevant protocols the final product will be the desired one.

Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής.....	iv
Ευχαριστίες	vi
Περίληψη	viii
Abstract.....	xi
Συνοτομογραφίες	xvii
Γενικό Μέρος	3
Κεφάλαιο 1: Αίμα και Platelet Rich Plasma	4
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του αίματος.....	4
1.1.1 Ο μυελός των οστών και η αιμοποίηση.	4
1.1.2 Το πλάσμα.....	5
1.1.3 Τα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	5
1.1.4 Τα λευκά αιμοσφαίρια	6
1.1.5 Τα αιμοπετάλια.....	7
1.1.6 Η αιμόσταση.	8
1.1.7 Οι ομάδες αίματος.....	8
1.2 Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια - PRP	9
1.2.1 Τι είναι το PRP.....	9
1.2.2 PRP και Εφαρμογές	10
1.3 Πηγές Προέλευσης PRP.	12
1.3.1 PRP από περιφεριακό αίμα.	12
1.3.2 PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα	13
1.3.3 PRP από αίμα ζωικής προέλευσης	14
1.4 Τεχνικές Παρασκευής PRP.	14
1.4.1 Διάφορα πρωτόκολλα και τεχνικές παρασκευής PRP.....	16
1.4.1.1 Πρωτόκολλα και τεχνικές που βασίζονται στο περιφερικό αίμα:	16
1.4.1.2 Τεχνικές παρασκευής PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα:.....	19
Κεφάλαιο 2: Αναγεννητική Ιατρική	22
2.1 Τι είναι η αναγεννητική ιατρική	22
2.2 Υλικά και μέθοδοι που αξιοποιεί η αναγεννητική ιατρική	22
2.2.1 Η θεμέλεια ουσία	22
2.2.2 3D Bioprinting	23
2.2.3 Στελεχειαία κύτταρα.....	24

3.1 Μηχανισμός δράσης του Platelet Rich Plasma	26
3.1.1 Οι αυξητικοί παράγοντες.....	26
3.1.2 Αυξητικοί παράγοντες και τα αιμοπετάλια	26
3.1.3 Αυξητικοί παράγοντες στο Platelet Rich Plasma	27
3.1.4 Λευκοκύτταρα και Platelet Rich Plasma (Leukocyte Platelet Rich Plasma – L-PRP)	28
3.2 Διαφορές στη γέλη αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα.....	29
3.3 PRP και Εφαρμογές.....	30
3.3.1 Πομφολυγώδης επιδερμόλυσης (EB)	30
3.3.2 Η εφαρμογή του PRP για την θεραπεία των εγκαυμάτων.....	32
3.3.3 Η εφαρμογή του PRP για την θεραπεία των δερματικών ελκών των κάτω άκρων σε διαβητικούς ασθενείς.	35
3.3.4 Εφαρμογή του PRP στον τομέα της ορθοπεδικής.....	36
3.3.4.1 PRP και μόσχευμα οστών-επιγονατιδικού τένοντα.	36
3.3.4.2 PRP και πελματιαία περιτονίτιδα.....	38
3.3.5 PRP και στοματική βλεννογονίτιδα	38
3.3.6 Η εφαρμογή του PRP στον τομέα της οδοντιατρικής και της εξαγωγής δοντιών.	39
3.3.7 Η χρήση του PRP στην πλαστική χειρουργική.....	40
Ειδικό Μέρος	41
ΣΚΟΠΟΣ.....	42
Κεφάλαιο 1: Συλλογή Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος.....	43
Κεφάλαιο 2: Διαλύματα πειραμάτων.....	44
2.1 PBS 10%.....	44
2.2 Θρεπτικό Υλικό 20%.....	45
2.3 PL medium	46
Κεφάλαιο 3: Παρασκευή Platelet Rich Plasma.....	48
3.1 Επιλογή μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την Παρασκευή Platelet Rich Plasma	48
3.2 Μέθοδος παρασκευής Platelet Rich Plasma από ομφαλοπλακουντιακής προέλευσης αίμα.....	49
3.2.1 Αρχικές μετρήσεις πριν την φυγοκέντρηση	49
3.1.2 Ταυτοποίηση των ομάδων αίματος	49
3.1.3 Πως γίνεται η ένωση δύο ασκών.....	51

3.1.4	Πρώτη φυγοκέντρηση	53
3.1.5	Πρώτο extraction	54
3.2.6	Μετρήσει πριν την δεύτερη φυγοκέντρηση.	55
3.2.7	Δεύτερη φυγοκέντρηση.....	56
3.2.8	Δεύτερο extraction	56
3.2.9	Τελευταίες μετρήσεις και και αξιολόγηση του Platelet Rich Plasma.....	57
3.2.10	Pool των μονάδων Platelet Rich Plasma.....	58
3.3	Μέθοδος παρασκευής Platelet Rich Plasma από περιφερικό αίμα ενήλικου ανθρώπου.	59
3.4:	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο PL.....	60
Κεφάλαιο 4:	Καλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων από βαρτόναιο γέλη	62
4.1	Πηγή WJ-MSCs	62
4.2	Απομόνωση WJ-MSCs.....	62
4.2.1	Πλύσιμο MSCs στα 6-well	64
4.3	Ανακαλλιέργεια των WJ-MSCs.....	64
4.3.1	Ανακαλλιέργεια από 6-well σε φλάσκα	64
4.3.2	Ανακαλλιέργεια από φλάσκα σε φλάσκα	66
4.3.3	Πλύσιμο των MSCs στις φλάσκες.	67
Κεφάλαιο 5:	Μέτρηση και κυτταρομετρία ροής των WJ-MSCs	69
5.1	trypsinisation WJ-MSCs.....	69
5.2	μέτρηση κυττάρων και προσδιορισμός ζωτικότητας.....	70
5.3	Κυτταρομετρία ροής	70
Κεφάλαιο 6:	Οι τρεις συνθήκες, εφαρμογή του Platelet Rich Plasma στις κυτταροκαλλιέργειες των WJ-MSCs	73
6.1	Α' Συνθήκη: WJ-MSCs + PL medium	73
6.2	Β' Συνθήκη: WJ-MSCs + PLGEL.....	74
6.2.1	πρώτη εφαρμογή Β' συνθήκης.....	75
6.2.2	Δεύτερη εφαρμογή Β' συνθήκης.....	77
6.3	Γ' Συνθήκη: PLGEL + WJ-MSCs	78
6.3.1	Πρώτη εφαρμογή Γ' συνθήκης	78
6.3.2	Δεύτερη εφαρμογή Γ' συνθήκης (culture slides).....	80
6.3.2.1	ανοσοφθορισμός.....	81
Κεφάλαιο 7:	Αποτελέσματα μονάδων PRP	83

7.1 Αποτελέσματα μονάδων PRP προερχόμενο από ομφαλοπλακουντιακό αίμα.	83
7.2 Αποτελέσματα μονάδων PRP προερχόμενα από περιφερικό αίμα	92
7.3 Αποτελέσματα από την μέτρηση των πρωτεϊνών των PL μονάδων.	93
Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα κυτταροκαλλιιεργιών	95
8.1 Αρχική Καλλιέργεια WJ-MSCs	95
8.2 Τα MSCs στις φλάσκες.	95
8.3 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής των WJ-MSCs	96
8.4 Αποτελέσματα από τις τρεις συνθήκες ανάπτυξης των MCSs.	97
8.4.1 Α' συνθήκη: WJ-MSCs + PL medium.	97
8.4.1.1 WJ-MSCs + PBPL medium	99
WJ-MSCs + PBPL medium	99
8.4.1.2 WJ-MSCs + UCPL medium	100
WJ-MSCs + PBPL medium	100
8.4.2 Β' συνθήκη: WJ-MSCs + PLGEL.	101
8.4.2.1 WJ-MSCs + PBGEL	102
8.4.2.2 WJ-MSCs + UCGEL	104
8.4.4 Γ' συνθήκη: PLGEL + WJ-MSCs (πρώτη εφαρμογή).	106
8.4.5 Γ' συνθήκη: PLGEL + MSCs (δεύτερη εφαρμογή). Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού	108
Συζήτηση	111
Συμπεράσματα	114
Αναφορές	115

Συντομογραφίες

Αγγλική ορολογία		Ελληνική ορολογία
PRP	Platelet Rich Plasma	Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια
PLT	Platelet	Αιμοπετάλιο
PL	Platelet Lysate	
PG	Platelet Gel	Γέλη Αιμοπεταλίων
GF	Growth Factor	Αυξητικός Παράγοντας
PB	Peripheral Blood	Περιφερικό αίμα
UCB	Umbilical Cord Blood	Ομφαλοπλακουντιακό αίμα
WJ	Walton's Jelly	Βαρτόνειος Γέλη
MSCs	Mesenchymal Stromal Cells	Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα

Πρόλογος

Το Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια ή PRP (Platelet Rich Plasma) αποτελεί ένα προϊόν του αίματος το οποίο έχει βρει ευρεία χρήση τόσο στον ερευνητικό τομέα όσο και στην κλινική πράξη και κυρίως στο κομμάτι που αφορά την αναγέννηση ιστών. Το PRP πρόκειται για έναν μικρό όγκο πλάσματος στο οποίο περιέχεται υψηλή συγκέντρωση αιμοπεταλίων PLTs. Ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται στους αυξητικούς παράγοντες ή GFs (Growth Factors) οι οποίοι εκκρίνονται από τα α κοκκία των αιμοπεταλίων. Το PRP μπορεί να προέρχεται είτε από περιφερικό είτε από ομφαλοπλακουντιακό αίμα.

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας θα περιγραφεί ποιες είναι οι αρχές πίσω από τις διάφορες διαδικασίες παρασκευής του PRP καθώς θα αναλυθεί ο μηχανισμός δράσης του και το πώς εφαρμόζεται στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής. Στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας θα περιγραφθεί μία σειρά πειραμάτων κατά τα οποία αναπτύχθηκε γέλη αιμοπεταλίων ή PG (Platelet Gel) από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα με σκοπό να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά της. Δευτερογενώς, θα περιγραφεί η εφαρμογή αυτής της γέλης σε κυτταροκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από βαρτόναιο γέλη (WJ-MSCs) και το πως επηρεάζεται η ανάπτυξη τους παρουσία της γέλης αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα.

Εισαγωγή

Υπάρχουν εκατοντάδες εκφυλιστικές ασθένειες και παθήσεις οι οποίες προκαλούν την νέκρωση και την απώλεια κυττάρων και ιστών. Η ιατρική έχει αναπτύξει πολλές θεραπευτικές προσεγγίσεις για τις περισσότερες από αυτές τις ασθένειες. Αυτές οι συμβατικές θεραπείες μπορεί να αποτελούν φαρμακευτικά σκευάσματα είτε να αποτελούν μοσχεύματα με σκοπό να αντικαταστήσουν τον ιστό που χάθηκε.

Στα πλαίσια της έρευνας της επιστήμης πάνω σε αυτές τις ασθένειες, έχει αναπτυχθεί μια νέα θεραπευτική προσέγγιση. Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) πρόκειται για ένα προϊόν του αίματος με εξαιρετικές ιδιότητες όσο αφορά την θεραπεία τέτοιων ασθενειών. Το PRP αποτελείται από αιμοπετάλια, τα οποία εκτός από τον πρωταρχικό τους ρόλο στην αιμόσταση, συμβάλουν σημαντικά στην επούλωση και στην αναδόμηση των ιστών μετά από ένα τραύμα. Αυτό το καταφέρνουν χάρη στους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι εκκρίνονται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και οι οποίοι διεγείρουν την κυτταρική διέγερση.

Το PRP τα τελευταία χρόνια έχει τραβήξει το ενδιαφέρον από πολλούς επιστήμονες οι οποίοι το χρησιμοποιούν στην έρευνα και στην κλινική πράξη με στόχο να αξιοποιήσουν στο έπακρο της δυνατότητες του. Ο τομέας της ιατρικής που βρίσκει εφαρμογή το PRP είναι η αναγεννητική ιατρική και υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες προσπαθούν να προσδιορίσουν το εύρος της εφαρμογής του στον τομέα αυτό.

Το PRP μπορεί να προέρθει από αίμα ενήλικα εθελοντή αιμοδότη (περιφερικό αίμα) και από ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Δηλαδή, θα μπορούσε να θεωρηθεί, ότι η πηγή του είναι απεριόριστη. Οπότε, προκύπτει η ανάγκη να μελετηθεί στο έπακρο η χρησιμότητα και ο τρόπος αξιοποίησης ενός τέτοιου προϊόντος το οποίο έχει την δυνατότητα να σώσει μέχρι και εκατομμύρια ζωές.

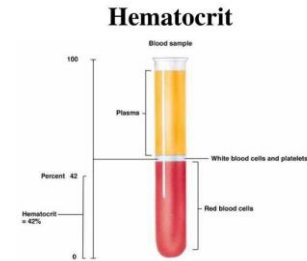
Στην παρούσα εργασία θα εξηγηθούν πολλοί όροι σχετικά με το PRP και με τους τρόπους που χρησιμεύει σήμερα στην ιατρική καθώς και τα ερευνητικά πειράματα που θα περιγραφούν θα εξηγήσουν πως ένα τέτοιο προϊόν μπορεί να παρασκευασθεί και να αξιοποιηθεί.

Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Αίμα και Platelet Rich Plasma

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του αίματος

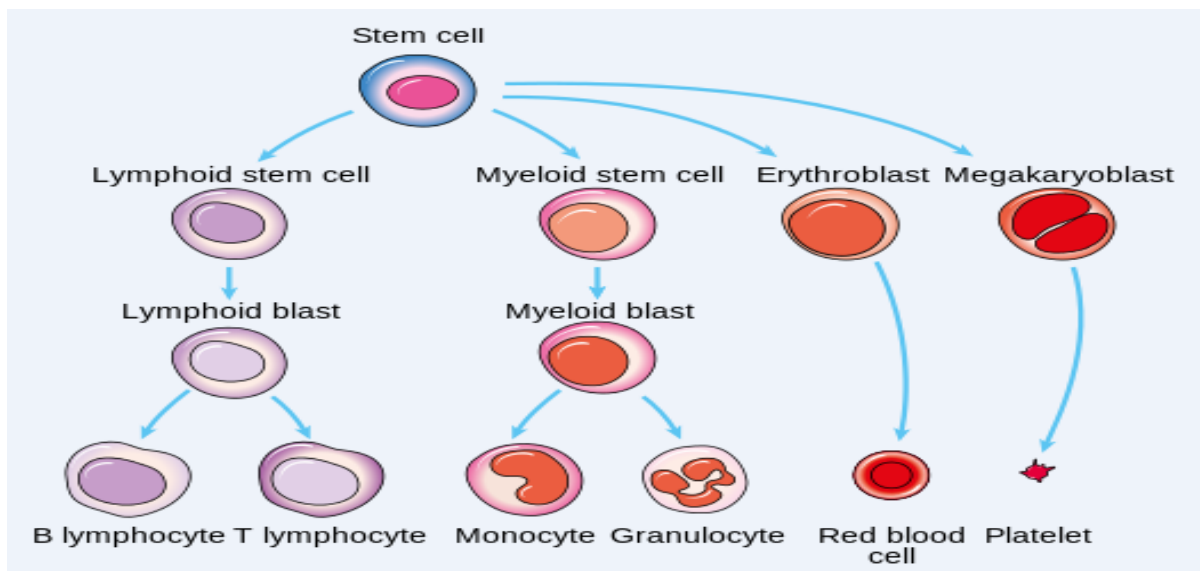
Το αίμα αποτελεί είδος συνδετικού ιστού με τα διάφορα κύτταρα που τον αποτελούν (τα **έμμορφα στοιχεία**), δηλαδή τα **ερυthroκύτταρα**, **λευκοκύτταρα** και τα **αιμοπετάλια**, να περιφέρονται μέσα στο **πλάσμα**. Από όλα αυτά τα στοιχεία που αποτελούν το αίμα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν περίπου το 45% του συνόλου του αίματος σε έναν μέσο ενήλικα. Αυτό το ποσοστό καλείται **αιματοκρίτης** (Εικ. 1). Το υπόλοιπο 55% αποτελεί το πλάσμα. Τα λευκά αιμοσφαίρια αποτελούν σχεδόν το 1% του αίματος και μπορούν να παρατηρηθούν, μετά από φυγοκέντρηση, πάνω από την στοιβάδα των ερυθρών, ως μία λεπτή λευκή στοιβάδα γνωστή ως **buffy coat** (Mescher 2014).



Εικόνα 1 - Απεικόνιση ενός σωληναρίου αίματος με διαχωρισμένα τα συστατικά του. Το ποσοστό της κόκκινης στοιβάδας (ερυthroά αιμοσφαίρια) αποτελεί τον αιματοκρίτη του δείγματος. Πηγή: <http://symbion-vip-diagnostics.over-blog.com/2019/01/hematocrit-pcv-or-hct-as-a-part-of-complete-blood-count-cbc.html>

1.1.1 Ο μυελός των οστών και η αιμοποίηση.

Η αιμοποίηση (η παραγωγή των έμμορφων στοιχείων του αίματος) αρχίζει από τον μυελό των οστών. Το **αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (Hematopoietic stem cell)** ή **HSC** είναι το κύτταρο που θα παράξει όλα τα υπόλοιπα αιμοποιητικά κύτταρα μέσω της διαφοροποίησης (Εικ. 2). Το



Εικόνα 2 - Στην εικόνα φαίνεται ένα διάγραμμα με το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο στην κορυφή και το πως αυτό διαφοροποιείται για να παράξει όλα τα κύτταρα του αίματος.

Πηγή: https://www.pngkey.com/detail/u2w7t4o0q8i1o0t4_diagram-showing-how-white-blo

συγκεκριμένο κύτταρο έχει την ιδιότητα να αυτοανανεώνεται και να κρατά σταθερό τον πληθυσμό του μέσω της κυτταρικής διαίρεσης (Kindt, Richard και Barbara 2013).

Τα HSCs μέσα στον μυελό των οστών διαφοροποιούνται και ωριμάζουν σε στενή επαφή με **στρωματικά κύτταρα (stromal cells)**. Επίσης, βρίσκονται ανάμεσα σε λιπώδη κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα. Πιο συγκεκριμένα, ο χώρος μεταξύ του λίπους και των οστικών δοκίδων είναι γεμάτος από αιμοποιητικά κύτταρα σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξης τους (Kindt, Richard and Barbara 2013; Howard and Hamilton 2004).

Τα άωρα αιμοποιητικά κύτταρα φέρουν διάφορα **μόρια προσκόλλησης** τα οποία τους επιτρέπουν να είναι προσκολλημένα στα κύτταρα του στρώματος. Καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν, οι υποδοχείς για αυτά τα μόρια μειώνονται (downregulation) και κατά συνέπεια τα αιμοποιητικά κύτταρα να προσκολούνται ασθενέστερα στα κύτταρα του στρώματος με αποτέλεσμα να μετακινούνται διαμέσου του τοιχώματος των κολποειδών προς την κυκλοφορία του αίματος (Howard and Hamilton 2004).

1.1.2 Το πλάσμα.

Το Πλάσμα, σε pH = 7,4, είναι το υγρό του αίματος που αποτελείται κατά κύριο λόγο από νερό (92%) και το υπόλοιπο από διάφορες άλλες ουσίες κυρίως θρεπτικά συστατικά αναπνευστικά αέρια, ηλεκτρολύτες, πρωτεΐνες και μεταβολικά προϊόντα από τα κύτταρα. Αυτή η σύνθεση του πλάσματος πρόκειται και για έναν καλό δείκτη των εξωκυττάρων υγρών των ιστών (Mescher 2014).

Συνοπτικά, κάποιες από τις κύριες ουσίες του πλάσματος είναι: Λευκοματίνη (συμβάλει στη δημιουργία ιξώδους του πλάσματος), α-Σφαιρίνες και β-σφαιρίνες (λιπίδια), γ-Σφαιρίνες (αντισώματα), ινωδογόνο (πρόδρομος της ινικής), ρυθμιστικές πρωτεΐνες (ένζυμα) (Mescher 2014).

1.1.3 Τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα είναι τα πολυπληθέστερα κύτταρα του αίματος τα οποία βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο της διαφοροποίησής τους, είναι κύτταρα **απύρρηνα** και το κυτταρόπλασμα τους δεν περιέχει κανένα οργανίδιο αλλά είναι γεμάτο με την πρωτεΐνη **αιμοσφαιρίνη** η οποία χαρίζει το κόκκινο χρώμα και είναι υπεύθυνη για την μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και στα όργανα (Mescher 2014).

Αυτά τα κύτταρα έχουν χαρακτηριστικό σχήμα **αμφίκυκλου δίσκου**, το οποίο αυξάνει το εμβαδόν τους και τους προσδίδει ευκαμπτότητα και την ιδιότητα να παραμορφώνονται όταν περνάνε

μέσα από στενά τριχοειδή αγγεία. Έχουν διάμετρο περίπου 7μm, πάχος 2,6μm στην περιφέρεια και μόνο 0,75μm στο κέντρο του δίσκου (Mescher 2014).

Οι φυσιολογικές τιμές τους σε μία γενική εξέταση αίματος είναι περίπου 3,9 μέχρι 5,5 εκατομμύρια στο μικρόλιτρο για τις γυναίκες και 4,1 με 6 εκατομμύρια ανά μικρόλιτρο για τους άντρες (Mescher 2014).

Η κυτταρική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου είναι η πιο πολύ μελετημένη μεμβράνη από κάθε άλλο κύτταρο και αυτό οφείλεται στην εύκολη διαθεσιμότητα της εξαιτίας της αυθονίας αυτών των κυττάρων. Αποτελείται από 40% λιπίδια, 10% υδατάνθρακες, 50% πρωτεΐνες κυρίως διαμεμβρανικές (Mescher 2014).

1.1.4 Τα λευκά αιμοσφαίρια

Τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα, είναι τα κύτταρα που σχετίζονται με την ανοσία. Έχουν την ιδιότητα να εγκαταλείπουν τα αγγεία και να κατευθύνονται στους ιστούς στόχους. Χωρίζονται σε **κοκκιοκύτταρα** και **άκοκκιοκύτταρα**. (Mescher 2014).

Τα κοκκιοκύτταρα έχουν πολύμορφους πυρήνες (πολυμορφοπύρηννα) και περιλαμβάνουν τα **ουδετερόφιλα**, τα **εωσινόφιλα** και τα **βασεόφιλα**. Ζούνε για λίγες μόνο ημέρες με λίγα μόνο μιτοχόνδρια καθώς για τις χαμηλές τους ενεργιακές τους ανάγκες στηρίζονται κυρίως στην γλυκόλυση. Αυτά τα κύτταρα περιέχουν δύο κύριους τύπους κοκκίων: **λυσosώματα (αζουρόφιλα κοκκία)** και **ειδικά κοκκία**. (Mescher 2014).

Τα ουδετερόφιλα αποτελούν τα πολυπληθέστερα λευκοκύτταρα του αίματος σε ποσοστό 54% - 62%. Έχουν διάμετρο 12 με 15μm. Έχουν σφαιρικό σχήμα όταν κυκλοφορούν στο αίμα και αποκτούν αμοιβαδοειδή κίνηση κατά τη διαπήδηση τους. Είναι τα πρώτα λευκοκύτταρα που φτάνουν στο σημείο της φλεγμονής και έχουν δυνατότητα φαγοκυττάρωσης ενάντια σε βακτήρια και μικρά σωματίδια. Τα πρωτογενή αζουρόφιλα κοκκία περιέχουν πρωτεάσες και αντιβακτηριακές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι οι: **μελοϋπεροξειδάση** ή **ΜΠΟ**, η **λυσosζύμη** και οι **Ντεφενσίνες**. Τα δευτερογενή ειδικά κοκκία είναι μικρά σε μέγεθος και βάφονται κυρίως ασθενέστερα ροζ. Εκκρίνουν κυρίως μεταλλοπρωτεϊνάσες αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο). Τέλος, τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν τις χημειοκίνες οι οποίες εκκρίνουν άλλα είδη λευκοκυττάρων και τις κυττοκίνες οι οποίες κατευθύνουν τις λειτουργίες αυτών των κυττάρων των ιστών (Mescher 2014).

Τα εωσινόφιλα αποτελούν το 1% με 3% των λευκοκυττάρων. Το μέγεθος τους είναι περίπου ίδιο ή λίγο μεγαλύτερο από ενός ουδετερόφилου και έχουν έναν χαρακτηριστικό δίοβο πυρήνα. Περιέχουν πολλά μεγάλα ειδικά οξεόφιλα κοκκία που χρωματίζονται ροζ ή κόκκινα.

Επίσης περιέχουν την μείζον βασική πρωτεΐνη η οποία μαζί με την εωσινοφιλική υπεροξειδάση και άλλες ουσίες συμμετέχει στην θανάτωση παρασίτων. Τα εωσινόφιλα ρυθμίζουν την φλεγμονώδη απόκριση απελευθερώνοντας χημειοκίνες, κυτοκίνες και μεσολαβητές λιπιδίων, παίζοντας μεγάλο ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση που συνδέεται με αλλεργίες (Mescher 2014).

Τα βασεόφιλα αποτελούν λιγότερο από το 1% των κυττάρων του αίματος και έχουν διάμετρο 12 με 15 μm . Διαθέτουν μεγάλα ειδικά κοκκία, που βάφονται μωβ, τα οποία καλύπτουν τον πυρήνα τους ο οποίος δύσκολα διακρίνεται κατά τη μικροσκόπηση. Ο πυρήνας τους διαιρείται σε δύο ανώμαλους λοβούς. Τα ειδικά αυτά κοκκία περιέχουν πολύ ισταμίνη και διάφορους άλλους μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως τον ενεργό παράγοντα των αιμοπεταλίων. Η μεγάλη βασεοφιλία των κοκκίων οφείλεται κυρίως στην παρουσία ηπαρίνης και σε άλλες θεϊκές GAGs. Στην επιφάνεια τους έχουν επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς για την **ανοσοσφαιρίνη E (IgE)** και τα συστατικά των κοκκίων τους εκκρίνονται ως απάντηση σε συγκεκριμένα αντιγόνα και αλλεργιογόνα (Mescher 2014).

Τα ακοκκιοκύτταρα περιέχουν αζουρόφιλα κοκκία (δεν έχουν ειδικά κοκκία). Οι πυρήνες τους είναι κυρίως σφαιρικοί και όχι λοβωτοί. Τα ακοκκιοκύτταρα συμπεριλαμβάνουν κυρίως τα **λεμφοκύτταρα** και τα **μονοκύτταρα**. (Mescher 2014).

Τα λεμφοκύτταρα έχουν σφαιρικό πυρήνα και είναι τα μικρότερα των λευκοκυττάρων με την χρωματίνη του πυρήνα τους να είναι εξαιρετικά συμπυκνωμένη και το κυτταρόπλασμα να φαίνεται ως δακτύλιος γύρω από τον πυρήνα. Ανάλογα με τα μόρια διαφοροποίησης, τους **CD δείκτες**, μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες. Τα **B λεμφοκύτταρα** τα **T λεμφοκύτταρα** (βοηθητικά κυτταροτοξικά) και τα **κύτταρα φυσικοί φονείς** (Natural Killer Cells). Η διάρκεια ζωής τους διαφέρει ανάλογα με την διάρκεια της λειτουργίας τους (Mescher 2014).

Τα μονοκύτταρα τα οποία είναι πρόδρομες μορφές των μακροφάγων, των οστεοβλαστών και άλλων κυττάρων του μονοπυρηνικού φαγοκυτταρικού συστήματος. Έχουν μέγεθος περίπου 12 με 15 μm και ο πυρήνας τους είναι νεφροειδούς σχήματος. Στο περιφεριακό αίμα κυκλοφορούν για περίπου 8 ώρες πριν εγκατασταθούν στους ιστούς και διαφοροποιηθούν στον ανάλογο τύπου μακροφάγα για κάθε ιστό (Mescher 2014; Kindt, Richard and Barbara 2013).

1.1.5 Τα αιμοπετάλια.

Τα **αιμοπετάλια** ή **PLTs (Platelets)** είναι μικρά απύρρηνα κυτταρικά θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων και έχουν διάμετρο 2 με 4 μm . Η λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι η πρωτογενής φάση της αιμόστασης. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται κατά την ρίξη του τοιχώματος των αγγείων. Προσκολλούνται στο εκτεθειμένο κολλαγόνο το οποίο γίνεται διαμέσου

ειδικού υποδοχέα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων (VWF). Στο αίμα βρίσκονται σε συγκέντρωση περίπου 150000 με 400000/μl και ζούν περίπου δέκα ημέρες. (Mescher 2014; Τσεβρενη and Κοντοπούλου - Γρίβα 2013). Τα αιμοπετάλια έχουν τριών ειδών κοκκία: τα **α-κοκκία**, τα **δ-κοκκία** και τα **λυσσοσώματα**. Τα δ-κοκκία περιέχουν κυρίως ADP, ATP, ασβέστιο και σεροτονίνη ενώ τα α-κοκκία περιέχουν τις περισσότερες πρωτεΐνες που εκκρίνουν (Chen, Yuan and Li 2018). Τέλος τα αιμοπετάλια περιέχουν το σύστημα πυκνών σωληναρίων και το σύστημα ανοικτών σωληναρίων (Mescher 2014; Bain, et al. 2015).

1.1.6 Η αιμόσταση.

Η αιμόσταση και η πήξη του αίματος έχουν ως κεντρικό γεγονός την παραγωγή θρομβίνης ώστε να σχηματιστεί ο ινώδης θρόμβος. Τα αιμοπετάλια στην αιμόσταση διαδραματίζουν τρεις ρόλους: Πρώτον, προσκολούνται και συσσωρεύονται και δημιουργούν τον πρωτογενή αιμοστατικό θρόμβο. Δεύτερον, απελευθερώνουν παράγοντες που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και τρίτον, παροχή μιας προπηκτικής επιφάνειας για τις αντιδράσεις του συστήματος της πήξης. (Bain, et al. 2015)

Μόλις αποκατασταθεί η βλάβη του τοιχώματος του αγγείου, το ινωδολυτικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση του θρόμβου όπου δημιουργήθηκε. (Bain, et al. 2015).

1.1.7 Οι ομάδες αίματος.

Οι ομάδες αίματος είναι αντιγόνα στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων πρωτεϊνικής φύσεως (Τσεβρενη and Κοντοπούλου - Γρίβα 2013).

Οι ομάδες ABO είναι το πρώτο σύστημα ομάδων αίματος που ανακαλύφθηκε το 1900. Περιλαμβάνει τις ομάδες A, B, O και την AB, η οποία περιγράφηκε δύο χρόνια αργότερα. Η ομάδα A είναι συνέπια της παρουσίας του αντιγόνου A και απουσία του B πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων, Η ομάδα B είναι συνέπια της παρουσίας του αντιγόνου B και απουσία του αντιγόνου A, η ομάδα AB είναι η παρουσία των αντιγόνων A και B και η ομάδα O συνεπάγεται την απουσία και των δύο αντιγόνων (Τσεβρενη and Κοντοπούλου - Γρίβα 2013).

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό αυτού του συστήματος ομάδων αίματος είναι η παρουσία φυσικών αντισωμάτων στον ορό των ασθενών anti-A και anti-B που μπορούν να βρεθούν ανάλογα εάν ένα άτομο είναι B ή A ομάδα αίματος αντίστοιχα. (Τσεβρενη and Κοντοπούλου - Γρίβα 2013).

Το σύστημα Rhesus ανακαλύφθηκε το 1940. Όπως υποστηρίζει η θεωρία του Fisher, τα αντιγόνα του συστήματος Rhesus αποτελούν 6 συγκολλητινογόνα τα οποία μπορούν να

σχηματίσουν τρία ζεύγη: Cc, Dd, Ee και μπορούν να συνδυαστούν με 8 διαφορετικούς τρόπους: CDe, cDE, cDe, cdE, CDE, και CdE (Τσεβρενη and Κοντοπούλου - Γρίβα 2013).

Στο αίμα το κάθε ανθρώπου υπάρχουν δύο συγκολλητινογόνα από κάθε ζεύγος. Η έλλειψη του ενός συνεπάγεται την παρουσία του άλλου. Να σημειωθεί ότι ο προσδιορισμός της ομάδας Rhesus γίνεται με τους ανάλογους αντιορούς. Δεν υπάρχει αντιορός anti-D εφόσον δεν υπάρχει και αντιγόνο d (Τσεβρενη and Κοντοπούλου - Γρίβα 2013).

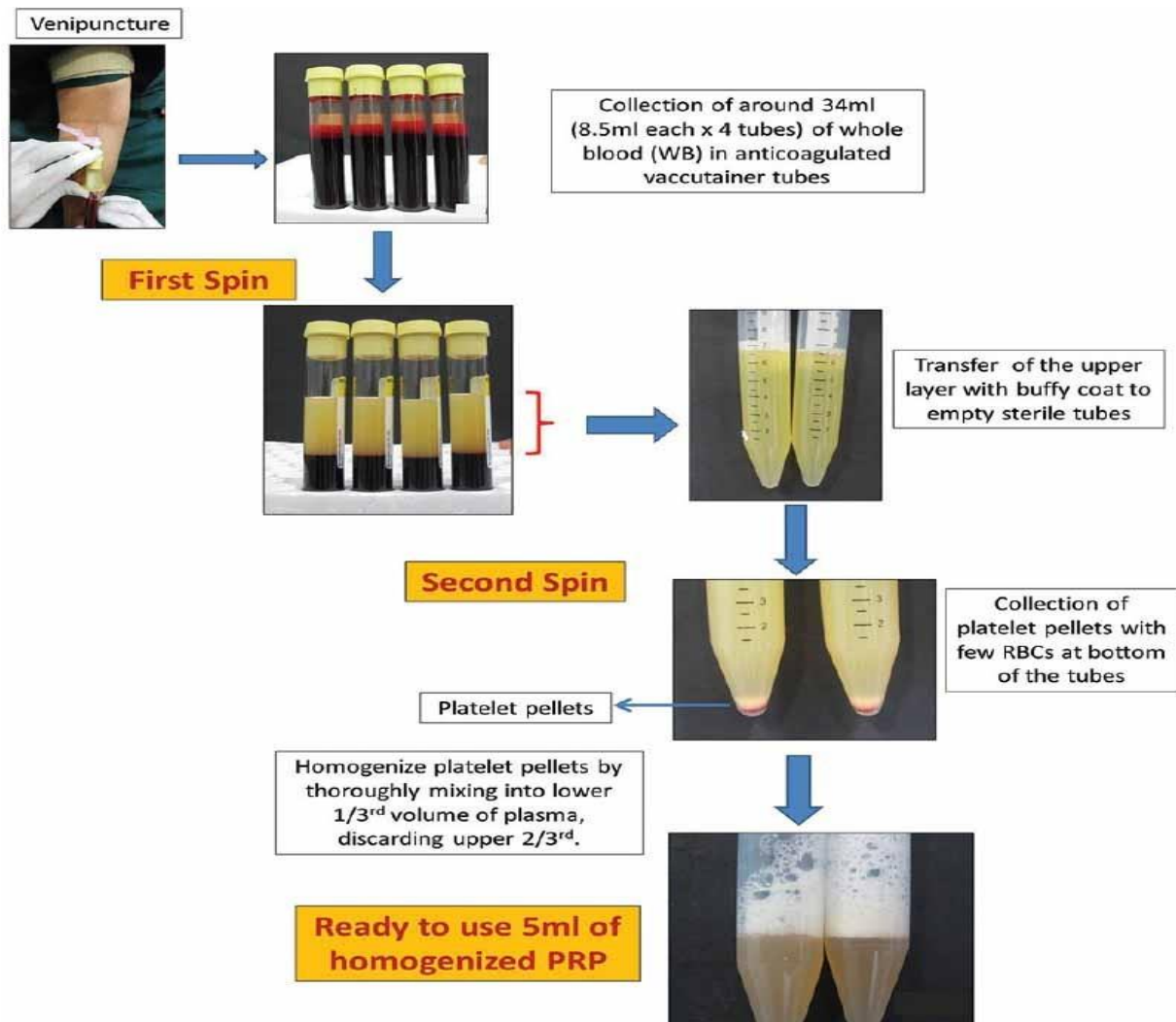
1.2 Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια - PRP

Πριν περιγραφεί το PRP, θα περιγραφούν λίγα πράγματα για τον διαχωρισμό των προϊόντων του αίματος. Το αίμα αποτελείται από όλα τα κυτταρικά στοιχεία που αναφέρθηκαν νωρίτερα και το πλάσμα. Για να διαχωριστούν τα προϊόντα του αίματος πρέπει το δείγμα με το αίμα να υποβληθεί σε φυγοκέντρηση. Δηλαδή να τοποθετηθεί το δείγμα με το αίμα σε μία φυγόκεντρο η οποία θα γυρίσει το δείγμα χιλιάδες φορές μέσα σε λίγα λεπτά με αποτέλεσμα τα στοιχεία του αίματος να χωριστούν σε στοιβάδες εξαιτίας του διαφορετικού τους βάρους. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι αυτά που κάθονται στο κάτω μέρος του δείγματος με κόκκινο χρώμα, τα λευκά αιμοσφαίρια (buffy coat) βρίσκονται ακριβώς από πάνω ως μία λεπτή λευκή στοιβάδα και το πλάσμα βρίσκεται στο πάνω μέρος του δείγματος (Basu and Kulkarni 2014).

1.2.1 Τι είναι το PRP.

Η χρήση προϊόντων αίματος σε άλλους ρόλους εκτός από τη μετάγγιση άρχισε πριν από περίπου μισό αιώνα, όταν το ινωδογόνο χρησιμοποιήθηκε ως τύπος κόλλας για να ενώσει μαζί ιστούς (Dinerstein 2019). Τό **πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια** ή **PRP (Platelet Rich Plasma)** εμφανίστηκε πρώτη φορά ως όρος τη δεκαετία του 1970. Με αυτό τον όρο περιγράφηκε αρχικά το πλάσμα με συγκέντρωση αιμοπεταλίων μεγαλύτερη από αυτήν στο περιφεριακό αίμα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως προϊόν για μετάγγιση σε ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία, όμως μερικά χρόνια αργότερα χρησιμοποιήθηκε στον τομέα της γναθοπροσωπικής χειρουργικής και βρήκε ευρεία χρήση στην μυοσκελετική θεραπευτική αθλητών. Άλλα πεδία που χρησιμοποιούν το PRP είναι η καρδιοχειρουργική, η παιδιατρική χειρουργική, η γυναικολογία, η ουρολογία, η πλαστική χειρουργική και η οφθαλμολογία και φυσικά το κομμάτι της αναγέννησης ιστών (Alves and Grimalt 2018).

Το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) είναι μια αυξανόμενη και ισχυρή θεραπευτική επιλογή της μυοσκελετικής ιατρικής. Το PRP είναι ένα παρασκεύασμα αυτόλογου πλάσματος το οποίο γενικά παρασκευάζεται από μία διαδικασία δύο φυγοκεντρήσεων, η πρώτη



Εικόνα 3 - Στις εικόνες φαίνονται συνοπτικά τα στάδια παρασκευής PRP από περιφερικό αίμα με μία μέθοδο δύο φυγοκεντρήσεων. Πηγή: doi: [10.4103/0974-2077.150734](https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734)

για να διαχωριστούν τα ερυθροκύτταρα από το πλάσμα και η δεύτερη για να συγκεντρωθούν τα αιμοπετάλια στον τελικό ελάχιστο όγκο πλάσματος (Εικ. 3) (Dhurat and Sukesh 2014; Wu, Diaz and Borg-Stein 2016). Φυσικά υπάρχουν και μέθοδοι οι οποίοι ακολουθούν πρωτόκολλο με μία φυγοκέντρηση για την Παρασκευή του PRP (Zimmer Biomet n.d.; Nagata, et al. 2010).

1.2.2 PRP και Εφαρμογές

Η χρησιμότητα και το θεραπευτικό δυναμικό μιας υψηλής συγκέντρωσης αιμοπεταλίων βασίζεται στην ικανότητά τους να παρέχουν εξαιρετικά υψηλές ποσότητες βασικών **αυξητικών παραγόντων** ή **GFs (Growth Factors)** οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν ένα ιστοειδική

αναγέννηση που διεγείρει την αποκατάσταση ιστών με χαμηλές προοπτικές φυσικής αποκατάστασης (Wu, Diaz and Borg-Stein 2016).

Το PRP αποτελείται από πολυάριθμους αυξητικούς παράγοντες (GF), οι οποίοι εκκρίνονται από μεγάλο αριθμό «ενεργοποιημένων» αιμοπεταλίων, που διευκολύνουν και ενισχύουν τη φυσιολογική επούλωση των πληγών μέσω της ταχείας αναγέννησης ιστών (Mei-Dan, et al. 2011).

Ιδιαίτερα το PRP αποτελεί μια πηγή προέλευσης του πηκτώματος ινικής, δηλαδή της **γέλης αιμοπεταλίων ή PG (Platelet Gel)**, το οποίο επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη κλινική πράξη, όπως στον τομέα της ιατρικής αναγεννητικής και στα υπόλοιπα πεδία που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Η γέλη αιμοπεταλίων μπορεί να δημιουργηθεί μετά από προσθήκη 10% γλυκονικού ασβεστίου σε αναλογία 3:1 στους 37°C. (Mallis, et al. 2019; Parazzi, Lazzari and Rebulli 2010). Το PG, ανάλογα με τα επίπεδα συγκεντρώσεων διαφόρων βασικών παραγόντων, όπως το γλυκονικό ασβέστιο και το χλωριούχο νάτριο, μπορεί να παρασκευασθεί με διάφορους βαθμούς ακαμψίας, αποδόμησης και ιξώδους (Mallis, et al. 2019). Αν και τα παρασκευάσματα PG είναι γνωστό ότι περιέχουν υψηλή συγκέντρωση μεγάλου αριθμού βιολογικών παραγόντων που εμπλέκονται στη φλεγμονή και στην αποκατάσταση των ιστών, εξακολουθεί να λείπει ο πλήρης χαρακτηρισμός τους (Longo, et al. 2016)

Το αυτόλογο PG είναι ένα νέο μέσο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την αναγεννητική ιατρική καθώς περιέχει μεγάλη συγκέντρωση σε βιολογικά ενεργές ουσίες οι οποίες πρωτίστως είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε πολύπλοκες σειρές μηχανισμών της φλεγμονής και της επούλωσης πληγών (Stammers, et al. 2009).

Εκτός από το περιφερικό αίμα, το PG μπορεί να παρασκευασθεί και από αίμα **ομφαλοπλακουντιακής προέλευσης ή CB (Cord Blood)**. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, το **Cord Blood Platelet Gel ή CBPG** περιέχει πολύ υψηλά επίπεδα αυξητικών παραγόντων όπως ο αγγειακός **αυξητικός παράγοντας (VGEF)**, ο **αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια (PDGF)** οι οποίοι μαζί με αρκετούς ακόμα αυξητικούς παράγοντες συμμετέχουν στις διαδικασίες επούλωσης πληγών και αποκατάστασης ιστών. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το PG από ομφαλοπλακουντιακό αίμα μπορεί να αξιοποιηθεί από αρκετούς τομείς της ιατρικής οι οποίοι πραγματεύονται να θεραπεύσουν ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών οι οποίες έχουν ανάγκη από την αποκατάσταση κυττάρων και ιστών. (Parazzi, Lazzari and Rebulli 2010).

Η εφαρμογή του PRP έχει δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε διάφορες παθήσεις (πχ. Χρόνιες και οξείες βλάβες οστών). Επίσης, το PRP έχει μελετηθεί ευρέως in vitro.

Για παράδειγμα σε έρευνες όπου το PRP έχει προστεθεί σε καλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι αυτά τα κύτταρα είχαν την ικανότητα να αναπτυχθούν με ταχύτερους ρυθμούς σε σχέση με τα κύτταρα που αναπτύσσονταν σε κοινά καλλιεργητικά υλικά. Επιπροσθέτως, ανάλογα με τον τρόπο όπου είχε παρασκευασθεί το PRP και ανάλογα με την σύστασή του (πχ. ένα περιείχε κλάσματα λευκοκυττάρων ή όχι), οι αυξητικοί παράγοντες μπορούσαν να βρεθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε φορά, οπότε και παρατηρήθηκαν διαφορές στην ικανότητα της διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων. Δηλαδή κάποιοι πληθυσμοί αυτών των κυττάρων θα είχαν μεγαλύτερη διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα και άλλοι προς χονδροκύτταρα. Με την σωστή αξιοποίηση αυτών των δεδομένων σε κλινικές εφαρμογές, το PRP θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη καλύτερων και πιο ανθεκτικών μοσχευμάτων από στελεχιαία κύτταρα με αποτέλεσμα να υπάρχει καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών σε μια δύσκολη θεραπεία. (Harmon and Rao 2013).

Η περιεκτικότητα σε λευκοκύτταρα στο PRP είναι κάτι που προβληματίζει αρκετά τους ειδικούς στο θέμα. Τα λευκοκύτταρα παράγουν παράγοντες που επάγουν την φλεγμονή το οποίο μπορεί να είναι ανησυχητικό όσο αναφορά την εφαρμογή του PRP στην κλινική πράξη. Βέβαια για να συμβεί σωστά η διαδικασία της επούλωσης και της ανάρωσης, η φλεγμονώδης αντίδραση είναι απαραίτητη. Οπότε το PRP θα πρέπει να διαχωρίζεται ανάλογα και με της ανάγκες τις οποίες το απαιτούν σε **πλούσιο σε λευκοκύτταρα PRP** ή **LR-PRP (Leukocyte rich PRP)** και σε **φτωχό σε λευκοκύτταρα PRP** ή **LP-PRP (Leukocyte Poor PRP)** και σε PRP για αυτόλογη ή ετερόλογη χρήση (Lana, et al. 2019; Lana, et al. 2019). Για παράδειγμα το LP-PRP έχει αποδειχθεί ότι προάγει την αναγέννηση των ινοβλαστών στον άνθρωπο καθώς παράγει αυξητικούς παραγόντες που αναφέραμε παραπάνω (Noh, et al. 2008).

Τέλος, είναι κατανοητό ότι το PRP είναι ένα πολλά υποσχόμενο προϊόν για την θεραπεία εκφυλιστικών νοσημάτων, επειδή όμως το PRP πρόκειται για ένα περίπλοκο βιολογικό παράγωγο θα πρέπει να μελετηθούν πολλά ακόμα χαρακτηριστικά του. Για παράδειγμα, η ποσοτικοποίηση των αιμοπεταλίων και προσδιορισμός των αυξητικών παραγόντων πρέπει να καθοριστούν προκειμένου να κατανοηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί πίσω από την αναγεννητική ισχύ του PRP (Amable, et al. 2013).

1.3 Πηγές Προέλευσης PRP.

1.3.1 PRP από περιφεριακό αίμα.

Μια από τις πιο κοινές πηγές PRP είναι το περιφερικό αίμα του ανθρώπου, αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα με αιμοληψία λίγων ml αίματος (π.χ 30 cc) σε σωληνάριο

με αντιπηκτικό και στη συνέχεια να ακολουθήσει η υπόλοιπη διαδικασία για την παρασκευή του. (Dhurat and Sukesh 2014).

Ακόμα και απο ολικό αίμα απο εθελοντές αιμοδότες, το οποίο συλλέγεται σε ασκους συλλογής σε όγκο μεγαλύτερο των 200 ml είναι δυνατόν να επεξεργασθεί και να ετοιμασθεί το platelet rich plasma. (Yin, et al. 2017).

Σε όλες τις περιπτώσεις είναι αναγκαία η συγκατάθεση του δότη, τόσο για την συλλογή του αίματος όσο και για την επεξεργασία του

1.3.2 PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα

Μια άλλη πηγή από την οποία μπορούμε να παρασκευάσουμε PRP είναι το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε τράπεζες ομφαλοπλακουντιακού αίματος όπου το αίμα συλλέγεται αμέσως μετά την γέννα από υγιείς μητέρες σε πλαστικούς ασκους με την προσθήκη αντιπηκτικού 29 με 30 ml CPDA. Το αίμα αυτό προορίζεται για απομόνωση και καλλιέργεια αρχαίγονων αιμοποιητικών κυττάρων με σκοπό την ανάπτυξη μοσχευμάτων για ασθενείς με αιματολογικά προβλήματα. Για να μπορέσει μια μονάδα με ομφαλοπλακουντιακό αίμα να επεξεργασθεί με σκοπό την ανάπτυξη αυτών των μοσχευμάτων θα πρέπει να τηρούνται κάποια αυστηρά κριτήρια. Το PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα μπορεί να παρασκευασθεί από μονάδες οι οποίες δεν τηρούν αυτά τα κριτήρια, όμως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άλλους σκοπούς (Rebulla, et al. 2016).

Γενικά τα κριτήρια για να επιλέξουμε μία μονάδα ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την παρασκευή PRP είναι τα παρακάτω:

- Συγκατάθεση της μητέρας δότριας για την δωρεά του ομφαλοπλακουντιακού αίματος καθώς να είναι σύμφωνη να χρησιμοποιηθεί το αίμα για παρασκευή προϊόντων όπως το PRP και PG εάν η μονάδα αίματος δεν τηρεί τους κανόνες για μεταμόσχευση σε αιματολογικά νοσήματα.
- Το ιατρικό ιστορικό της μητέρας δότριας του ομφαλοπλακουντιακού αίματος πρέπει να είναι αρνητικό.
- Ο απόλυτος αριθμός εμπύρηνων κυττάρων να είναι μικρότερος από 1,5 δισεκατομμύρια ($<1,5 \cdot 10^9$ /CB unit)
- Ολικός όγκος δείγματος, συμπεριλαμβανομένου το αντιπηκτικό, μεγαλύτερος από 50ml.
- Συγκέντρωση αιμοπεταλίων μεγαλύτερη από $150 \cdot 10^3$ στο μικρόλιτρο ($>150 \cdot 10^3$ PLTs/μl).
- Αρνητικά αποτελέσματα εξετάσεων του αίματος για αιματογενός μεταδιδόμενα παθογόνα (ηπατίτιδα B, ηπατίτιδα C, Σύφιλη, HIV, HTLV I/II). (Rebulla, et al. 2016)

1.3.3 PRP από αίμα ζωικής προέλευσης

Όπως και από το ανθρώπινο αίμα, το PRP μπορεί να παρασκευασθεί και από αίμα ζώων. Ο λόγος που κάποια εργαστήρια επιλέγουν να παρασκευάσουν PRP από αίμα ζώων μπορεί να είναι επειδή θέλουν να μελετήσουν την θεραπευτική και αναγεννητική ικανότητα του PRP σε διάφορους ιστούς (π.χ χόνδρους) (Kon, et al. 2010; Manafi, et al. 2012) ή επειδή θέλουν να τυποποιήσουν μία μέθοδο PRP σε ζωικό μοντέλο (Beheshtiha, Abarkar and Anvar 2015; Messori, et al. 2011).

Έχουν περιγραφεί πολλές μέθοδοι για την Παρασκευή PRP από αίμα ζώων οι οποίες δεν διαφέρουν ιδιαίτερα από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την Παρασκευή PRP από περιφερικό αίμα ανθρώπου, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι χρησιμοποιούνται μέθοδοι παρασκευής PRP σε ζωικά μοντέλα οι οποίες χρησιμοποιούνται ήδη για την παραγωγή PRP από περιφερικό αίμα ανθρώπου (οι Kon et al χρησιμοποίησαν το σύστημα “PCCS®”, Biomet-Merck, Bridgend, UK” το οποίο κυκλοφορεί στην αγορά και χρησιμοποιείται για την Παρασκευή PRP προερχόμενο από ανθρώπινο αίμα) (Kon, et al. 2010). Γενικά υπάρχουν πολλές έρευνες κατά τις οποίες στόχος τους ή κάποιο κομμάτι αυτών αποτελούσε την παρασκευή PRP από αίμα ζώων, όπως για παράδειγμα: αίμα από κουνέλια (Manafi, et al. 2012; Beheshtiha, Abarkar and Anvar 2015), επιμύες (Messori, et al. 2011) και πρόβατα (Kon, et al. 2010).

1.4 Τεχνικές Παρασκευής PRP.

Υπάρχει μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων και τεχνικών για την Παρασκευή του PRP τα οποία είναι αδύνατο να καλύψουμε σε αυτήν την εργασία. Η αρχή μεθόδου πίσω από τις τεχνικές παρασκευής PRP βασίζονται στις φυγοκεντρήσεις (μία ή δύο ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιούμε), στις οποίες υποβάλλεται το αίμα με σκοπό να διαχωριστούν τα συστατικά του με βάση το βάρος τους. Τα ερυθροκύτταρα που κάθονται στο κάτω μέρος, το buffy coat με τα λευκοκύτταρα και ακριβώς από επάνω τα αιμοπετάλια και το πλάσμα. Το PRP προκύπτει από την απομόνωση των αιμοπεταλίων σε μικρό όγκο πλάσματος. (Dhurat and Sukesh 2014).

Μπορούμε να χωρίσουμε το προϊόν που παρασκευάζουμε με βάση το επίπεδο των λευκοκυττάρων και την πυκνότητα της ινικής που περιέχεται στο PRP.

1. Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) ή PRP φτωχό σε λευκοκύτταρα είναι το PRP το οποίο δεν περιέχει λευκοκύτταρα και το δίκτυο της ινικής σε χαμηλή πυκνότητα μετά την ενεργοποίηση.
2. Leucocyte and PRP (L-PRP) είναι το PRP το οποίο περιέχει λευκοκύτταρα και δίκτυο ινικής σε χαμηλή πυκνότητα μετά την ενεργοποίηση.

3. Pure platelet-rich fibrin (P-PRF) ή leucocyte-poor platelet-rich fibrin. Αυτό αποτελεί ένα προϊόν χωρίς λευκοκύτταρα με μεγάλης πυκνότητας δίκτυο ινικής και υπάρχει μόνο σε μορφή gel το οποίο χρησιμοποιείται ως κόλλα μεταξύ ιστών.
4. Leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) ή second-generation είναι προϊόντα με λευκοκύτταρα με μεγάλης πυκνότητας δικτυού ινικής.

Από τις παραπάνω κατηγορίες, η δεύτερη είναι η πιο κοινή ανάμεσα στα διάφορα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται (Dohan, Rasmusson and Albrektsson 2009; Dohan Ehrenfest, Bielecki, et al. 2012).

Τα χαρακτηριστικά και η ποιότητα ενός προϊόντος PRP επηρεάζεται κατά πολύ από το πρωτόκολλο και τα βήματα κάθε διαδικασίας για παράδειγμα οι συνθήκες και ο αριθμός των φυγοκεντρήσεων, η απόσταση του αίματος από το κέντρο της φυγόκεντρου, ο όγκος του συνολικού αίματος που επεξεργάζεται, η θερμοκρασία και πολλά άλλα. Παρακάτω θα αναλυθούν μερικούς από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του PRP. (Dhurat and Sukesh 2014).

Η αιμοληψία: η λάθος τεχνική της αιμοληψίας μπορεί να επηρεάσει το αίμα που συλλέγεται. Δηλαδή μπορεί το αίμα να αιμοληθεί ή να θρομβώσει. Ένα μέτρο που μπορεί να ληφθεί είναι η χρήση βελόνας με μεγαλύτερη διάμετρο ώστε να μειωθεί η καταστροφή των κυττάρων από την αιχμή και τα τοιχώματα της βελόνας (Dhurat and Sukesh 2014).

Φυγοκέντρωση: Εάν παραμείνει το αίμα στο σωληνάριο πάνω στον πάγκο, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα τα συστατικά του θα χωριστούν, όπως περιγράφηκε παραπάνω, εξαιτίας της βαρύτητας της Γής. Όμως, με αυτόν τον τρόπο διακινδυνεύεται να αλλοιωθούν πολλά από τα στοιχεία του αίματος με το πέρασμα του χρόνου. Όποτε, το να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση στο αίμα αποτελεί έναν γρήγορο τρόπο να διαχωριστούν τα συστατικά του. Η συνθήκες της φυγοκέντρωσης πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τα κυτταρικά συστατικά που θα διαχωριστούν και το είδος της φυγόκεντρου με βάση το οποίο θα ρυθμιστεί το πρόγραμμα φυγοκέντρωσης. Η δύναμη RCF είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των συστατικών κατά την φυγοκέντρωση η οποία ρυθμίζεται ανάλογα με την απόσταση του δείγματος από το κέντρο της φυγόκεντρου και τον αριθμό των στροφών ανά λεπτό (τα δείγματα σε φυγόκεντρους διαφορετικού μεγέθους οι οποίες δουλεύουν στις ίδιες στροφές θα δέχονται διαφορετικά RCFs) (Dhurat and Sukesh 2014).

Θερμοκρασία: Οι τιμές της θερμοκρασίας είναι σημαντικές καθ' όλη την διαδικασία και κυρίως κατά τις φυγοκεντρήσεις. Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάζει την κατάσταση των αιμοπεταλίων (π.χ να ενεργοποιηθούν) καθώς και την ανάκτηση τους (Dhurat and Sukesh 2014).

Αντιπηκτικά: Τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται για την διατήρηση του αίματος θα πρέπει να επιλέγονται με βάση ποιο έχει μικρότερη επίδραση στα αιμοπετάλια. Για παράδειγμα το EDTA αποφεύγεται επειδή αλλοιώνει την μεμβράνη των αιμοπεταλίων, οπότε προτιμούνται κιτρικά αντιπηκτικά (ACD-A, CPD-A) (Dhurat and Sukesh 2014).

Ενεργοποίηση του PRP: Όταν ενεργοποιείται το PRP, δηλαδή τα αιμοπετάλια, δημιουργείται ένα δίκτυο ινικής το οποίο φαίνεται ως η δημιουργία πηγματος. Η ενεργοποίηση πραγματοποιείται με την προσθήκη θρομβίνης ή ασβεστίου. εάν η εφαρμογή του PRP γίνει σε μαλακούς ιστούς, όπου το PRP έρχεται σε επαφή με κολλαγόνο, τότε δεν χρειάζεται να ενεργοποιηθεί από πριν εφόσον, όπως συμβαίνει και στα τραύματα του δέρματος, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται όταν έρχονται σε επαφή με το κολλαγόνο (Dhurat and Sukesh 2014).

1.4.1 Διάφορα πρωτόκολλα και τεχνικές παρασκευής PRP

1.4.1.1 Πρωτόκολλα και τεχνικές που βασίζονται στο περιφερικό αίμα:

Το πρωτόκολλο που ανέπτυξαν οι Paola et al. Πρόκειται για μία διαδικασία δύο φυγοκεντρήσεων το οποίο χρησιμοποιεί αίμα σε ποσότητα 5ml μετά από αιμοληψία σε σωληνάριο με αντιπηκτικό 0,5ml κιτρικό νάτριο 3,2%. Μικρή ποσότητα από αυτό το αίμα, εφόσον αναμειχθεί καλά με το αντιπηκτικό, χρησιμοποιείται για γενική αίματος ώστε να προσδιοριστεί η αρχική συγκέντρωση των κυτταρικών στοιχείων του αίματος πριν την υπόλοιπη διαδικασία. Ύστερα ακολουθεί η πρώτη φυγοκέντρωση, όπου το αίμα υποβάλλεται σε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 300g και σε θερμοκρασία 18°C (θερμοκρασία δωματίου). Μετά από αυτή την πρώτη φυγοκέντρωση το αίμα έχει διαχωριστεί στα επιμέρους συστατικά του (ερυθρά αιμοσφαίρια, το buffy coat με τα αιμοπετάλια από πάνω και το πλάσμα). Σε αυτό το σημείο συλλέγεται το πλάσμα μαζί με τα αιμοπετάλια από το πάνω μέρος του σωληναρίου με προσοχή ώστε να μην συλλεχθεί μαζί κομμάτι από την στοιβάδα των λευκοκυττάρων(buffy coat) ή των ερυθροκυττάρων. Το πλάσμα που έχει απομονωθεί μεταφέρεται σε νέο στείρο σωληνάριο και χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα από αυτό για γενική αίματος ώστε να προσδιορισθούν τα κυτταρικά στοιχεία που έχουν απομονώθηκαν μαζί με το πλάσμα. Ο στόχος είναι να έχουν απομονωθεί όσο το δυνατόν περισσότερα αιμοπετάλια και όσο το δυνατόν λιγότερα από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος. Μετά, το πλάσμα υποβάλλεται σε δεύτερη φυγοκέντρωση για 17 λεπτά σε 700g και σε θερμοκρασία 18°C. Σε αυτό το σημείο όλα τα αιμοπετάλια μαζί με όποια κυτταρικά στοιχεία υπάρχουν στο πλάσμα θα έχουν συγκεντρωθεί στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Το **πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια** ή **PPP (Platelet Poor Plasma)**, το οποίο αποτελεί το πλάσμα στο πάνω μέρος του σωληναρίου, αφαιρείται και το πλάσμα που απομένει

στο κάτω μέρος του σωληναρίου αποτελεί το PRP. Μικρή ποσότητα από το PRP και από το PPP απομονώνονται για γενική εξέταση αίματος για να προσδιοριστούν τα κυτταρικά τους στοιχεία. Στόχος είναι η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο PRP να είναι αρκετά υψηλή όπως και η ανάκτηση (recovery%) των αιμοπεταλίων στο PRP από τον αρχικό αριθμό των αιμοπεταλίων στο αίμα να είναι η μέγιστη. Η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο PPP πρέπει να είναι ελάχιστη αν όχι μηδενική, δηλαδή να μην έχουν απομείνει ή χαθεί αιμοπετάλια στο PPP (Amable, et al. 2013).

Το PRP που παράγεται με την παραπάνω τεχνική μπορεί να χαρακτηριστεί ως PRP φτωχό σε λευκοκύτταρα ή LP-PRP εφόσον λιγότερα από το 0,3% των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων απέμεινε στο τελικό προϊόν (Amable, et al. 2013).

Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί μία τεχνική όπου το τελικό προϊόν έχει πολύ ικανοποιητική ανάκτηση αιμοπεταλίων και πολύ καλή αναπαραγωγικότητα. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο αναπτύσσεται μετά από πολλές δοκιμές και επαναλήψεις της τεχνικής με διαφορετικές παράμετρους κάθε φορά. Για παράδειγμα οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την πρώτη φυγοκέντρωση (5 λεπτά σε 300g και σε θερμοκρασία 18°C) φάνηκαν ότι είναι οι ιδανικές ώστε η ανάκτηση των αιμοπεταλίων μετά την πρώτη φυγοκέντρωση να είναι η μέγιστη (recovery% >60). Όπως αναφέρουν στην συγκεκριμένη έρευνα, δοκίμασαν να φυγοκεντρήσουν το αίμα σε διάφορες συνθήκες (διάφορους χρόνους και RCF) και διαπίστωσαν ότι μικρός χρόνος πρώτης φυγοκέντρωσης με υψηλό RCF ήταν οι ιδανικότερες παράμετροι για την παραπάνω ανάκτηση. Για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την δεύτερη φυγοκέντρωση, το πλάσμα που είχε απομονωθεί από την πρώτη φυγοκέντρωση υποβλήθηκε σε διάφορες συνθήκες όσο αφορά τον χρόνο και το RCF της δεύτερης φυγοκέντρωσης και διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστες παράμετροι είναι για 17 λεπτά στα 700g. Οι συγκεκριμένες παράμετροι επέτρεπαν την μικρότερη απώλεια αιμοπεταλίων στο PPP. Όσο αφορά την θερμοκρασία, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ανάκτηση των αιμοπεταλίων όταν οι φυγοκεντρήσεις δούλευαν στους 12 °C ή στους 18°C (Amable, et al. 2013).

Οι Yin et al. ανέπτυξαν επίσης μία μέθοδο για να παρασκευάσουν αγνό PRP (P-PRP). Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποίησαν ολικό αίμα από εθελοντές αιμοδότες (216ml αίματος ανα εθελοντή) το οποίο στη συνέχεια αναμείχθηκε με 24 ml ACD-A αντιπηκτικού. Επιπλέον 2ml ολικού αίματος συλλέχθηκαν από κάθε εθελοντή σε σωληνάκια με αντιπηκτικό K2 EDTA για γενική αίματος και προσδιορισμό των αρχικών κυτταρικών στοιχείων του αίματος πριν την υπόλοιπη διαδικασία. Το αίμα χωρίστηκε σε ειδικά σωληνάκια φυγοκέντρωσης (40ml σε κάθε σωληνάριο) τα οποία τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για να ακολουθηθεί η υπόλοιπη διαδικασία. Για την πρώτη φυγοκέντρωση για προσδιοριστούν οι βέλτιστες παράμετροι για

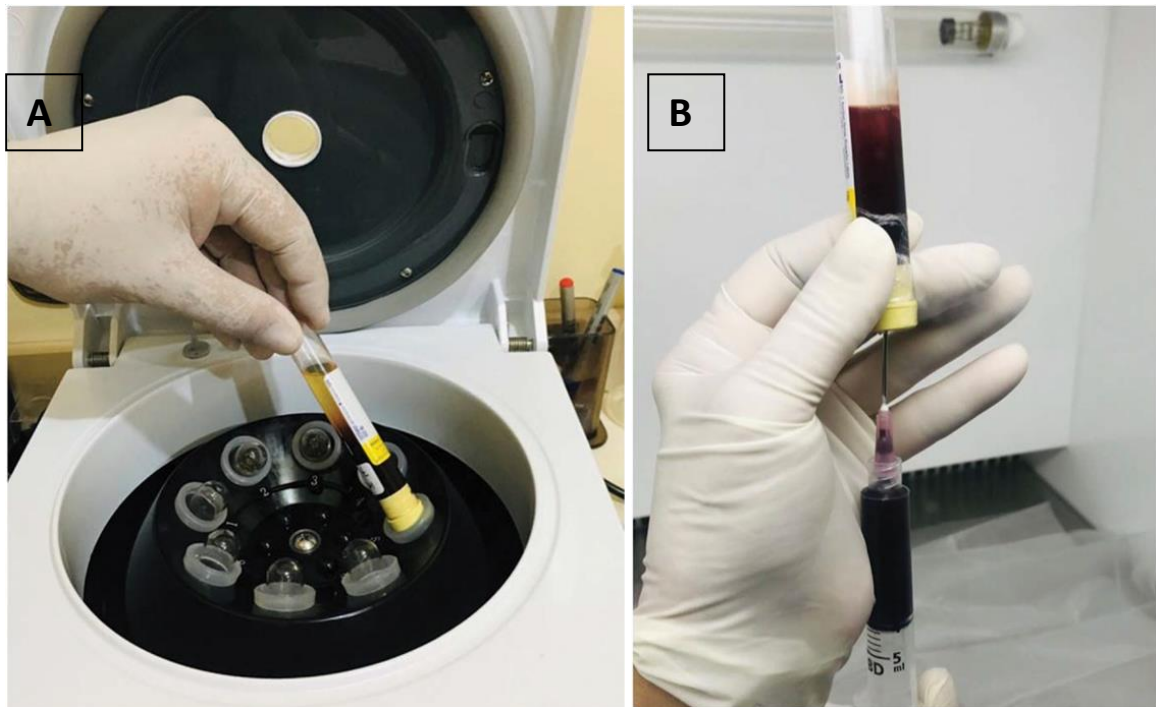
καλύτερη ανάκτηση και τελική συγκέντρωση των αιμοπεταλίων έγιναν δοκιμές με διάφορες συνθήκες και διαπιστώθηκε ότι οι βέλτιστες παράμετροι είναι φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 160g. Μετά την πρώτη φυγοκέντρωση τα συστατικά του αίματος ήταν χωρισμένα σε τρεις στοιβάδες με τα αιμοπετάλια να βρίσκονται πάνω από το buffy coat. Το πλάσμα από το πάνω μέρος του σωληναρίου αναρωφήθηκε όλο με προσοχή ώστε να μην γίνει επιμόλυνση από την στοιβάδα των ερυθροκυττάρων ή του buffy coat και μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο για την επόμενη φυγοκέντρωση. Για την δεύτερη φυγοκέντρωση έγιναν επίσης δοκιμές για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες παράμετροι για την καλύτερη ανάκτηση των αιμοπεταλίων με τις πιο αποτελεσματικές να είναι η φυγοκέντρωση για 15 λεπτά σε 250g (Yin, et al. 2017).

Η παραπάνω μέθοδος παρασκευής PRP αποτελεί μια μέθοδο δύο φυγοκεντρήσεων η οποία όχι μόνο αποδίδει ένα τελικό προϊόν P-PRP με αρκετά ικανοποιητική συγκέντρωση αιμοπεταλίων, αλλά και ένα προϊόν με ικανοποιητική περιεκτικότητα σε αυξητικούς παράγοντες. Αυτά τα δύο στοιχεία μπορούν να χαρακτηρίσουν αυτή τη μέθοδο ικανή να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη (Yin, et al. 2017).

Ένα πρωτόκολλο το οποίο αξίζει να αναφερθεί, είναι αυτό των Machado et al. το οποίο πρόκειται μία εύκολη διαδικασία με χαμηλό κόστος. Το ονόμασαν “Turn down – turn up protocol” και πρόκειται για ένα πρωτόκολλο δύο φυγοκεντρήσεων (Machado, et al. 2019). Εν συντομία τα βήματα:

- Αίμα συλλέγεται από εθελοντές σε ποσότητα 8,5 ml σε σωληνάρια και αναμηνγνίζεται με το αντιπηκτικό ACD 1,5 ml.
- Τα σωληνάρια τοποθετούνται στην φυγόκεντρο ανάποδα με το καπάκι προς τα κάτω (Εικ. 4A) και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά σε 200g (1^η φυγοκέντρωση).
- Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρωση και τα συστατικά του αίματος έχουν διαχωριστεί, αφαιρείται το σωληνάριο από την φυγόκεντρο χωρίς να το γυρίσουμε σε όρθια θέση (δηλαδή το καπάκι προς τα κάτω) και προσεκτικά αφαιρούμε την στοιβάδα των ερυθρών από την κάτω μεριά με την βοήθεια βελόνας και σύριγγας (Εικ. 4B).
- Το σωληνάριο τοποθετείται ξανά στην φυγόκεντρο αυτή τη φορά σε κανονική θέση (το καπάκι προς τα πάνω) και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 1600g (δεύτερη φυγοκέντρωση).
- Μετά την δεύτερη φυγοκέντρωση αφαιρείται από την πάνω μεριά το PPP με τη βοήθεια σύριγγας και απομένει στο σωληνάριο ποσότητα 1 με 2 ml PRP.
(Machado, et al. 2019).

Με αυτή την μέθοδο έχει διαπιστωθεί ανάκτηση αιμοπεταλίων πάνω από 70%. Αυτό το πρωτόκολλο είναι το δεύτερο κομμάτι της έρευνας του turn down – turn up protocol. Το πρώτο κομμάτι αποτελούσε την Παρασκευή PRP χρησιμοποιώντας δύο μεθόδους μίας φυγοκέντρησης και δύο μεθόδων δύο φυγοκεντρήσεων. Αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθούν με το turn down – turn up protocol όπου αποδείχθηκε ότι η τελική συγκέντρωση των αιμοπεταλίων σε αυτό το πρωτόκολλο ήταν αρκετά μεγαλύτερη από συγκεντρώσεις που πήραν από τις μεθόδους στο πρώτο κομμάτι της έρευνας (Machado, et al. 2019).



Εικόνα 4 - Βήματα πρωτοκόλλου turn up - turn down για την παρασκευή PRP. Α) το σωληνάριο με το αίμα τοποθετείται ανάποδα στην φυγόκεντρο για την πρώτη φυγοκέντρηση. Β) αναρρόφηση της στοιβάδας των ερυθρών αιμοσφαιρίων αμέσως μετά την πρώτη φυγοκέντρηση. Πηγή: doi: [10.6061/clinics/2019/e1132](https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e1132)

Υπάρχουν πολλές ακόμα μέθοδοι για το πώς ένα προϊόν PRP μπορεί να παρασκευασθεί, όπως και οι παράμετροι της κάθε μεθόδου οι οποίες τις καθιστούν ικανές να δώσουν ένα ικανοποιητικό αποτέλεσμα διαφέρουν από μέθοδο σε μέθοδο και εξαρτώνται πάντα από τα υλικά και τον εξοπλισμό του κάθε εργαστηρίου ακόμα και από την εμπειρία του ίδιου του προσωπικού. Όλα τα παραπάνω πρωτόκολλα αναπτύχθηκαν με σκοπό να βοηθήσουν να βελτιστοποιηθεί η τεχνική για την παρασκευή PRP σε σχέση με τα ήδη διαθέσιμα kits και μεθόδους που χρησιμοποιούνται (για παράδειγμα αναφέρονται το Curasan PRP kit και το σύστημα PCCS PRP (Weibrich and Kleis 2002).

1.4.1.2 Τεχνικές παρασκευής PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα:

Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (CB) αποτελεί μία εναλλακτική πηγή από την οποία μπορεί να παρασκευασθεί το PRP και το PG. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα προέρχεται από ομφάλιο λώρο

και τον πλακούντα από μητέρες που μόλις γεννήσουν δέχονται να το δωρίσουν σε τράπεζες αίματος με σκοπό την επεξεργασία του και την απομόνωση και καλλιέργεια αρχαίγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CD34+) για να χρησιμοποιηθούν ως μόσχευμα σε ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα (λευχαιμίες, λεμφώματα κλπ.) (Mallis, et al. 2019; Rebull, et al. 2016).

Αυτό που κάνει το ομφαλοπλακουντιακό αίμα κατάλληλο και εύκολο για την παραγωγή PRP και PG είναι η μεγάλη του περιεκτικότητα σε αυξητικούς παράγοντες και το γεγονός ότι πάνω από το 80% των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού (Cord Blood Units) αίματος που δωρίζονται δεν συμπληρώνουν τα κριτήρια (επαρκείς όγκος και ολικά εμπύρνηνα κύτταρα πάνω από $1,5 \cdot 10^9$ /CB Unit) για να επεξεργασθούν και να χρησιμοποιηθούν ως πιθανά μοσχεύματα (Mallis, et al. 2019; Rebull, et al. 2016).

Δημόσιες Ιταλικές τράπεζες αίματος σε συνεργασία με το Italian Cord Blood Network (ITCBN) και αργότερα η Ελληνική τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠΑ) πραγματοποίησαν έρευνα κατά την οποία τυποποίησαν την διαδικασία για την παραγωγή PRP και PG από ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν μονάδες αίματος από δωρεά οι οποίες περιείχαν λιγότερα από $1,5 \cdot 10^9$ εμπύρνηνα κύτταρα και είχαν συγκέντρωση αιμοπεταλίων ίση με αυτή που βρίσκεται σε έναν φυσιολογικό ενήλικα άνθρωπο (150000 – 450000 PLTs/μl) (Mallis, et al. 2019; Rebull, et al. 2016).

Οι μονάδες που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μέθοδο είχαν αρχικό όγκο πάνω από 80ml συμπεραλαμβανομένου αντιπηκτικού CPDA 30 ml και ακολούθησαν μία διαδικασία δύο φυγοκεντρήσεων. Πριν την διαδικασία μικρή ποσότητα δείγματος από τους ασκούς χρησιμοποιήθηκε για γενική αίματος για τον προσδιορισμό των κυτταρικών στοιχείων του αίματος πριν την επεξεργασία. Η πρώτη φυγοκέντρωση είχε διάρκεια 15 λεπτά σε 210g σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την φυγοκέντρωση όπου είχαν διαχωριστεί τα συστατικά του αίματος, συλλέχθηκε το πλάσμα από το πάνω μέρος του ασκού και μεταφέρθηκε σε νέο καθαρό ασκό. Μικρή ποσότητα από αυτό το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για γενική αίματος για να προσδιοριστούν τα αιμοπετάλια μετά την πρώτη φυγοκέντρωση και στη συνέχεια ο νέος ασκός με το πλάσμα ετοιμάσθηκε για την δεύτερη φυγοκέντρωση. Η δεύτερη φυγοκέντρωση κράτησε 15 λεπτά σε 2600g σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά και από την δεύτερη φυγοκέντρωση αφαιρέθηκε το PPP από το πάνω μέρος του ασκού ώστε να μείνει πίσω ο επιθυμητός όγκος πλάσματος που θα περιείχε τα αιμοπετάλια και από τελεί το CBPRP. Ο επιθυμητός όγκος για το τελικό PRP που καθόριζε πόση ποσότητα θα αφαιρεθεί κάθε φορά από το PPP προσδιοριζόταν με την βοήθεια εξίσωσης όπου λάμβανε υπ' όψιν τα άνω και κάτω όρια του όγκου του PRP και τα

άνω και κάτω όρια για της συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων του PRP (Mallis, et al. 2019; Rebull, et al. 2016).

Το πλάσμα από το PPP χρησιμοποιήθηκε για μικροβιακό έλεγχο, αν και έχει διαπιστωθεί ότι όταν ο μικροβιακός έλεγχος γίνεται από το πλάσμα του PPP και όχι για από το πλάσμα του PRP υπάρχει κίνδυνος για ψευδός αρνητικά αποτελέσματα (Rebull, και συν. 2016) .

Τα αποδεκτά όρια για την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων για το CBPRP είναι $800 \cdot 10^3$ PLTs/ μ L έως $1400 \cdot 10^3$ PLTs/ μ L. Μετά την Παρασκευή των μονάδων CBPRP, αυτές αποθηκεύονταν στου -40°C όπου παρέμειναν εκεί μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω διαδικασίες (ερευνητικές ή κλινικές) όπου αποψύχονταν σε υδατόλουτρο και ενεργοποιούνται με την προσθήκη 10% γλυκονικού ασβεστίου σε αναλογία 1:3 και σχηματιζόταν η γέλη PG ή CBPG (Mallis, et al. 2019; Rebull, et al. 2016).

Μία τελευταία παρατήρηση ήταν ότι οι μονάδες CBPRP οι οποίες χαρακτηρίζονται ως καλύτερες, δηλαδή μεγαλύτερη ανάκτηση αιμοπεταλίων και υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης και απόλυτου αριθμού αιμοπεταλίων, προέκυψαν από τις μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος όπου ο αρχικός τους όγκος ήταν μεγαλύτερος. Επίσης με η παρασκευή PRP από μονάδες αίματος με μικρό αρχικό όγκο, έδειξαν ότι στο τελικό προϊόν PRP είναι πιθανότερο να βρεθούν ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια (Mallis, et al. 2019).

Κεφάλαιο 2: Αναγεννητική Ιατρική

2.1 Τι είναι η αναγεννητική ιατρική

Η **αναγεννητική ιατρική** επικαλείται την εφαρμογή και η εκμετάλευση βιολογικών αρχών και τεχνικών μέσων με σκοπό την ανάπτυξη βιολογικών υποκατάστατων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων ιστών ή για να αποκαταστήσουν βλαφθέντες ιστούς (Langer και Vacanti 1993). Η αναγεννητική ιατρική είναι ένας τομέας που δίνει την δυνατότητα να θεραπεύσει όργανα και ιστούς που έχουν πάθει κάποια βλάβη είτε λόγο κάποιου τραυματισμού είτε λόγο κάποιας ασθένειας. Πιο συγκεκριμένα, δίνει την δυνατότητα να αποκαταστήσει ή και να αντικαταστήσει τους βλαφθέντες ιστούς και όργανα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά τόσο σε χρόνιες όσο και σε οξείες παθήσεις και νόσους οι οποίες μπορούν να εμφανιστούν σε διάφορα όργανα και ιστούς. Κάποια παραδείγματα όπου μπορεί να βρει εφαρμογή η αναγεννητική ιατρική είναι οι τραυματισμοί, που αναφέρθηκε και νωρίτερα, καρδιακές και αγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος και πολλές ακόμα νόσοι (Mao and Mooney 2015).

Οι μεταμοσχεύσεις οργάνων και ιστών είναι μία θεραπευτική προσέγγιση εναλλακτική της αναγεννητικής ιατρικής, όμως ο μικρός αριθμός από δότες οργάνων και σε συνδυασμό με τον αυξανόμενο μέσο όρο ζωής του ανθρώπου (A. Atala 2012) και το γεγονός ότι η μεταμόσχευση μπορεί να προκαλέσει σοβαρές αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος για τον νέο ιστό, κάνει τον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής τόσο επιθυμητό όσο και αναγκαίο για την αντιμετώπιση των ασθενειών που μπορεί να αντιμετωπίσει (Mao and Mooney 2015).

2.2 Υλικά και μέθοδοι που αξιοποιεί η αναγεννητική ιατρική

2.2.1 Η θεμέλεια ουσία

Η **εξωκυττάρια μήτρα** πρόκειται για ένα σύνολο πρωτεϊνών και μορίων όπου εκκρίνονται από τα κύτταρα τα οποία περιβάλλει και δημιουργούν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη και την σωστή λειτουργία τους (Yi, et al. 2017; Rijal 2017). Κύρια συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλειας ουσίας είναι το κολλαγόνο, η φιμπρονεκτίνη, η λαμίνη, η ελαστίνη και διάφορα σύμπλοκα όπως οι γλυκοζαμίνες (Rijal 2017).

Η χρήση ικριωμάτων εξωκυττάριας θεμέλειας είναι μία αποτελεσματική προσέγγιση όσο αφορά τις παθήσεις που πραγματεύεται η αναγεννητική ιατρική καθώς μπορούν να δημιουργήσουν τις κατάλληλες συνθήκες (δομικά και βιοχημικά) για την αποκατάσταση και την αναδόμηση διαφόρων ιστών και οργάνων (Yi, et al. 2017). Επίσης, η χρήση Βιοϋλικών τα οποία μπορούν να μιμηθούν τις ιδιότητες της εξωκυττάριας μήτρας, δίνει στα κύτταρα την δυνατότητα

να δράσουν με τρόπους που είναι ικανοί να δημιουργήσουν και να επιδιορθώσουν ιστούς με αποτέλεσμα την πλήρη δομική και λειτουργική αποκατάστασή τους (Mao and Mooney 2015).

Αποκυτταροποιημένοι ιστοί είναι μία πηγή από την οποία μπορεί να απομονωθεί και να αξιοποιηθεί η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Mao and Mooney 2015; Rijal 2017). Αποκυτταροποιημένοι ιστοί λέγονται αυτοί οι οποίοι μετά από επεξεργασία με διάφορα διαλύματα (πχ απορρυπαντικά), αφαιρούνται όλα τα κυτταρικά τους στοιχεία και παραμένει μόνο η εξωκυττάρια μήτρα η οποία είναι αδιάλυτη στο νερό (Rijal 2017). Η εξωκυττάρια μήτρα από αποκυτταροποιημένους έχει χρησιμοποιηθεί *in vitro* για την αναγέννηση και αναδόμηση οργάνων αλλά και στην κλινική πράξη σε συγκεκριμένους ιστούς όπως αιμοφόρα αγγεία, καρδιακές βαλβίδες και νεφρικές κύστες (Yu, et al. 2016).

Επίσης, ο τομέας της **ιστομηχανικής**, που κάποιες φορές ό όρος αυτός χρησιμοποιείται συνώνυμα με την αναγεννητική ιατρική (Dzobo, et al. 2018), ασχολείται με την αναδόμηση και την δημιουργία ιστών και οργάνων χρησιμοποιώντας αυξητικούς παράγοντες και ικρίωματα από βιοϋλικά (Mathew, et al. 2016; Dzobo, et al. 2018).

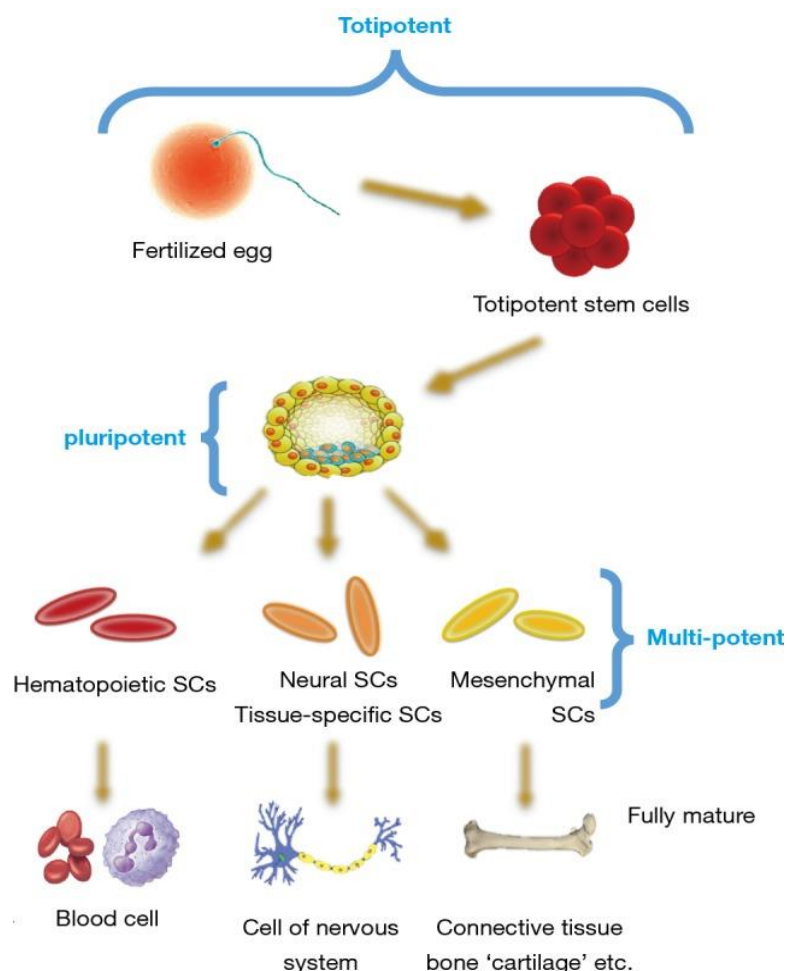
2.2.2 3D Bioprinting

Οι κλασικές τεχνικές της ιστικής μηχανικής δεν είναι αρκετά αξιόπιστες ώστε να δημιουργήσουν και να αντιγράψουν μία περίπλοκη βιολογική δομή (Vijayavenkataraman, et al. 2018), καθώς και η τοποθέτηση κυττάρων μέσα σε ένα ικρίωμα εξωκυττάριας μήτρας είναι δύσκολο να ελεγχθεί (Mao and Mooney 2015). Η χρήση της 3D Printing (εκτύπωση τριών διαστάσεων) τεχνολογίας έχει δημιουργήσει ένα πεδίο όπου αξιοποιείται απόλυτα από την αναγεννητική ιατρική, το πεδίο αυτό είναι το **3D Bioprinting**. Το 3D bioprinting, σε αντίθεση με το κλασικό 3D printing, χρησιμοποιεί βιολογικά υλικά όπως κύτταρα και πρωτεΐνες για την δημιουργία περίπλοκων βιολογικών δομών (ιστοί και όργανα) (Vijayavenkataraman, et al. 2018; Atala and Forgacs 2019). Χρησιμοποιώντας το 3D Bioprinting είναι δυνατή η κατασκευή ιστών με μεγάλη ακρίβεια όσο αφορά την δομή τους, καθώς επιτρέπει έναν ελεγχόμενο τρόπο που δομείται ένας ιστός κατά την διάρκεια τοποθέτησης των κυττάρων και των άλλων βιοϋλικών μέσα σε μία εξωκυττάρια μήτρα (Mao and Mooney 2015).

Η 3D bioprinting τεχνολογία βρίσκει εφαρμογή στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής εφόσον έχει την ικανότητα να δημιουργήσει και να αντικαταστήσει ιστούς. Δηλαδή μπορεί να καλύψει τις ανάγκες που υπάρχουν για την εύρεση περισσότερων δοτών οργάνων για μεταμοσχεύσεις (Murphy and Atala 2014).

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την αναδόμηση των ιστών με την βοήθεια της 3D bioprinting τεχνολογίας μπορεί να είναι είτε πολυμερή και μόρια φυσικής προέλευσης (πχ. Κολλαγόνο) είτε συνθετικά μόρια. Τα πλεονεκτήματα των φυσικών βιοϋλικών είναι ότι μπορούν να μιμηθούν τις ιδιότητες της εξωκυττάριας μήτρας ενώ τα πλεονεκτήματα των συνθετικών υλικών είναι ότι μπορούν να παρασκευασθούν με τις κατάλληλες φυσικές ιδιότητες που επιθυμούμαι (πχ ελαστικότητα). Βασικό ελάττωμα των συνθετικών υλικών είναι η χαμηλή ιστοσυμβατότητα και η τοξικότητα. Τα κύτταρα αποτελούν ένα ακόμα βασικό υλικό για την εφαρμογή της 3D bioprinting τεχνολογίας στην αναγεννητική ιατρική. Οπότε για να δημιουργηθεί ένας ιστός και ένα όργανο είναι απαραίτητη η παρουσία κυττάρων τα οποία δίνουν στον ιστό την λειτουργικότητα και την δομή του (Murphy and Atala 2014).

2.2.3 Στελεχειαία κύτταρα



Εικόνα 5 - Κατηγορίες στελεχειαίων κυττάρων. Πηγή: doi: [10.21037/sci.2019.06.04](https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04)

Τα **στελεχειαία κύτταρα** ή **Stem cells** είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα με ικανότητα αυτοανανέωσης τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν προς διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς (Εικ. 5) και να αντικαταστήσουν κύτταρα και ιστούς που έχουν φθαρεί ή τραυματιστεί (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019). Ακριβώς αυτό το χαρακτηριστικό της

αυτοανανέωσης και της ικανότητας να διαφοροποιηθούν προς κάποιον άλλον κυτταρικό πληθυσμό κάνει τα στελεχιαία κύτταρα ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναγεννητική ιατρική (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019; Mahla 2016). Τα στελεχιαία κύτταρα ανάλογα με την ικανότητα διαφοροποίησης τους μπορούν να χωρισθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

1. **Totipoten stem cells** ή **Ολοδύναμα στελεχιαία κύτταρα**. Το ζυγωτό (γονιμοποιημένο ωάριο) είναι το μόνο ολοδύναμο στελεχιαίο κύτταρο του ανθρώπου και μπορεί να διαφοροποιηθεί προς όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων των έξω-εμβρυικών ιστών (π.χ πλακούντας). Δηλαδή αυτά τα στελεχιαία κύτταρα είναι ικανά να δώσουν έναν ολόκληρο οργανισμό (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019).
2. **Pluripotent stem cells** ή **Πλειοδύναμα στελεχιαία κύτταρα**. Είναι τα κύτταρα τα οποία μπορούν να δώσουν όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς του οργανισμού εκτός από τα κύτταρα των έξω-εμβρυικών ιστών (πλακούντας, χόριο). Τα εμβρυικά στελεχιαία κύτταρα (ESCs) είναι τέτοιου είδους κύτταρα (Mahla 2016; Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019) τα οποία έχουν σχεδόν απεριόριστη ικανότητα αυτοανανέωσης (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019).
3. **Multipotent stem cells** ή **Πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα**. Είναι κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν προς συγκεκριμένες ομάδες κυττάρων. Τέτοιου είδους κύτταρα είναι τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019), όπου απομονώνονται από τον μυελό των οστών και τον ομφάλιο αίμα και έχουν την ικανότητα να δώσουν όλα τα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Mahla 2016), και τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (MSCs) (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019), τα οποία επίσης μπορούν να απομονωθούν από τον ομφάλιο λώρο (Mahla 2016) και τον μυελό των οστών αλλά και από το λίπος και μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα (Sykova and Forostyak 2013).
4. **Unipotent stem cells** ή **Μονοδύναμα στελεχιαία κύτταρα**. Είναι κύτταρα χωρίς ικανότητα αυτοανανέωσης τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν προς έναν συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό. Τέτοιου είδους κύτταρα είναι τα στελεχιαία κύτταρα των μυών (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019).

Η αξιοποίηση των στελεχιαίων κυττάρων από την αναγεννητική ιατρική έχει βρει εφαρμογή σε ασθένειες του δέρματος, της καρδιάς, σε αιματολογικά προβλήματα (Rajabzadeh, Fathi and Farahzadi 2019), καθώς και σε εκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος Alzheimer (Sykova and Forostyak 2013).

Κεφάλαιο 3: Κλινική εφαρμογή του Platelet Rich Plasma

3.1 Μηχανισμός δράσης του Platelet Rich Plasma

3.1.1 Οι αυξητικοί παράγοντες.

Όπως έχουμε μιλήσει και νωρίτερα, οι **αυξητικοί παράγοντες** ή **GFs (Growth Factors)** είναι ο κύριος μηχανισμός δράσης του PRP που συμβάλει στην αναγέννηση των ιστών και στην επούλωση των πληγών (Stone and Varacallo 2020; Wu, Diaz and Borg-Stein 2016; Mei-Dan, et al. 2011).

Πριν αναλυθεί ποιοι είναι οι αυξητικοί παράγοντες που υπάρχουν στο PRP και τι κάνουν, θα εξηγηθεί τι είναι οι αυξητικοί παράγοντες. Οι αυξητικοί παράγοντες πρόκειται για μόρια ενεργά, τα οποία έχουν βασικό ρόλο και στις τρεις φάσεις της επούλωσης των πληγών (την φλεγμονώδη φάση, την φάση του πολλαπλασιασμού και την φάση της αναγέννησης), που εκκρίνονται από κύτταρα (μακροφάγα, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια κα.), και διεγείρουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση με το να επηρεάζουν την κυτταρική διαίρεση (την αναστέλλουν ή την ενεργοποιούν). Ο κύριος τρόπος δράσης αυτών των μορίων είναι να προσδένονται σε ειδικούς **επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς**, οι οποίοι μετά την σύνδεση τους με τους αυξητικούς παράγοντες προκαλούν μια σειρά αντιδράσεων που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την αναστολή έκφρασης γονιδίων που έχουν να κάνουν με την κυτταρική αύξηση. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες έχουν την ιδιότητα να εισέρχονται οι ίδιοι μέσα στο κύτταρο και να δρουν κατευθείαν στον στόχο τους. Οι λιποειδείς διαλυτές στεροειδείς ορμόνες είναι τέτοιου είδους αυξητικοί παράγοντες. (Stone and Varacallo 2020).

3.1.2 Αυξητικοί παράγοντες και τα αιμοπετάλια

Όταν ένα αγγείο τραυματίζεται, τα αιμοπετάλια είναι τα πρώτα κύτταρα που σπεύδουν στην περιοχή του τραυματισμού και είναι υπεύθυνα να σταματήσουν την αιμορραγία και να συμβάλουν στην επούλωση της πληγής. Οι τρεις κύριες λειτουργίες τους κατά την πρώτη φάση της αιμόστασης είναι: η προσκόλληση, η ενεργοποίηση και η συσσωμάτωση (Alves and Grimalt 2018). Κατά την φάση της ενεργοποίησης, τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν από τα **α-κοκκία** τους αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την φλεγμονώδη αντίδραση, την αγγειογένεση, την μετανάστευση στελεχιαίων κυττάρων και τον φαινότυπο των κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την αποκατάσταση και την πλήρη επούλωση της πληγής (Pochini, et al. 2016; Alves and Grimalt 2018). Επίσης τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσελκύουν λευκοκύτταρα και μακροφάγα στο σημείο της φλεγμονής για την φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών τα οποία με την σειρά τους εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι

συμβάλουν στην φλεγμονή και στην επούλωση της πληγής (Alves and Grimalt 2018; Stone and Varacallo 2020). Τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα λευκοκύτταρα που φτάνουν στο σημείο της φλεγμονής (Stone and Varacallo 2020).

Αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων:

- **PDGF:** Platelet derived growth factor
- **VEGF:** Vascular endothelial growth factor
- **FGF:** Fibroblast growth factor
- **EGF:** Epidermal growth factor
- **IGF:** Insulin like growth factor
- **TGF-β1:** Transforming growth factor β1
- **MMPs:** Matrix metalloproteins
- **HGF:** Hepatocyte growth factor
- **IL-8:** ιντερλευκίνη 8
- **MMPs:** Matrix metalloproteinases
- **TIMPs:** tissue inhibitors of metalloproteinases

(Stone and Varacallo 2020; Alves and Grimalt 2018; Pavlovic, et al. 2016; Lubkowska, Dolegowska and Banfi 2012; Sternlicht and Werb 2001; Leco, et al. 2006)

3.1.3 Αυξητικοί παράγοντες στο Platelet Rich Plasma

Οι αυξητικοί παράγοντες στο PRP, προέρχονται κυρίως από τα αιμοπετάλια και είναι το κύριο στοιχείο που δίνει στο PRP στο αναγεννητικό του δυναμικό όσο αφορά την αναγέννηση ιστών και κυττάρων. Όπως αναφέραμε και προηγουμένως κάποιοι από αυτούς τους αυξητικούς παράγοντες είναι οι: PDGF, VEGF, FGF, IGF, TGF, EGF και (Lubkowska, Dolegowska and Banfi 2012). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι αυξητικοί παράγοντες στο PRP και η κύρια λειτουργία τους.

Όλοι αυξητικοί παράγοντες στο PRP απελευθερώνονται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων μετά την ενεργοποίησή τους. Η ενεργοποίηση μπορεί να γίνει με την προσθήκη θρομβίνης στο PRP (Pochini, et al. 2016) ή μετά την προσθήκη γλυκονικού ασβεστίου (Mallis, et al. 2019; Rebull, et al. 2016).

Πίνακας 1 - Αυξητικοί παράγοντες στο PRP και η κύρια λειτουργία τους

Αυξητικός Παράγοντας	Κύρια λειτουργία
PDGF	Ενισχύει τη σύνθεση κολλαγόνου, τον πολλαπλασιασμό των οστικών κυττάρων, τη χημειοταξία των ινοβλαστών, την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα, ενεργοποίηση μακροφάγων (Pavlovic, et al. 2016) και συμβάλει και στην αγγειογένεση (Alves and Grimalt 2018).
TGF-β	Ενισχύει τη σύνθεση κολλαγόνου τύπου 1, προάγει την αγγειογένεση, διεγείρει τη χημειοταξία των ανοσοκυττάρων, αναστέλλει το σχηματισμό οστεοκλαστών και την απορρόφηση των οστών (Pavlovic, et al. 2016).
VEGF	Διεγείρει την αγγειογένεση (και ειδικά την περιφερική αγγειογένεση και είναι υπεύθυνος για την αύξηση του μεγέθους των αγγείων κατά την ανάπτυξη του οργανισμού (Alves and Grimalt 2018)), τη μετανάστευση και τη μίτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων, διεγείρει τη χημειοταξία των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων (Pavlovic, et al. 2016).
EGF	Διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση επιθηλιακών κυττάρων, προάγει την έκκριση κυτοκίνης από μεσεγχυματικά και επιθηλιακά κύτταρα (Pavlovic, et al. 2016) και διεγείρει την αγγειογένεση (Alves and Grimalt 2018).
FGF	Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, των χονδροκυττάρων και των οστεοβλαστών (Pavlovic, et al. 2016) και την αγγειογένεση (Alves and Grimalt 2018).
IGF	Διεγείρει την ανάπτυξη κυττάρων, τη διαφοροποίηση και την σύνθεση του κολλαγόνου (Pavlovic, et al. 2016) και την αγγειογένεση (Alves and Grimalt 2018).
IL-8	Διεγείρει την μίτωση των επιθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση (Unal 2017).
MMPs	Ρυθμίζει την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και ελκύει άλλους αυξητικούς παράγοντες, αγγειογενετικούς παράγοντες και ανασταλείς (Sternlicht and Werb 2001).
TIMPs	Ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ιστών στους πνεύμονες κατά την ανάπτυξη τους. Τα TIMPs πρέπει να παράγονται σε ισορροπία με τα MMPs ώστε να ρυθμίζεται σωστά η έκκριση αυξητικών παραγόντων (Leco, και συν. 2006).

3.1.4 Λευκοκύτταρα και Platelet Rich Plasma (Leukocyte Platelet Rich Plasma – L-PRP)

Το PRP μπορεί να έχει λευκά αιμοσφαίρια σε διάφορες συγκεντρώσεις ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την Παρασκευή του (Pavlovic, et al. 2016). Τα λευκά αιμοσφαίρια του PRP συνήθως δεν περιλαμβάνουν τα βασεόφιλα και τα εωσινόφιλα καθώς είναι ευαίσθητα στην φυγοκέντρηση και δεν επιβιώνουν μέχρι το τέλος της διαδικασίας (Everts 2017). Τα λευκοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν πολλές πρωτεΐνες που συμβάλουν στην επούλωση των πληγών καθώς, επίσης, μπορούν να ελέγξουν την ένταση της φλεγμονώδους αντίδρασης μέσω μορίων που την αναστέλλουν ή την διεγείρουν (Pavlovic, et al. 2016; Lana, et al. 2019). Πιο συγκεκριμένα, τα λευκά αιμοσφαίρια μπορούν να αποικοδομήσουν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ώστε να ελευθερωθούν πιο εύκολα οι αυξητικοί παράγοντες στο

σημείο του τραυματισμού και να επουλωθεί η πληγή (Pavlovic, et al. 2016). Έχει ήδη αναφερθεί ότι τα λευκοκύτταρα είναι επίσης μια από τις πηγές αυξητικών παραγόντων οι οποίοι επίσης μπορούν να συμβάλλουν στην άμεση επούλωση της πληγής (Pavlovic, et al. 2016; Stone and Varacallo 2020).

Είναι πολύ πιθανό όμως τα λευκοκύτταρα στο PRP να επιδρούν αρνητικά στην αναγέννηση των ιστών. Για παράδειγμα, τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) με σκοπό την εξάλειψη πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν μολύνει το σημείο του τραυματισμού. Όμως αυτές οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου έχουν ανασταλτική επίδραση στην διαδικασία της ανάπλασης του ιστού, επομένως, καθυστερεί και η επούλωση της. Συμπεραίνουμε ότι τα λευκά αιμοσφαίρια στο PRP μπορούν να έχουν τόσο αρνητικές όσο και θετικές επιδράσεις στο σημείο που εφαρμόζεται, ενώ, σε κάποιες περιπτώσεις είναι γνωστό εάν το PRP που θα εφαρμοστεί θα πρέπει να περιέχει λευκοκύτταρα ή όχι πληγής (Pavlovic, et al. 2016).

Τέλος, εκτός από τα λευκά αιμοσφαίρια και τα ερυθρά όταν δεν έχουν διαχωριστεί και είναι παρόν στο τελικό προϊόν PRP, μπορούν να προκαλέσουν επιπλοκές όσο αφορά την δράση του PRP. Για παράδειγμα, σε περίπτωση εφαρμογής PRP σε σκελετικούς μύες επιμολυσμένο με ερυθροκύτταρα, εξαιτίας του σιδήρου της αίμης όπου προκαλεί τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητη απόπτωση των κυττάρων (Rochini, et al. 2016).

3.2 Διαφορές στη γέλη αιμοπεταλίων προερχόμενη από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα

Το περιφερικό αίμα αποτελεί την πιο κοινή πηγή για την παρασκευή του PRP και του PG. Όμως, εκτός από το περιφερικό αίμα, το ομφαλοπλακουντιακό αίμα αποτελεί επίσης μια πηγή για την παρασκευή των προϊόντων του PRP τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν κατά τον ίδιο τρόπο τόσο σε κλινικές (Volpe, et al. 2017; Rosso, et al. 2014) όσο και σε ερευνητικές εφαρμογές (Shirzad, et al. 2017). Όσο αφορά την περιεκτικότητα του PRP και του PG σε αυξητικούς παράγοντες, είτε αυτά είναι προερχόμενα από το περιφερικό αίμα είτε από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, σε κάθε περίπτωση αυτά τα προϊόντα του αίματος περιέχουν τους ίδιους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι έχουν αναφερθεί νωρίτερα (PDGF, VEGF, FGF, HGF κλπ.).

Πέρα από τα υποσχόμενα αποτελέσματα που δείχνει η χρήση του PRP από ομφαλοπλακουντιακό σε σχέση με αυτά του PRP από περιφερικό αίμα, μετά από μελέτες, έχει διαπιστωθεί ότι και σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων (MSCs) που αναπτύσσονται παρουσία **Platelet Lysate (PL)**, ότι το PL που προέρχεται από ομφαλοπλακουντιακό αίμα, προκαλεί στα κύτταρα αυτά ισχυρότερη πολλαπλασιαστική

ικανότητα σε σχέση με το PL από περιφερικό αίμα ή **PBPL** (το PL προκύπτει μετά την ψύξη του PRP στους -80°C, το οποίο μόλις αποψυχθεί θα έχουν λυθεί οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων ελευθερώνοντας το περιεχόμενο τους μαζί με όλα τα μόρια και τους αυξητικούς παράγοντες στο πλάσμα (Ludicone, et al. 2014)). Όσο αφορά το είδος της διαφοροποίησης που υπέστηκαν τα MSC παρουσία UCBPL και PBPL, παρατηρήθηκε ότι το UCBPL προήγαγε την χονδροκυτταρική διαφοροποίηση ενώ το PBPL την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Shirzad, et al. 2017).

Για ποιόν λόγο παρατηρούνται αυτές τις διαφορές στην αναγεννητική ικανότητα του PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα και από περιφερικό αίμα δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο. Όμως, είναι κατανοητό ότι αυτές οι διαφορές είναι λογικές εφόσον εάν εξετασθούν τα περιεχόμενα του πλάσματος ενός νεογέννητου και ενός ενήλικα θα βρεθούν σημαντικές διαφορές (Toulon, et al. 2016; Monagle, et al. 2006). Καταρχήν, η δυνατότητα του ανθρώπινου οργανισμού να επιτελεί την διαδικασία της αιμόστασης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου της εγκυμοσύνης. Τα αιμοπετάλια των νεογνών παρουσιάζουν υπερευαισθησία με χαμηλότερη ικανότητα ενεργοποίησης μετά την διέγερση με την θρομβίνη (Strauss, Sidlik-Muskatel and Kenet 2011). Όσο αφορά τα επίπεδα της θρομβίνης στο αίμα των νεογνών, είναι γνωστό ότι μόνο μέχρι το 50% των επιπέδων θρομβίνης που παρατηρείται στους ενήλικες μπορεί να βρεθεί στο πλάσμα των νεογνών (Andrew, et al. 1990). Τέλος, άλλες διαφορές στα συστατικά του πλάσματος του νεογνού (κατά συνέπεια και του ομφαλοπλακουντιακού αίματος) και του ενήλικα ανθρώπου είναι τα επίπεδα των βιταμίνω-Κ εξαρτώμενων παραγόντων της πήξης οι οποίοι είναι χαμηλότεροι στα νεογνά (εκτός από τον FV) (Toulon, et al. 2016; Monagle, et al. 2006; Strauss, Sidlik-Muskatel and Kenet 2011) όπως και οι πρωτεΐνες C και S (Toulon, et al. 2016) (Monagle, et al. 2006), η αντιθρομβίνη και το ινοδωγόνο (Toulon, et al. 2016). Από την άλλη μεριά, ο παράγοντας VWF είναι σημαντικά αυξημένος στα νεογνά και στα μικρά παιδιά (Toulon, et al. 2016; Monagle, et al. 2006).

3.3 PRP και Εφαρμογές

3.3.1 Πομφολυγώδης επιδερμόλυσης (EB)

Η **πομφολυγώδης επιδερμόλυση** ή **EB (Epidermolysis bullosa)** πρόκειται για έναν αριθμό γενετικά ετερογενών δερματικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από ελαττώματα στη σύνθεση πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στην προσκόλληση της επιδερμίδας στον συνδετικό ιστό (Sindicic, et al. 2018; Tadini, Guez, et al. 2015). Τα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αυτής της νόσου είναι τα ίδια που είναι υπεύθυνα για πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο τύπου VII (Gelmetti, et al. 2018).

Η EB ταξινομείται σε τέσσερις τύπους οι οποίοι είναι: η επιδερμολυτική ή epidermolytic EB (EEB), η τμηματική ή junctional EB (JEB), η δυστροφική ή dystrophic EB (DEB) και το σύνδρομο Kindler. Από τις παραπάνω κατηγορίες η DEB είναι η πιο συχνή και μπορεί να έχει επικρατή ή υπολειπόμενο γονότυπο (Gelmetti, et al. 2018). Η κλινική εικόνα ενός ασθενή που πάσχει από EB είναι η ευαισθησία και η εύκολη ευθραυστότητα του δέρματος, ο σχηματισμός φυσαλίδων και η ανώμαλη επούλωση των πληγών ή ακόμα και η μη επούλωση της πληγής (Tadini, Pezzani, et al. 2015; Tadini, Guez, et al. 2015). Επίσης, ασθενείς που πάσχουν από αυτή την νόσο, έχουν μεγάλη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του δέρματος κατά την διάρκεια της ζωής τους (Tadini, Guez, et al. 2015).

Αν και οι εφαρμογές του PRP για την θεραπεία των δερματικών εξελκώσεων που πάσχουν από EB έχουν πραγματοποιηθεί σε μικρό αριθμό ατόμων, οι έρευνες οι οποίες ασχολήθηκαν με αυτό παρουσιάζουν αισιόδοξα αποτελέσματα. Για παράδειγμα σε ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από EB με πρόσφατες εξελκώσεις του δέρματος, έγινε χρήση CBPG για την περίθαλψη των δερματικών εξελκώσεων τους (Gelmetti, et al. 2018; Tadini, Guez, et al. 2015). Σε μία από αυτές τις έρευνες το PL, που δημιουργήθηκε μετά την ψύξη του PRP στους -80°C και την απόψυξη του στους 37°C, ενεργοποιήθηκε με την προσθήκη batroxobin και μετά από 20 με 30 λεπτά σχηματίστηκε η γέλη αιμοπεταλίων (PG) (Tadini, Guez, et al. 2015).

Η εφαρμογή του CBPG στις πληγές των ασθενών πραγματοποιήθηκε από εξειδικευμένο προσωπικό οι οποίοι τοποθέτησαν το CBPG πάνω στις πληγές με την βοήθεια γάζας και επιδέσμων (Gelmetti, et al. 2018). Έχουν αναφερθεί ότι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με CBPG για τις δερματικές εξελκώσεις που προκαλεί η EB, ταυτόχρονα τους χορηγούσανε συμβατική θεραπεία για να συγκρίνουν τα αποτελέσματα (Tadini, Guez, et al. 2015). Οι ασθενείς αυτοί ήταν υπό παρακολούθηση καθ' όλη την διάρκεια της θεραπείας τους. Η πλειοψηφία των ασθενών σε αυτές τις έρευνες ανέφεραν σαφή βελτίωση όσο αφορά την δυσφορία και τον πόνο από το σημείο της πληγής καθώς και οι εξελκώσεις μειώθηκαν σε μέγεθος και ακόμα παρατηρήθηκε και επανεπιθηλίωση του δέρματος (Gelmetti, et al. 2018; Tadini, Guez, et al. 2015). Όσο αφορά τις εκβάσεις των δερματικών εξελκώσεων στους ασθενείς που τους χορηγούσαν συμβατικά φάρμακα (ομάδα ελέγχου), δεν παρατηρήθηκε η ίδια βελτίωση και σε πολλές περιπτώσεις η πληγή ξανά άνοιγε μετά το τέλος της θεραπείας (Tadini, Guez, et al. 2015).

Τα νεογέννητα είναι μία ευαίσθητη κατηγορία ασθενών όσο αφορά την EB. Σε αυτούς τους ασθενείς πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στην φροντίδα και στην πρόληψη των φυσαλίδων από τα δερματικά έλκη, καθώς υπάρχει κίνδυνος για την απώλεια ηλεκτρολυτών με

συνέπεια την αφυδάτωση καθώς και ο κίνδυνος για αναιμία από αιμορραγία (Tadini, Pezzani, et al. 2015).

Για την θεραπεία των εξελκώσεων των κάτω άκρων σε βρέφος έγινε χρήση CBPG, το οποίο προετοιμάστηκε και εφαρμόστηκε στις πληγές με γάζα και επιδέσμους (Εικ. 6). Και οι δύο μεγάλες εστίες εξέλκωσης του επιθηλίου βελτιώθηκαν μετά από μία ή δύο εβδομάδες της εφαρμογής της γέλης και ακόμα παρατηρήθηκε επανεπιθηλίωση του δέρματος χωρίς παρενέργειες. (Εικ. 10) (Tadini, Pezzani, et al. 2015).

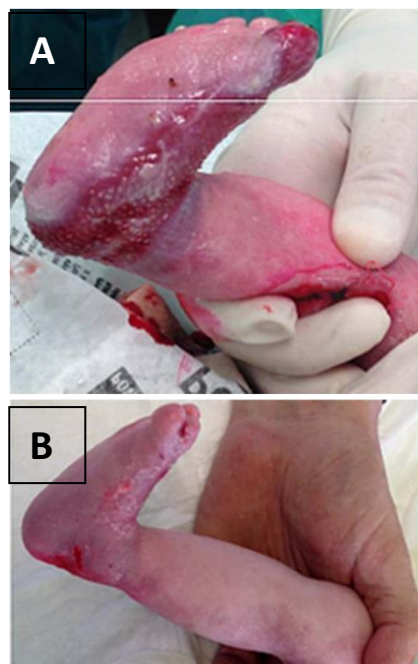
Όταν πρόκειται για τις διαβρώσεις και τις εξελκώσεις που προκαλούνται στην στοματική κοιλότητα, η εφαρμογή του CBPG δεν έχει αξιολογήσει αποτελέσματα όσο αφορά την βελτίωση των συμπτωμάτων (Sindici, et al. 2018).

Τέλος, για τις περιπτώσεις που απαιτείται η θεραπεία στοματικών ελκών από την EB, το CBPG μπορεί να χρησιμοποιηθεί με συνδυασμό με **φωτοδιαμορφωτική**

θεραπεία ή **PBMT (Photobiomodulation Therapy)** και με **θεραπεία λέιζερ χαμηλού επιπέδου** ή **LLLT (Low Level Laser Therapy)** με αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα (Sindici, et al. 2018; Sindici, et al. 2017).

3.3.2 Η εφαρμογή του PRP για την θεραπεία των εγκαυμάτων.

Το έγκαυμα μπορεί να αποτελεί έναν μικρό ασήμαντο τραυματισμό ή μπορεί να αποτελεί έναν τραυματισμό ο οποίος να βάζει σε μεγάλο κίνδυνο την ζωή του ασθενούς. Ένα χαρακτηριστικό των ασθενών που νοσηλεύονται με εγκαύματα είναι η μεγάλη περίοδος ανάρρωσης. Οι παράμετροι που παίζουν ρόλο όσο αφορά την περίοδο ανάρρωσης και την νοσηρότητα ενός ασθενούς με έγκαυμα είναι: το μέγεθος του εγκαύματος στην επιφάνεια του δέρματος, το βάθος του εγκαύματος στους, το σημείο του εγκαύματος και η ηλικία του ασθενούς. Οι δευτερογενείς λοιμώξεις είναι μεγάλος κίνδυνος για αυτούς τους ασθενείς και συνήθως μπορεί να παρατείνει την περίοδο νοσηλείας τους για αρκετό ακόμα διάστημα (Unal 2017). Επίσης, ανάλογα με την θέση και το βάθος του εγκαύματος μπορεί να προκληθεί μόνιμη αναπηρία η οποία μπορεί να ακολουθεί τον ασθενή για το υπόλοιπο της ζωής του. Σήμερα, για την φροντίδα και την θεραπεία των εγκαυμάτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόσχευμα δέρματος από δότη για την



Εικόνα 6 - Α) εξέλκωση του δέρματος αμέσως μετά την γένα που οφείλεται στην EB. Β) το ίδιο πόδι μετά από 4 εβδομάδες της τελευταίας χορήγησης του CBPG. Πηγή: DOI: [10.1136/bcr-2014-207364](https://doi.org/10.1136/bcr-2014-207364)

αποκατάσταση του τραύματος. Όμως, ο ελάχιστος αριθμός από δότες και η ευαισθησία ενός ασθενή με εγκαύματα να υποβληθεί σε χειρουργείο για την μεταμόσχευση έχει δημιουργήσει την ανάγκη για την εύρεση και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων (Unal 2017; Marck, et al. 2016).

Τα δεδομένα από την επιτυχή εφαρμογή του PRP σε άλλους τύπους τραυμάτων κάνουν το PRP ένα αξιόλογο υποψήφιο για την εφαρμογή του στην θεραπεία των εγκαυμάτων. Το PRP όταν εφαρμόζεται σε πληγές από τραύματα μπορεί να μειώσει την αιμορραγία και να διεγείρει την αγγιογένεση με αποτέλεσμα τα μοσχεύματα του δέρματος να προσκολλούνται ευκολότερα στον ιστό του ασθενή (Unal 2017).

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες έρευνες όσο αφορά την εφαρμογή του PRP σε ασθενείς με εγκαύματα και αυτές συνήθως είναι σε συνδυασμό με κάποια συμβατική θεραπεία. Τα αποτελέσματα όμως ποικίλουν όσο αφορά την απόδοση του PRP σε αυτές τις περιπτώσεις (Hao, et al. 2010; Marck, et al. 2016).

Σε ασθενείς με βαθιά εγκαύματα δευτέρου βαθμού, που είχαν καλύψει από 10% ως το 48% της επιφάνειας του σώματος τους, πραγματοποιήθηκε χειρουργείο και τα τραύματα καλύφθηκαν με αυτόλογο PG και ακκυταρική αλλογενή δερματική μήτρα. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν σαφής βελτίωση της περιοχής του εγκαύματος όπου έχει χρησιμοποιηθεί το PG μαζί με την ακυταρική δερματική μήτρα και το δέρμα είχε αρχίσει να αναπλάθεται. Από την άλλη μεριά, τα σημεία με τα εγκαύματα που είχαν περιθαλφθεί μόνο με την δερματική μήτρα είχαν χαμηλότερα ποσοστά επούλωσης και ήταν ευάλωτα σε μολύνσεις (Hao, et al. 2010).

Σε ασθενείς με βαθιά εγκαύματα που κάλυπταν τουλάχιστον το 2% της επιφάνειας του σώματος τους, πραγματοποιήθηκε θεραπεία με εφαρμογή **διαχωρισμένου μοσχεύματος δέρματος (Split Skin Graft) ή SSG** σε συνδυασμό με αυτόλογο PRP. Η παρασκευή του PRP πραγματοποιήθηκε με την χρήση εμπορικού kit. Στο τελικό προϊόν PRP συμπεριλήφθηκαν λευκά αιμοσφαίρια. Επίσης παρασκευάσθηκε αυτόλογο διάλυμα θρομβίνης από το πλάσμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε αργότερα για την ενεργοποίηση του PRP και σχηματίστηκε το PG (Marck, et al. 2016).

Το PG εφαρμόστηκε πάνω στις πληγές, με ένα σύστημα διπλής σύριγγας πριν την εφαρμογή του SSG (Εικ. 7) και όλα τα τραύματα καλύφθηκαν με μη κολλητικό επίδεσμο. Σε αυτή την περίπτωση, μέχρι το τέλος της θεραπείας δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα επανεπιθυλίωσης μεταξύ των εγκαυμάτων που περιθάλφθηκαν με SSG/PG και των εγκαυμάτων που περιθάλφθηκαν μόνο με SSG. Επίσης, καμία σοβαρή επιπλοκή δεν παρατηρήθηκε μετά το τέλος της θεραπείας και ούτε η ένταση των συμπτωμάτων από τις πληγές (κνησμός και πόνος) είχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο μεθόδους θεραπείας. Το συμπέρασμα αυτής της τελευταίας έρευνας είναι ότι το PRP δεν επηρέασε τον ρυθμό επούλωσης των πληγών από τα εγκαύματα όταν χορηγήθηκε σε συνδυασμό SSG (Marck, et al. 2016).



Εικόνα 7 - Εφαρμογή το PG και της θρομβίνης πάνω στην πληγή με το σύστημα της διπλής σύριγγας πριν την εφαρμογή του SSG. Πηγή: DOI: [10.1111/wrr.12443](https://doi.org/10.1111/wrr.12443)

3.3.3 Η εφαρμογή του PRP για την θεραπεία των δερματικών ελκών των κάτω άκρων σε διαβητικούς ασθενείς.

Η κρίσιμη ισχαιμία των κάτω άκρων (Critical Lower Limb Ischemia) ή CLI σταδίου 5 κατά Rutherford σχετίζεται με την απώλεια ιστού και αποτελεί μία σοβαρή αγγειακή κατάσταση που μπορεί να προκαλέσει την απώλεια άκρων σε ασθενείς με ή χωρίς διαβήτη (Volpe, et al. 2017).

Μετά από αγγειογραφική και κλινική αξιολόγηση αυτοί οι ασθενείς πρέπει να υποβληθούν σε χειρουργείο για να αποκατασταθεί η αιμάτωση των κάτω άκρων. Σε διαβητικούς ασθενείς η επούλωση αυτών των πληγών μπορεί να είναι αργή και δύσκολη. Για να επιταχυνθεί η επούλωση των τραυμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθούν όπως η διέγερση του νωτιαίου μυελού και η θεραπεία vacuum-assisted closure (VAC) (Volpe, et al. 2017).

Έχει πραγματοποιηθεί η εφαρμογή αλλογενούς CBPG σε διαβητικούς ασθενείς με CLI για την ταχύτερη θεραπεία τους και την βελτίωση της ποιότητας των κάτω άκρων. Πριν την εφαρμογή του PG σε όλους του ασθενείς έχει πραγματοποιηθεί ενδοαγγειακή επανεγγείωση των κάτω άκρων (Volpe, et al. 2017).



Εικόνα 8 - Α) Το πόδι του ασθενούς μετά το χειρουργείο και πριν την εφαρμογή του PG. Β) Το πόδι του ασθενούς κατά την διάρκεια της εφαρμογής του PG. Γ) Το πόδι του ασθενούς μετά από 30 ημέρες θεραπείας. Πηγή: <https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2017.12>

Όταν το PRP ετοιμάσθηκε, ενεργοποιήθηκε μετά την προσθήκη γλυκονικού ασβεστίου 20% με αποτέλεσμα να σχηματισθεί το PG. Εφόσον οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε αγγειοποίηση των κάτω άκρων και μετά την κατάλληλη αφαίρεση των ελκών τοποθετήθηκε το CBPG με γάζα στο σημείο της πληγής. Συνολικά έγιναν 12 εφαρμογές CBPG για δύο μήνες και αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα (Εικ. 8) (Volpe, et al. 2017).

Στο τέλος της θεραπείας παρατηρήθηκε πολύ καλύτερη επούλωση των πληγών στους ασθενείς που εφαρμόστηκε το CBPG από εκείνους που έπαιρναν συμβατική θεραπεία. Οπότε

προκύπτει το συμπέρασμα ότι το CBPG μπορεί να προωθήσει την ταχύτερη επούλωση των πληγών σε διαβητικούς ασθενείς με CLI σταδίου 5 κατά Rutherford (Volpe, et al. 2017).

3.3.4 Εφαρμογή του PRP στον τομέα της ορθοπεδικής.

Το PRP έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς της ορθοπεδικής και κυρίως στο κομμάτι της αθλητικής ιατρικής καθώς η εφαρμογή του PRP σε ένα τραύμα τένοντα ή μυός μπορεί να δημιουργήσει το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπλαση αυτών των ιστών (Kossev and Sokolov 2015).

Κάποιες παθήσεις που εφαρμόζεται το PRP στην ορθοπεδική είναι η οστεοαρθρίτιδα και η τεντονοπάθεια. Η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από καταστροφή του χόνδρου της άρθρωσης με αποτέλεσμα την καταστροφή της ίδιας της άρθρωσης. Συμβατικές θεραπείες για την καταπολέμηση της οστεοαρθρίτιδας περιλαμβάνουν ειδικές φυσικές ασκήσεις, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη κ.α. Έχει παρατηρηθεί ότι η υψηλή συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων που υπάρχουν στο PRP προκαλεί την επιτάχυνση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του χόνδρου των αρθρώσεων. Σε οστεοαρθρίτιδες, εάν χρησιμοποιηθεί PRP και δεδομένου της κατάστασης του κάθε ασθενούς, πρέπει να χρησιμοποιούνται περισσότερες αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες παρά προφλεγμονώδεις. Επίσης, οι αυξητικοί παράγοντες που έχουν αρνητική δράση στην θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας θα πρέπει να απομονώνονται και να απομακρύνονται. Όσο αφορά την χρήση του PRP σε τεντονοπάθειες, έχει παρατηρηθεί ότι η θεραπεία επικονδυλίτιδας και τραυμάτων του αχίλλειου τένοντα που χρησιμοποιήθηκε PRP ήταν πολύ πιο επιτυχημένες σε σχέση με συμβατικές θεραπείες (Kossev and Sokolov 2015).

3.3.4.1 PRP και μόσχευμα οστών-επιγονατιδικού τένοντα.

Ένας κοινός τραυματισμός των αθλητών που συμμετέχουν σε αθλήματα με έντονη άσκηση και κίνηση είναι ο τραυματισμός στον **πρόσθιο σταυροειδή σύνδεσμος** ή **ACL (Anterior Cruciate Ligament)** ο οποίος παρέχει σταθερότητα στην άρθρωση του γόνατος και εξασφαλίζει την σωστή λειτουργία της. Τα χειρουργεία που πραγματοποιούνται για την ανακατασκευή και την αποκατάσταση αυτού του συνδέσμου χρησιμοποιούν ως μόσχευμα που λαμβάνεται από την επιγονατίδα του ίδιου ή από δότη. Αυτό το μόσχευμα λέγεται μόσχευμα **οστών-επιγονατιδικού τένοντα** ή **BPTB (Bone-Patellar Tendon-Bone)** και αποτελεί gold standard μέθοδο για την θεραπεία σε τραύματα του ACL (Cervellin, et al. 2012).

Ένα ποσοστό ασθενών που υποβάλλονται σε τέτοιο χειρουργείο έχουν αναφέρει πόνο στο σημείο που λήφθηκε το μόσχευμα καθώς και δυσκολία στην κάμψη του γόνατου. Με αφορμή αυτά τα αρνητικά συμπτώματα μετά από το χειρουργείο αποκατάστασης που περιγράφηκε παραπάνω, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες οι οποίες αξιολογούν την μείωση

αυτών των συμπτωμάτων όταν χρησιμοποιείται PG στο σημείο της λήψης του BPTB μοσχεύματος (Cervellin, et al. 2012).



Εικόνα 9 - Τοποθέτηση του PG την ώρα του χειρουργείου. Πηγή: doi: [10.1007/s00167-011-1570-5](https://doi.org/10.1007/s00167-011-1570-5)

Το PRP ετοιμάσθηκε από αυτόλογο αίμα κάθε ασθενούς την ώρα του χειρουργείου. Για την ενεργοποίηση του PRP χρησιμοποιήθηκε θρομβίνη η οποία με το PRP σε αναλογία 10:1 (PRP/Θρομβίνη) για την ενεργοποίηση του και τον σχηματισμό της γέλης. Το PG εφαρμόστηκε πριν ολοκληρωθεί το χειρουργείο στο σημείο που λήφθηκε το μόσχευμα μέσα από το σημείο της τομής της επιφάνειας του δέρματος (Εικ. 9) (Cervellin, et al. 2012).

Μετά το χειρουργείο οι ασθενείς μπορούσαν να κυκλοφορούν με πατερίτσες και σταδιακά όταν δεν τις χρειαζόντουσαν τους επιτράπηκε να σηκώνουν βάρη και μετά από μερικούς μήνες μπορούσαν να επιστρέψουν στα αθλήματα τους (Cervellin, et al. 2012).

Όσο αφορά τα πλεονεκτήματα, όταν καταγράφηκαν τα επίπεδα πόνου και γενικά όλα τα συμπτώματα που παρουσιάζονται σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε χειρουργείο για την

λήψη BPTB μοσχεύματος αποδείχθηκε ότι το PG ήταν σε θέση να βελτιώσει πολύ όλα αυτά τα μετεγχειρητικά συμπτώματα δίνοντας στους αθλητές την δυνατότητα να αναρρώσουν πλήρως χωρίς καμία επιπλοκή (Cervellin, et al. 2012).

3.3.4.2 PRP και πελματιαία περιτονίτιδα

Η πελματιαία περιτονίτιδα (plantar fasciitis) αποτελεί τον πιο συχνό λόγο για τον πόνο στο πέλμα. Οι συμβατικές θεραπείες συνήθως περιλαμβάνουν ειδικές καθημερινές ασκήσεις ή διάφορα φάρμακα (τοπικές ενέσεις με κορτικοστεροειδή με ή χωρίς αναισθητικά) (Akşahin , et al. 2012).

Αν και τα κορτικοστεροειδή αποτελούν τον πιο κοινό τύπου φαρμάκου για την απαλλαγή τέτοιου είδους πόνου, δεν είναι ξεκάθαρο αν η δράση του είναι προσωρινή ή αν έχει μακροπρόθεσμα αποτελέσματα (Akşahin , et al. 2012).

Σε ασθενείς που υπέφεραν από πελματικό πόνο οι οποίοι έπαιρναν ήδη συμβατική θεραπεία τους χορηγήθηκε PRP τοπικά μαζί με αναισθητικό και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα για την βελτίωση του πόνου σε σχέση με ασθενείς οι οποίοι έπαιρναν κορτικοστεροειδή μαζί με αναισθητικό (Akşahin , et al. 2012).

Το PRP προετοιμάστηκε με μέθοδο δύο φυγοκεντρήσεων και χορηγήθηκε τοπικά με ένεση μετά την χορήγηση του αναισθητικού. Όσο αφορά τα αποτελέσματα, δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ της βελτίωσης του πόνου που είχαν οι ασθενείς που τους χορηγήθηκε το PRP σε σχέση με αυτούς που τους χορηγήθηκαν κορτικοστεροειδή (Akşahin , et al. 2012).

3.3.5 PRP και στοματική βλεννογονίτιδα

Η **στοματική βλεννογονίτιδα (oral mucositis)** αποτελεί μία επιπλοκή σε ασθενείς μετά από χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση αρχαίγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Είναι μια σοβαρή ασθένεια που βάζει σε κίνδυνο την ζωή του ασθενούς και υποβιβάζει πολύ την ποιότητα ζωής. Ο νούμερο ένα παράγοντας κινδύνου σε περιβάλλον στοματικής βλεννογονίτιδας είναι η ανάπτυξη λοιμώξεων (Piccin, et al. 2017).

Έχει αναφερθεί η εφαρμογή του CBPG σε ασθενή που ανέπτυξε στοματοφαρυγγική βλεννογονίτιδα μετά από μερικές μέρες από την μεταμόσχευση των HSC. Οι μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του CBPG δεν τηρούσαν τα κριτήρια ώστε να επεξεργασθούν για να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν αρχαίγονα αιμοποιητικά κύτταρα με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως μοσχεύματα σε αιματολογικές ασθένειες. Όταν παρασκευάστηκε το PRP, ενεργοποιήθηκε με την προσθήκη γλυκονικού ασβεστίου σε αναλογία 1:3 και σχηματίστηκε το CBPG (Piccin, et al. 2017).

Η γέλη δόθηκε στην ασθενή η οποία την τοποθέτησε στο στόμα της και το PG απορροφήθηκε από τα τοιχώματα. Τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά θετικά καθώς μέσα σε μία εβδομάδα σχεδόν όλες οι εστίες της βλεννογονίτιδας είχαν υποχωρήσει και η ποιότητα ζωής της ασθενούς βελτιώθηκε πάρα πολύ (Piccin, et al. 2017).

Τέλος, να αναφέρουμε ότι η εφαρμογή του CBPG στην συγκεκριμένη περίπτωση, αν και για άγνωστους λόγους, προκάλεσε αύξηση των λευμοκυττάρων χωρίς την αύξηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και το οποίο, σύμφωνα με τους ειδικούς, πρέπει να βοήθησε στην καταπολέμηση της λοίμωξης από CMV που έπασχε η ασθενής (Piccin, et al. 2017).

3.3.6 Η εφαρμογή του PRP στον τομέα της οδοντιατρικής και της εξαγωγής δοντιών.

Η επούλωση της πληγής που δημιουργείται μετά την εξαγωγή ενός δοντιού είναι σχετικά γρήγορη και δεν προκαλεί σοβαρές επιπλοκές. Όμως, σήμερα όπου ο κλάδος της οδοντιατρικής προχωράει με εκθετικούς ρυθμούς, είναι ανάγκη να βρεθούν λύσεις ακόμα και στις λίγες περιπτώσεις που κάτι απλό, όπως η εξαγωγή ενός φρονιμίτη, μπορεί να υποβιβάσει την ποιότητα ζωής ενός ανθρώπου (Ugboko, Olufemi and Owotade 2011).

Οι φρονιμίτες (ο τρίτος γομφίος στη σειρά) είναι τα τελευταία δόντια που βγαίνουν στην στοματική κοιλότητα του ανθρώπου. Κάποιες φορές κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπου, οι φρονιμίτες μπορεί να έχουν κλήση μέσα στην κάτω γνάθο και να έχουν κατεύθυνση προς το δόντι που βρίσκεται ακριβώς μπροστά τους (δεύτερος γομφίος), με αποτέλεσμα να μην μπορούν να βγουν στην στοματική κοιλότητα. Αυτή η κατάσταση μπορεί να χαρακτηριστεί ως **impacted third molar** και πρόκειται για μία ανεπιθύμητη κατάσταση η οποία προκαλεί δυσφορία στον ασθενή μαζί με άλλα προβλήματα και η μόνη λύση είναι η εξαγωγή του συγκεκριμένου δοντιού (Santosh 2015).

Η ανάρρωση ενός ασθενούς μετά την εξαγωγή ενός δοντιού, σχετίζεται την επούλωση την πληγής που έχει δημιουργηθεί και με τις επιπλοκές που εμφανίζονται με την μορφή πόνου και οιδήματος γύρω από το σημείο που πραγματοποιήθηκε η επέμβαση (Ugboko, Olufemi and Owotade 2011).

Για να καταλάβουμε αν το PRP μπορεί να βοηθήσει στην ομαλοποίηση αυτών των συμπτωμάτων μετά από την εξαγωγή ενός φρονιμίτη ο οποίος δεν αναπτυσσόταν σωστά, θα πάρουμε για παράδειγμα μια έρευνα στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με αυτό το πρόβλημα και ύστερα από την επιτυχή επέμβαση για την αφαίρεση του φρονιμίτη, είτε τους χορηγήθηκε αυτόλογο PG στο σημείο της πληγής είτε δεν τους χορηγήθηκε PG (Ugboko, Olufemi and Owotade 2011).

Το PRP ετοιμάστηκε μετά από την αιμοληψία λίγων ml αίματος από κάθε ασθενή ακολουθώντας πρωτόκολλο δύο φυγοκεντρήσεων και στο τέλος ενεργοποιήθηκε με την προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου σε συνδυασμό με θρομβίνη βοείου. Το PG τοποθετήθηκε στο σημείο της εξαγωγής στο τέλος της επέμβασης (Ugboko, Olufemi and Owotade 2011).

Οι ασθενείς μέχρι την πλήρη ανάρρωση τους κατέγραφαν τα επίπεδα πόνου καθώς και οι ειδικοί κατέγραφαν τα επίπεδα οιδήματος και την αναγέννηση του οστού στο σημείο της επέμβασης με απεικονιστικές μεθόδους. Οι ασθενείς που έλαβαν PG αμέσως μετά την επέμβαση φάνηκε να έχουν λιγότερο πόνο κατά την διάρκεια της ανάρρωσης. Η ανάπλαση του οστού ήταν και αυτή μεγαλύτερη στους ασθενείς που πήραν το PG, όμως όχι αρκετά μεγάλη για να θεωρηθεί ότι το PG βοηθάει. Το ίδιο ισχύει και για το οίδημα του προσώπου και το μέγιστο άνοιγμα του στόματος (Ugboko, Olufemi and Owotade 2011).

Αυτά τα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα και σε συνδυασμό με αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για την εφαρμογή του PRP μετεγχειρητικές οδοντιατρικές εφαρμογές για την βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς αλλά και την ταχύτερη επούλωση της πληγής, επιβεβαιώνουν ότι το PRP μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στον τομέα της οδοντιατρικής και στις υπόλοιπες ιατρικές επιστήμες (Ugboko, Olufemi and Owotade 2011; Alissa , et al. 2010).

3.3.7 Η χρήση του PRP στην πλαστική χειρουργική

Το PRP μπορεί να βρει εφαρμογή ακόμα και στον τομέα της πλαστικής χειρουργικής που πραγματεύεται να θεραπεύει παθήσεις που έχουν ανάγκη την αναδόμηση των μαλακών ιστών με την χρήση επεμβατικών μέσω ή και με την βοήθεια μοσχευμάτων δέρματος ή άλλων ιστών (Cervelli, et al. 2009).

Ασθένειες στις οποίες το PRP έχει βρει εφαρμογή και είχε θετικά αποτελέσματα είναι: ατροφία του προσώπου, skin depression, σύνδρομο romberg, και επικίνδυνα έλκη του ποδιού που η θεραπεία τους κανονικά θα αποτελούσε την ακρωτηριασμό (Cervelli, et al. 2009).

Ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από αυτές τις ασθένειες και τους χορηγήθηκε θεραπεία με PRP σε συνδυασμό με μοσχεύματα λιπώδους ιστού, υπέδειξαν εξαιρετική βελτίωση σε σχέση με τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε συμβατική θεραπεία (πχ. φάρμακα υαλουρονικού οξέος και κολλαγόνο ή σκέτα μοσχεύματα λιπώδους ιστού) (Cervelli, et al. 2009).

Ειδικό Μέρος

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν αρχικά η ανάπτυξη γέλης αιμοπεταλίων από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα ώστε να αξιολογηθούν τα χαρακτηριστικά τους και δευτερογενώς η επίδραση τους όταν εφαρμόζονται σε κυτταροκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων βαρτονείου γέλης.

Στο πρώτο στάδιο αυτής της εργασίας, συλλέχθηκαν μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος, οι οποίες αποτελούσαν δωρεά στην ΕΛ.Τ.ΟΠΑ. Από αυτές τις μονάδες, παρασκευάστηκε PRP με μια μέθοδο δύο φυγοκεντρήσεων. Αυτές οι μονάδες αποθηκεύονταν στους -20°C και σχηματιζόταν το PL. Ένα pool μονάδων ομφαλοπλακουντιακού δημιουργούταν από κάθε 10 μονάδες ομφαλοπλακουντιακής προέλευσης PRP που παρασκευάζονταν. Για αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν και δύο pooled μονάδες περιφερικού αίματος για την παρασκευή PRP. Οι μονάδες του περιφερικού αίματος ήταν προερχόμενες από την υπηρεσία αιμοδοσίας του γενικού νοσοκομείου Ευαγγελισμός. Τα PL και από τις δυο μονάδες μετρήθηκαν ως προς την συγκέντρωση τους σε πρωτεΐνη.

Το δεύτερο στάδιο αυτής της εργασίας αποτελούσε η εφαρμογή του PLGEL σε κυτταροκαλλιέργειες WJ-MSCs. Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία περιλάμβανε τρεις πειραματικές προσεγγίσεις. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καλλιέργεια αυτών των κυττάρων από την βαρτόνιο γέλη του ομφάλιου λώρου. Εφόσον τα κύτταρα είχαν αναπτυχθεί σε έναν ικανοποιητικό αριθμό, εφαρμόστηκε σε αυτά το PL σε διάφορες συνθήκες. Στην πρώτη το PL από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα συνδυάστηκε με θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια εφαρμόστηκε στις κυτταροκαλλιέργειες. Στην δεύτερη συνθήκη από το PL, με την προσθήκη γλυκονικού ασβεστίου, σχηματίστηκε η γέλη αιμοπεταλίων και εφαρμόστηκε επάνω στις κυτταροκαλλιέργειες των MSCs και στην Τρίτη συνθήκη πάλι σχηματίστηκε η γέλη αιμοπεταλίων και τα MSCs τοποθετήθηκαν επάνω της.

Οι κυτταροκαλλιέργειες αξιολογήθηκαν ως προς την ποιότητα και την ικανότητα της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω της παρατήρησης τους με μικροσκόπιο καθημερινά. Για την τρίτη συνθήκη εφαρμόστηκε ανοσοφθορισμός.

Κεφάλαιο 1: Συλλογή Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος.

Αρχικά, πρέπει να σημειωθεί ότι η συλλογή του ομφαλοπλακουντιακού αίματος είναι απόλυτα ασφαλής για την μητέρα και το νεογνό. Δεν απαιτείται η χρήση αναισθησίας και τα μοσχεύματα που παρασκευάζονται από αυτό είναι περισσότερο συμβατά σε σχέση με τα μοσχεύματα από μυελό των οστών. Τέλος, αυτό το αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή προϊόντων όπως το PRP. (Tan, Tang and Huang 2007).

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι που μπορεί να συλλεχθεί το ομφαλοπλακουντιακό αίμα:

In utero: Αυτή η τεχνική απαιτεί το κλείσιμο του ομφαλίου λώρου στο ένα άκρο αμέσως μετά την γέννα και ο πλακούντας να μην έχει αποβληθεί ακόμα από την μήτρα. Ο ομφάλιος λώρος καθαρίζεται με διάλυμα αλκοόλης 70%. Στη συνέχεια η ομφάλια φλέβα παρακεντείται με βελόνα η οποία καταλήγει σε ένα κλειστό σύστημα ασκού συλλογής αίματος. Το αίμα συλλέγεται με την βοήθεια της βαρύτητας μέσα στον ασκό (Bassiouny, et al. 2015) (Tan, Tang and Huang 2007).

Ex utero: Η τεχνική αυτή απαιτεί την αφαίρεση του πλακούντα από την μήτρα και τοποθετείται σε πάγκο όπου ο ομφάλιος λώρος είναι σε χαμηλότερο επίπεδο από τον πλακούντα. Ο ομφάλιος λώρος καθαρίζεται με διάλυμα αλκοόλης 70% και στη συνέχεια παρακεντείται με βελόνα η οποία καταλήγει σε ένα κλειστό σύστημα ασκού συλλογής αίματος. Η συλλογή τελειώνει μετά από 5 λεπτά περίπου όταν όλο το αίμα θα έχει συλλεχθεί στον ασκό με την βοήθεια της βαρύτητας (Bassiouny, et al. 2015) (Tan, Tang and Huang 2007).

Άλλες τεχνικές για την συλλογή του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, χρησιμοποιούν πίεση είτε με τα ίδια τα χέρια του μαιευτήρα είτε με μηχανήματα (π.χ πίεση με αέρα) για ευκολία και πιο αποτελεσματική συλλογή του αίματος (Tan, Tang και Huang 2007).

Αμέσως μετά την συλλογή το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, εάν είναι αδύνατη η μεταφορά του στην τράπεζα αίματος εκείνη την στιγμή, φυλάσσεται στους 4°C (Bassiouny, et al. 2015).

Κεφάλαιο 2: Διαλύματα πειραμάτων.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα περιγραφούν τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους στις περιπτώσεις που το διάλυμα δεν ήταν έτοιμο από το εμπόριο.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Διαλύματα έτοιμα από το εμπόριο:
 - 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco)
 - α-Mem (1X) (Gibco)
 - FBS (Gibco)
 - L-Glutamine 200mM (Gibco)
 - PBS 10x (Gibco)
 - Penicillin–Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)
 - Γλυκονικό ασβέστιο
- Διαλύματα που παρασκευάσθηκαν:
 - PBS 10%
 - Θρεπτικό υλικό 20%
 - PL medium (UC/PB PL medium)

2.1 PBS 10%



Εικόνα 10 - PBS 1x, 500ml (Gibco).

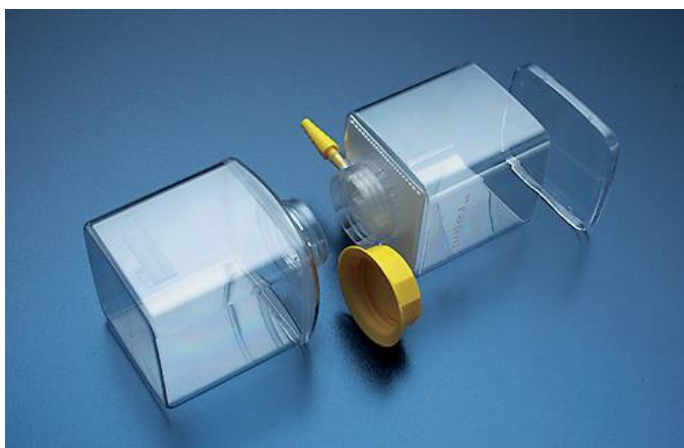
Πηγή:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10010023#/10010023>

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- PBS 10x (Gibco)
- Απεσταγμένο νερό
- Ογκομετρικός Κύλινδρος 1L (Vitlab)
- Φίλτρο διήθησης 0,22μm, 500ml (TPP)

Διαδικασία: Σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο του 1L προστίθεται 100ml PBS και 900 ml απεσταγμένο νερό. Ο ογκομετρικός κύλινδρος ανακινείται με το διάλυμα δύο με τρεις φορές ώστε να αναμειχθεί το περιεχόμενο του καλά (το στόμιο του κυλίνδρου κλείνεται με parafilm ώστε να μην χυθεί το περιεχόμενο του κατά την ανακίνηση). Μεταφέρεται το περιεχόμενο του κυλίνδρου σε δύο φίλτρα διήθησης 0,22μm (500 ml μέγιστη ικανότητα διήθησης το κάθε ένα). Το αποτέλεσμα είναι ένα διάλυμα PBS 10% το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου για μέγιστο δύο εβδομάδων.



Εικόνα 11 - Φίλτρο διήθησης 0,22μm (TPP).

Πηγή:

https://www.tpp.ch/page/produkte/11_filtration_vakuum.php



Εικόνα 12 - Αποθήκευση PBS 10% μετά την διήθηση.

Πηγή:

https://www.tpp.ch/page/produkte/11_filtration_vakuum.php

2.2 Θρεπτικό Υλικό 20%

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Βιολογικός θάλαμος νηματικής ροής (Bionair)
- Υδατόλουτρο
- Πιπέτες 20ml (Sarstedt)
- α-MEM 500ml (Gibco)
- Penicillin–Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)

- L-Glutamine 200mM (Gibco)
- FBS (Gibco)

Διαδικασία: Το θρεπτικό υλικό που παρασκευαζόταν περιείχε 500 ml α-MEM, 12 ml Penicillin–Streptomycin 1000 U/ml, 12 ml L-Glutamine 200mM και 115 ml FBS. Όλα αυτά τα διαλύματα βρισκόντουσαν στο -20°C και ήταν ήδη χωρισμένα στους παραπάνω όγκους μέσα σε σωληνάρες προπυλενίου τύπου Falcon των 15 και 50 ml (εκτός από το α-MEM που ήταν αποθηκευμένο στους 4°C και βρίσκεται στην συσκευασία του). όλα τα διαλύματα ξεπαγώνονταν σε υδατόλουτρο (37°C). Μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, πραγματοποιούταν η μεταφορά των παραπάνω όγκων μέσα στα 500ml του α-MEM με την βοήθεια πιπετών μίας χρήσης. Το θρεπτικό υλικό αποθηκευόταν στο ψυγείο για μέγιστο δύο εβδομάδων στους 4°C.

2.3 PL medium

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Βιολογικός θάλαμος νηματικής ροής (Bionair)
- Υδατόλουτρο.
- Σύστημα φιλτραρίσματος σύριγγας 0.45 και 0,20 μm (Corning)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- Σύριγγες 10ml
- Βελόνες 21G
- UCPL (Umbilical cord platelet lysate)
- PBPL (Peripheral blood platelet lysate)
- α-MEM (Gibco)
- Penicillin–Streptomycin 1000 U/ml (Gibco)
- L-Glutamine 200mM (Gibco)

Διαδικασία: Το PL είτε από περιφερικό αίμα (PB) είτε από ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UC ή CB) ξεπαγώνονταν στους 37°C σε υδατόλουτρο. Μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, πραγματοποιούταν η μεταφορά 10ml α-MEM, 1ml L-Glutamine 200mM και 1ml Penicillin–Streptomycin 1000 U/ml σε δύο σωλήνες προπυλενίου falcon των 50ml με την βοήθεια πιπέτας μίας χρήσης των 10ml, στο κάθε ένα. Στη συνέχεια γινόταν η προσθήκη 2ml UCPL στο ένα σωλήνα προπυλενίου falcon και 2ml PBPL στο δεύτερο falcon.

Υπάρχουν δύο τεχνικές με τις οποίες πραγματοποιούτα η προσθήκη του PL. Στην πρώτη, αφαιρούταν το PL από τους ασκούς με την βοήθεια βελόνας και σύριγγας, στη συνέχεια αφαιρούταν η βελόνα από την σύριγγα και ενσωματώνονταν το φίλτρο 0,45μm ή 0,20μm στην



Εικόνα 13 - Φίλτρο σύριγγας 0,20µm (Corning).

Πηγή: <https://www.indiamart.com/proddetail/sterile-syringe-filter-21252235212.html>

άκρη της σύριγγας. Ο λόγος που χρησιμοποιείται φίλτρο είναι για να μην περάσουν στο medium οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων και τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία που μπορεί να είναι παρόν στο PL. Το φίλτρο με την σύριγγα και το PL τοποθετούνταν πάνω από τον σωλήνα προπυλενίου falcon και πιεζόταν το έμβολο της σύριγγας. Παρατηρούνταν ότι το PL ήταν πολύ δύσκολο να φιλτραριστεί επειδή τα φίλτρα βούλωναν αμέσως με αποτέλεσμα να χάνεται έως και το μισό υλικό κατά το φιλτράρισμα. Για αυτό τον λόγο, πραγματοποιούνταν η προσθήκη 2ml αφιltrάριστο PL στο κάθε σωλήνα προπυλενίου falcon και στη συνέχεια όλο το medium ξαναπέρναγε από το φίλτρο. Αναρροφούταν με σύριγγα το PL medium και στη συνέχεια ξαναπέρναγε από το φίλτρο. Αυτή τη φορά, επειδή το PL αραιώθηκε αρκετά μέσα στο medium, το φιλτράρισμα του ήταν πολύ πιο εύκολο και αποτελεσματικό με ελάχιστες απώλειες υλικού. Κατά την δεύτερη τεχνική, ήταν γνωστό το πρόβλημα που εμφανίζει το φιλτράρισμα του PL που περιγράφηκε παραπάνω, οπότε, μεταφέρθηκαν τα PL σε δύο σωλήνα προπυλενίου falcon (ένα για το UCPL και ένα για το PBPL) και φυγοκεντρήθηκαν στα 1800g για 10 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων έμεναν στο κάτω μέρος των σωλήνα προπυλενίου falcon και χρησιμοποιήθηκαν 2 ml από το υπερκείμενο από κάθε PL για την παρασκευή του medium.

Στο τέλος τα δύο medium (UC medium και PB medium) αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Κεφάλαιο 3: Παρασκευή Platelet Rich Plasma

3.1 Επιλογή μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την Παρασκευή Platelet Rich Plasma

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτής της εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν **μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος ή CBUs (Cord Blood Units)** (εικ. 14) που αποτελούσαν δωρεά από υγιείς μητέρες οι οποίες είχαν δώσει την συγκατάθεση τους να δωρίσουν το ομφαλοπλακουντιακό αίμα στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος ή ΕΛ.Τ.ΟΠΑ με σκοπό την επεξεργασία του για την απομόνωση και καλλιέργεια αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων για την δημιουργία μοσχευμάτων για τους ασθενείς με αιματολογικά προβλήματα (λευχαιμίες, λεμφόματα κ.α). Οι μονάδες αίματος οι οποίες δεν τηρούσαν τα κριτήρια για την επεξεργασία του αίματος για τους σκοπούς που αναφέρονται παραπάνω, είναι αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του PRP.



Εικόνα 14 - Μονάδα ομφαλοπλακουντιακού αίματος (CBU). Ασκός εταιρίας Macropharma

Όμως, κάθε μονάδα ομφαλοπλακουντιακού αίματος για να γίνει PRP θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Συγκέντρωση αιμοπεταλίων μεγαλύτερη από $150 \cdot 10^3$ PLTs/μl
- Απόλυτο αριθμό αιμοπεταλίων στον ασκό μεγαλύτερο από $13000 \cdot 10^6$
- Συγκέντρωση λευκών αιμοσφαιρίων μικρότερη από $1,5 \cdot 10^3$ WBCs/μl
- Μεικτό βάρος του ασκού με το αίμα μεγαλύτερο από 90 gr.

Σημείωση: κάποιες από τις μονάδες αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για να παρασκευασθεί PRP είχαν μικρότερη συγκέντρωση και απόλυτο αριθμό αιμοπεταλίων από τα παραπάνω όρια.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 39 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την παρασκευή 22 μονάδων PRP από τον Οκτώβριο του 2019 ως τον Ιανουάριο του 2020.

3.2 Μέθοδος παρασκευής Platelet Rich Plasma από ομφαλοπλακουντιακής προέλευσης αίμα.

Παρακάτω περιγράφεται η μέθοδος με την οποία παρασκευάστηκαν όλες οι μονάδες PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Πρόκειται για μια μέθοδο δύο φυγοκεντρήσεων.

3.2.1 Αρχικές μετρήσεις πριν την φυγοκέντρωση

Εφόσον ανακινηθεί καλά μία μονάδα για να αναμειχθούν ομοιόμορφα όλα τα κύτταρα στον ασκό, λαμβάνεται δείγμα με βελόνα και σύριγγα, με προσοχή ώστε να μην τρυπήσει ο ασκός, και πραγματοποιείται στο δείγμα γενική αίματος (ποσότητα δείγματος < 0,5ml). Τέλος, ζυγίζουμε τον ασκό σε ζυγό Delmac (εικ. 15) και τα αποτελέσματα τις γενικής αίματος και του βάρους καταγράφονται σε υπολογιστικό φύλλο excel για να υπολογισθεί η αρχική συγκέντρωση και ο απόλυτος αριθμός των αιμοπεταλίων.



Εικόνα 15 - Ηλεκτρονικός ζυγός Delmac DSW200D. Πηγή:
https://www.delmac.gr/index.php?route=product/product&product_id=107

3.1.2 Ταυτοποίηση των ομάδων αίματος

Με το υπόλοιπο δείγμα που έχει περισσέψει από την γενική αίματος ταυτοποιείται η ομάδα αίματος του ασκού κατά ABO και RHESUS.

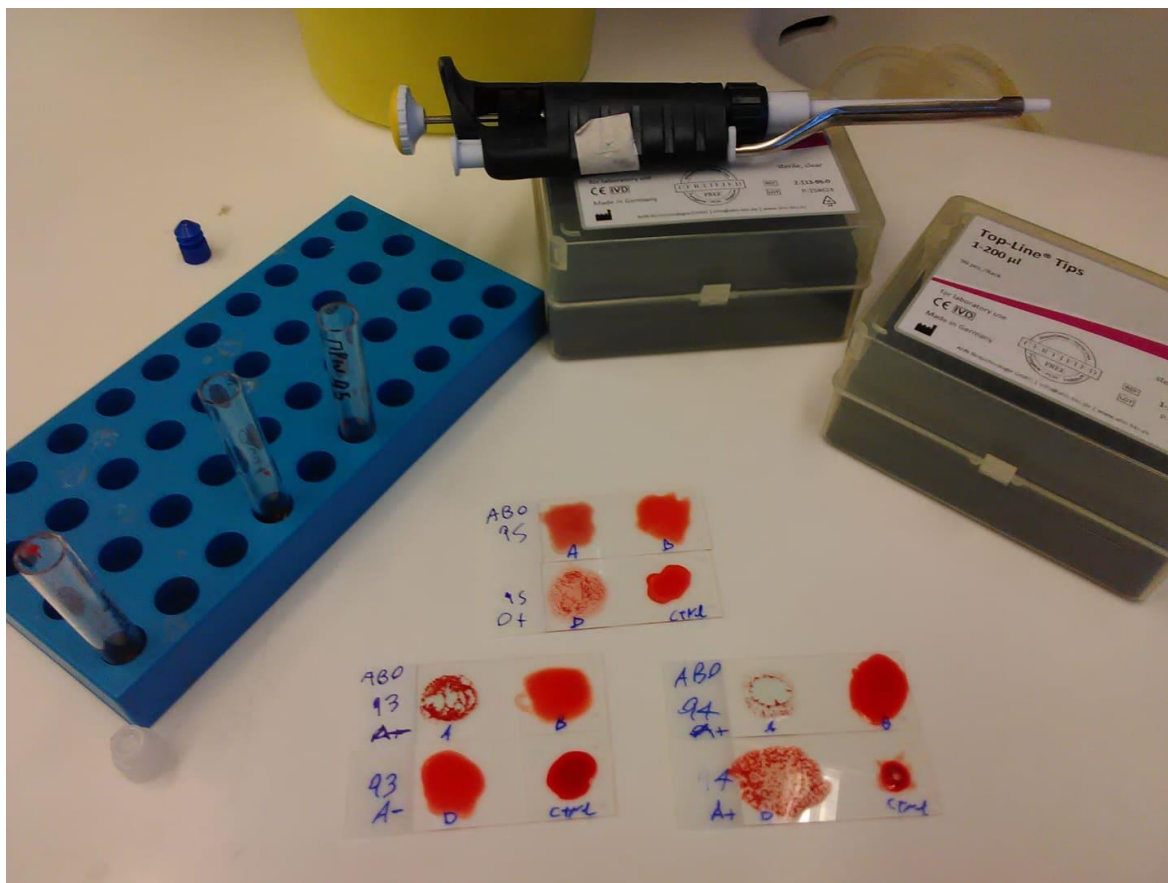
Η ταυτοποίηση γίνεται με την βοήθεια ειδικών αντιορών (anti-A, anti-B, anti-D), οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν συγκολλήσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων εάν στην επιφάνεια τους υπάρχουν τα αντιγόνα A, B ή D. Η διαδικασία γίνεται πάνω σε αντικειμενοφόρες

πλάκες στις οποίες αναγράφονται επάνω τα στοιχεία της μονάδας αίματος (κωδικός και ημερομηνία). Για την ταυτοποίηση κατά ABO και Rhesus μιας μονάδας αίματος, απαιτούνται δύο αντικειμενοφόρες πλάκες. Σε κάθε πλάκα αναγράφονται οι θέσεις που θα γίνει ο προσδιορισμός του κάθε αντισώματος (δηλαδή ποιος αντιορός θα χρησιμοποιηθεί).

Εφόσον οι αντιοροί παραμείνουν εκτός ψυγείου για αρκετή ώρα για να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται μία σταγόνα από τον κάθε ένα σε μία από τις θέσεις της αντικειμενοφόρου πλάκας. Τοποθετείται πρώτα το anti-A μετά το anti-B και τέλος το anti-D.

Στη συνέχεια με μία αυτόματη πιπέτα 20-200μl ρυθμιζόμενη στα 80μl, λαμβάνεται ποσότητα αίματος από το δείγμα που περίσσεψε από την γενική αίματος. Τοποθετείται μία σταγόνα αίματος πάνω σε κάθε αντιορό στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι σταγόνες αφήνονται να πέσουν σε χαμηλή απόσταση πάνω από τους αντιορούς ώστε να μην γίνει επιμόλυνση των δίπλα θέσεων των άλλων αντιορών. Τέλος, τοποθετείται μια τελευταία σταγόνα αίματος σε μια καθαρή θέση της αντικειμενοφόρου πλάκας ως αρνητικός μάρτυρας. Με την βοήθεια των πλαστικών tip της πιπέτας αναμιγνύεται η κάθε σταγόνα αίματος με τον κάθε αντιορό με προσοχή ώστε να μην επιμολυνθούν οι διπλανές θέσεις των άλλων αντιορών. Κάθε tip απορρίπτεται μετά από μία χρήση. **Δεν χρησιμοποιούμε το ίδιο tip για την ανάμειξη διαφορετικών σταγόνων αίματος με άλλους αντιορούς του ίδιου ή οποιοδήποτε δείγματος, υπάρχει κίνδυνος για ψευδός θετικά αποτελέσματα.**

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με βάση το αν θα παρατηρηθεί κροκκίδωση μετά από κάθε ανάδευση των αντιορών με τις σταγόνες αίματος. Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να μην κροκκιδώνεται για να θεωρηθούν τα αποτελέσματα έγκυρα. Τα αποτελέσματα καταγράφονται πάνω στις πλάκες και πραγματοποιείται και η λήψη φωτογραφίας για το αρχείο. Το δείγμα μετά από την ταυτοποίηση της ομάδας αίματος μπορεί να απορριφθεί.



Εικόνα 16 - Ταυτοποίηση ομάδων αίματος κατά ABO και Rhesus Τριών μονάδων αίματος. Βλέπουμε ότι για κάθε μονάδα υπάρχουν δύο αντικειμενοφόρες πλάκες στις οποίες αναμιγνύεται το αίμα με τους αντιορούς όπως περιγράφηκε και παρατηρείται εάν θα προκληθεί κροκκίδωση.

3.1.3 Πως γίνεται η ένωση δύο ασκών.



Εικόνα 17 - Total Containment Device (TCD) model B40. Πηγή: <http://genesisbbs.com/tcd-sterile-tube-welder/>

Για τις ανάγκες των πειραμάτων, κάποιες μονάδες αίματος έπρεπε να ενωθούν μεταξύ τους. Μονάδες αίματος οι οποίες είχαν χαμηλό όγκο μπορούσαν να ενωθούν μεταξύ τους σε έναν ασκό ώστε να δημιουργηθεί μια νέα μονάδα με μεγαλύτερο όγκο αίματος. Προϋπόθεση για να ενωθούν δύο μονάδες αίματος είναι να έχουν την ίδια ομάδα αίματος κατά ABO. Η ένωση γίνεται με μηχάνημα TCD (εικ. 17) και μεταφέρεται το αίμα από τον ασκό με την λιγότερη ποσότητα αίματος σε αυτόν με την περισσότερη. Πάντα πρέπει να γράφουμε πάνω στον ασκό τον κωδικό των μονάδων αίματος οι οποίες ενώθηκαν.

Όταν γίνεται η ένωση δύο μονάδων αίματος σε έναν ασκό, τότε πρέπει να επαναλαμβάνεται η γενική αίματος με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω.

Κάθε μονάδα αίματος που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή PRP με τον τρόπο που περιγράφεται, χρειάζεται να ενωθεί με έναν άδειο ασκό. Από καθαρούς ασκούς αφαιρείται όλο το αντιπηκτικό με σύριγγα και βελόνα 18G. Με Sealer (GenesisBPS Rapid seal 2 SE640) κόβεται το σωληνάριο του κενού ασκού στα 30cm και απορρίπτεται το σωληνάριο με τις βελόνες. Προσοχή το clip του κενού ασκού να παραμείνει στο σωληνάριο του ασκού. Σε αυτόν τον κενό ασκό αναγράφεται ο κωδικός της μονάδας αίματος που θα τον ενωθεί. Ο άδειος ασκός με τον ασκό με το αίμα ενώνεται με την βοήθεια του TCD μηχανήματος (Εικ. 18,19). Ελέγχεται το σημείο της ένωσης ώστε να είναι σωστά ενωμένο και να μην υπάρχουν διαρροές. Στο σημείο το οποίο έχουν ενωθεί τα σωληνάρια των δύο ασκών παρατηρούμε ότι η «ροή» είναι κλειστή και δεν επιτρέπεται η μεταφορά του αίματος από τον έναν ασκό στον άλλον.



Εικόνα 18 - Ένωση άδειου ασκού με ασκό ομφαλοπλακουντιακού αίματος πριν την φυγοκέντρηση.



Εικόνα 19 - Ενωμένοι ασκοί

3.1.4 Πρώτη φυγοκέντρωση

Σε ειδικά baskets τοποθετούνται κάθετα οι ασκοί συμπιεσμένοι με «μαξιλαράκια» ώστε να μην μπορούν να κουνηθούν κατά τη μεταφορά ή κατά την φυγοκέντρωση και ώστε να γίνει σωστή στρωματοποίηση των παραγώγων αίματος μέχρι το τέλος της φυγοκέντρωσης (εικ. 20). Εάν υπάρχει αίμα στο σωληνάριο του ασκού, προσπαθούμε να το μεταφέρουμε όλο μέσα στον ασκό με μία διαδικασία που λέγεται stripping. Τα baskets τοποθετούνται στην φυγόκεντρο αντιδιαμετρικά και ισοζυγισμένα (εικ 21). Εάν οι ασκοί έχουν μικρές διαφορές στο βάρος, αυτό μπορεί να διορθωθεί τοποθετώντας στο κάτω μέρος των baskets μικρά αντικείμενα ώστε τα baskets που θα τοποθετηθούν αντιδιαμετρικά να έχουν το ίδιο βάρος (εικ. 22). Το πρόγραμμα της πρώτης φυγοκέντρωσης ήταν 800 rpm για 15 λεπτά.



Εικόνα 20 - Ασκοί τοποθετιμένοι μέσα σε baskets έτοιμοι για την πρώτη φυγοκέντρωση. Μαξιλαράκια τοποθετούνται ανάμεσα στους ασκούς και στα τοιχώματα ώστε να είναι συμπιεσμένοι και σταθεροί κατά την φυγοκέντρωση.



Εικόνα 21 – Basket με τους ασκούς ισοζυγίζεται με ίσο βάρος με το basket που θα τοποθετηθεί αντιδιαμετρικά του στην φυγόκεντρο



Εικόνα 22 – Δεξιά: Φυγόκεντρος MSE CELLSEP 6/720R. Αριστερά: Baskets τοποθετημένα στην φυγόκεντρο αντιδιαμετρικά.

3.1.5 Πρώτο extraction

Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρηση, μεταφέρονται τα bastets προσεκτικά στον πάγκο όπου υπάρχει ειδικό πίεστρο Fenwal plasma extractor 4R4414 (εικ. 23). Με προσεκτικές κινήσεις αφαιρούνταν τα μαξιλαράκια (τελευταία αφαιρούνταν τα μαξιλαράκια μπροστά και πίσω από τον ασκό). Ο ασκός τοποθετούνταν στον plasma extractor με την μεριά που περιέχει την ετικέτα του ασκού προς το σώμα του extractor ώστε να υπάρχει οπτική επαφή με το περιεχόμενο του ασκού.



Εικόνα 23 - Fenwal plasma extractor 4R4414.

Εφόσον η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε σωστά και εφόσον δεν αναταράχτηκε ο ασκός κατά την μεταφορά του στον πάγκο και στον extractor, θα έχει γίνει πλήρης διαχωρισμός των στοιχείων του αίματος σε στοιβάδες. Στο κάτω μέρος υπάρχει η στοιβάδα των ερυθρών, στην μέση μια πολύ λεπτή λευκή στοιβάδα το buffy coat, και στο πάνω μέρος με κιτρινοπό διαφανές χρώμα το πλάσμα.

Το σημείο της ένωσης των δύο ασκών ανοίγονταν ασκώντας πίεση στα δύο σωληνάρια με τα χέρια. το clip του άδειου ασκού. Στη συνέχεια, με προσοχή πρέπει ο ασκός να ακουμπήσει στο πίσω μέρος του plasma extractor και να ελευθερωθεί το έμβολο ομαλά να πιέσει τον ασκό και να μεταφέρει το plasma στον άδειο ασκό. Τα αιμοπετάλια βρίσκονται πάνω από το buffy coat. Καθώς το πλάσμα μεταφέρεται και η στοιβάδα με τα ερυθρά αιμοσφαίρια «σηκώνεται», λίγο πριν όλο το πλάσμα περάσει στο σωληνάριο, θα σηκωθεί η στοιβάδα με το buffy coat και τα αιμοπετάλια και θα εισέλθει στο σωληνάριο με τη στοιβάδα των ερυθρών να ακολουθεί. Σε αυτό

το σημείο με γρήγορες κινήσεις πρέπει να κλήσει η ροή πιέζοντας το clip του ασκού την στιγμή που τα ερυθρά θα πλησιάσουν την είσοδο του νέου ασκού ο οποίος είναι γεμάτος με πλάσμα. Σκοπός αυτού του extraction είναι να απομονωθεί σε έναν καθαρό ασκό το πλάσμα με όσα περισσότερα αιμοπετάλια γίνεται και όσο το δυνατόν λιγότερα λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια γίνεται (εικ. 28).

3.2.6 Μετρήσει πριν την δεύτερη φυγοκέντρηση.

Από τον ασκό με το πλάσμα, εφόσον ανακινηθεί, λαμβάνεται δείγμα με σύριγγα και βελόνα χωρίς να αποσυνδεθεί από τον αρχικό ασκό που πλέον έχει μόνο ερυθρά αιμοσφαίρια κατά κύριο λόγο. Σε αυτό το δείγμα πραγματοποιείται γενική αίματος. Εάν τα αιμοπετάλια είναι παρόμοια σε συγκέντρωση ή μεγαλύτερα από αυτά που μετρήσαμε στον αρχικό ασκό (3.1.1/2), τότε με sealer κόβεται όλο το σωληνάριο του ασκού με το πλάσμα.



Εικόνα 24 - Το πλάσμα απομονωμένο στον δεύτερο ασκό και ο αρχικός ασκός με τα ερυθρά αιμοσφαίρια ενωμένοι αμέσως μετά την απομόνωση του πλάσματος.

Εάν τα αιμοπετάλια είναι χαμηλότερα σε συγκέντρωση, τότε, με την βοήθεια βελόνας και σύριγγας, λαμβάνεται το υπόλοιπο πλάσμα που βρίσκεται στο επάνω μέρος του αρχικού ασκού και μεταφέρεται στον ασκό με το πλάσμα (Υπάρχει πιθανότητα ένας σημαντικός αριθμός αιμοπεταλίων να έχει περισέψει στον αρχικό ασκό και να έχει παγιδευτεί με το μικρό όγκο πλάσματος που δεν μπορούσε να περάσει από το σωληνάριο προς τον καινούριο ασκό). Σε αυτή την περίπτωση δείγμα λαμβάνεται ξανά από τον ασκό με το πλάσμα για γενική αίματος.

Εφόσον οι δύο ασκοί διαχωριστούν, ζυγίζονται και οι δύο ασκοί (με το πλάσμα και τα ερυθρά αιμοσφαίρια) και λαμβάνεται δείγμα από τον ασκό των ερυθρών για γενική αίματος ο οποίος στην συνέχεια απορρίπτεται. Το τελευταίο δείγμα είναι απαραίτητο για να προσδιορίσουμε την απώλεια των αιμοπεταλίων. Δηλαδή πόσα αιμοπετάλια δεν πέρασαν στον νέο ασκό με το πλάσμα.

Όλα τα αποτελέσματα (από τις γενικές αίματος και τα βάρη των ασκών) καταγράφονται σε excel για να υπολογισθούν η ανάκτηση αιμοπεταλίων μετά την πρώτη φυγοκέντρηση καθώς και τα αιμοπετάλια που χάθηκαν.

3.2.7 Δεύτερη φυγοκέντρηση

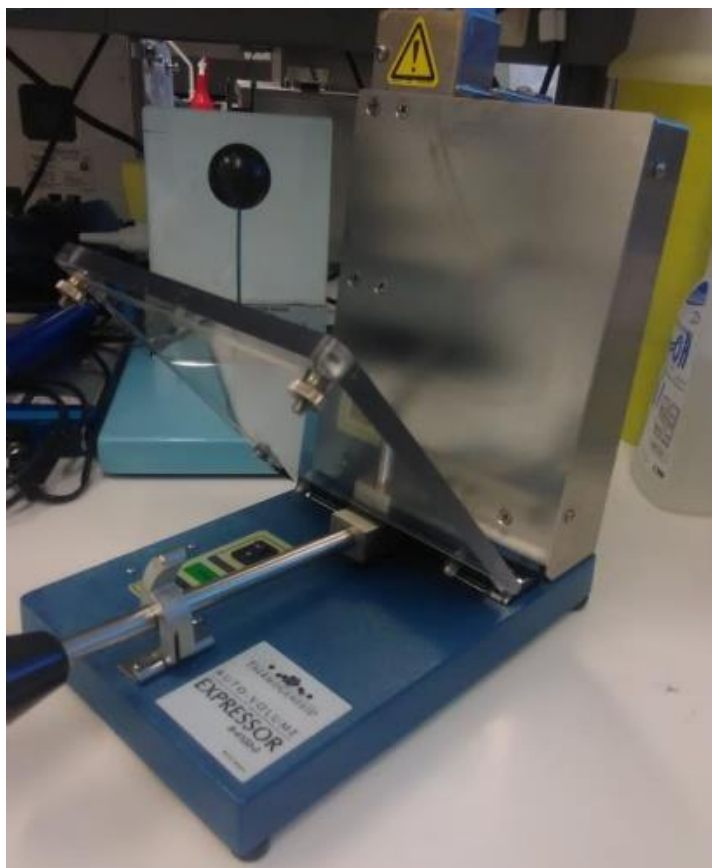
Με τον ίδιο τρόπο όπως στην πρώτη φυγοκέντρηση, οι ασκοί τοποθετούνται σε baskets και στην φυγόκεντρο αντιδιαμετρικά και ισοζυγισμένα. Το πρόγραμμα για αυτή την φυγοκέντρηση είναι 3000rpm για 15 λεπτά.

Κατά την διάρκεια της δεύτερης φυγοκέντρησης, πραγματοποιούνται υπολογισμοί για το τελικό προϊόν PRP. Κάθε μονάδα PRP είναι επιθυμητό να έχει τελικό όγκο 5 με 6 ml. Οπότε από το βάρος του ασκού του πλάσματος που βρέθηκε στο 3.1.6 αφαιρείται το απόβαρο του ασκού (μείον 32gr περίπου) και κατόπιν αφαιρείται ο τελικός επιθυμητός όγκος (μείον 5 με 6 ml). Ο αριθμός από το αποτέλεσμα αυτής της αφαίρεσης είναι και τα ml που θα αφαιρεθούν στο τέλος.

Παράδειγμα: Ασκός πλάσματος των 100gr, στο τέλος πρέπει να μείνει όγκος 6ml, το απόβαρο του ασκού είναι 32gr. Τότε, υπολογίζεται ο όγκος του πλάσματος που πρέπει να αφαιρεθεί για να μείνουν στο τέλος μόνο 6ml μέσα στον ασκό: $100 - 6 - 32 = 62\text{ml}$ πλάσματος πρέπει να αφαιρεθούν για να περισσέψουν μόνο 6ml μέσα στον ασκό.

3.2.8 Δεύτερο extraction

Μεταφέρονται πάλι προσεκτικά τα baskets στον πάγκο σε δεύτερο plasma extractor (Auto volume expessor) (εικ. 25) και αφαιρείται με την ίδια διαδικασία όπως και στο πρώτο extraction ο ασκός από τα baskets και τοποθετείται στον plasma extractor. Το έμβολο ελευθερώνεται να πιέσει προσεκτικά τον ασκό. Αφαιρείται ο αέρας που υπάρχει στην κορυφή του ασκού με σύριγγα και βελόνα, και τέλος αφαιρείται ο όγκος πλάσματος που υπολογίστηκε με βελόνες και σύριγγες οι οποίες απορρίπτονται με όλο το δείγμα που αναροφούν.



Εικόνα 25 - Auto volume plasma extractor

3.2.9 Τελευταίες μετρήσεις και αξιολόγηση του Platelet Rich Plasma

Μόλις αφαιρεθεί όλο το πλάσμα που από τον ασκό ώστε να έχει μείνει μέσα σε αυτό μόνο ο μικρός επιθυμητός όγκος πλάσματος που αποτελεί το PRP (εικ. 26), αφαιρείται ο ασκός από τον plasma extractor και ανακινείται όσο πιο καλά γίνεται. Με μία σύριγγα και βελόνα λαμβάνεται ολόκληρο το περιεχόμενο του ασκού και καταγράφεται ο τελικός όγκος του προϊόντος με τις ενδείξεις της σύριγγας. Όλο το υλικό ξανά μεταφέρεται μέσα στον ασκό και με την ίδια σύριγγα και βελόνα λαμβάνεται ελάχιστο δείγμα για γενική αίματος. Ο ασκός ζυγίζεται. Οι παράμετροι και τα όρια αναφοράς που χαρακτηρίζουν ένα σωστό PRP είναι: λιγότερα από 0,5 WBCs/μl, λιγότερα από 0,1 RBCs/μl, ανάκτηση αιμοπεταλίων πάνω από 40% και συγκέντρωση αιμοπεταλίων πάνω από 800×10^3 PLTs/μl και απόλυτο αριθμό αιμοπεταλίων πάνω από 4000×10^6 PLTs. Αυτό το τελικό προϊόν λέγεται PRP (Platelet Rich Plasma).

Κάθε PRP που παρασκευαζόταν, αποθηκεύονταν στους -20°C .



Εικόνα 26 – ασκός με 5ml PRP μετά το δεύτερο extraction

Προσοχή: Κατά την μέτρηση του τελευταίου δείγματος, ήταν πολύ πιθανό ο αναλυτής να έβγαζε μήνυμα over στην συγκέντρωση αιμοπεταλίων. Αυτό συνέβαινε επειδή η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ήταν εξαιρετικά μεγάλη για να μπορέσει ο αναλυτής να δώσει αριθμητικό αποτέλεσμα. Σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιούνταν αραιώση 1:2 στο δείγμα. 100μl από το δείγμα μεταφέρονταν σε καθαρό πλαστικό σωληνάριο για και αραιωνόταν με άλλα 100μl PBS 10%. Μετά από καλή ανάδευση του δείγματος, στο αραιωμένο δείγμα πραγματοποιούνταν γενική αίματος και το αποτέλεσμα που έβγαζε ο αναλυτής για την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων πολλαπλασιαζόταν με το 2 (εφόσον η αραιώση ήταν 1:2) για να προσδιορίσουμε την αληθινή συγκέντρωση των αιμοπεταλίων του PRP.

3.2.10 Pool των μονάδων Platelet Rich Plasma.

Από τις πρώτες 12 μονάδες PRP και οι επόμενες 10, μεταφέρθηκαν ολόκληρα τα περιεχόμενα τους σε δύο νέους καθαρούς ασκούς (χωρίς αντιπηκτικό) με την βοήθεια βελόνας και σύριγγας (εικ. 17). Από αυτούς τους ασκούς λήφθηκε δείγμα και μετρήθηκαν τα βάρη τους. Με την ίδια

διαδικασία όπως παραπάνω επαναλήφθηκαν τα βήματα από την δεύτερη φυγοκέντρηση και μετά για τον κάθε ασκό. Αυτή τη φορά ο επιθυμητός τελικός όγκος των Pooled ασκών είναι 10ml.

Μετρήθηκε το τελικό προϊόν για όγκο, βάρος και λήφθηκε δείγμα για γενική αίματος όπως περιγράφηκε και προηγουμένως. Τέλος αυτές οι μονάδες αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Επειδή το PRP ήταν εξαιρετικά πυκνό σε αιμοπετάλια πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων. Δηλαδή 100μl από το PRP αραιώθηκαν σε 900μl PBS 10% και εφόσον αναμείχθηκαν καλά πραγματοποιήθηκε γενική αίματος στο αραιωμένο δείγμα. Το αποτέλεσμα πολλαπλασιάστηκε με το 10 για τον προσδιορισμό της πραγματικής συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων. Σε αυτή την περίπτωση, η αραιώση 1:2 ήταν ανώφελη εφόσον η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ήταν τόσο μεγάλη ώστε ο αναλυτής να βγάζει μήνυμα over.

3.3 Μέθοδος παρασκευής Platelet Rich Plasma από περιφερικό αίμα ενήλικου ανθρώπου.

Οι μονάδες περιφερικού αίματος ή PBUs (Peripheral Blood Units) οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή PRP ήταν ήδη pooled (εικ. 27) από άγνωστο αριθμό αρχικών μονάδων αίματος και με άγνωστα στοιχεία όσο αφορά τις αρχικές συγκεντρώσεις των αιμοπεταλίων και των συνολικών όγκων του αίματος των μονάδων.

Αυτές οι μονάδες αίματος αποτελούσαν ασκούς με πλάσμα σε όγκους 48 και 47ml. Για την παρασκευή PRP από αυτές τις μονάδες το μόνο που απαιτούνταν ήταν να πραγματοποιηθεί η ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για τις pooled CBUs με τους ίδιους τελικούς επιθυμητούς όγκους.

Και για τις δύο αυτές μονάδες PRP χρειάστηκε να αραιωθεί το δείγμα στο τέλος, όπως περιγράφηκε παραπάνω για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων.

Πίνακας 2 - Χαρακτηριστικά μονάδων περιφερικού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή PRP

PBUs	PLTs (*10 ³ /μl)	Βάρος (gr)	Όγκος(ml)	Απόλυτος αριθμός PLTs (*10 ⁶)	Ομάδα αίματος
PB1	555	81	48	26640	B+
PB2	520	80	47	24440	A2+



Εικόνα 27 - PRP Pooled μονάδες. Δεξιά και αριστερά: PB Pooled PRP. Στο κέντρο: το Pool των πρώτων 12 CBU PRP.

3.4: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο PL

Υλικά και εξοπλισμός:

- Φασματόμετρο NanoDrop Lite (Thermo Scientific)
- Υδατόλουτρο
- Απορροφητικές πετσέτες
- UCPL
- PBPL

Διαδικασία: Οι Pooled μονάδες PRP εφόσον αποθηκεύτηκαν στους -20°C, λύθηκαν οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων και σχηματίστηκε το PL. Τα UCPL και PBPL εφόσον ξεπαγώθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C, μεταφέρθηκαν για μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε φασματόμετρο NanoDrop Lite. Τοποθετήθηκε πρώτα το PBPL και πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το UCPL και πραγματοποιήθηκαν άλλες τρεις μετρήσεις. Για την κάθε μέτρηση απαιτούνταν μια μικρή σταγόνα λίγων μl από το UCPL και PBPL. Μετά από κάθε μέτρηση και πριν από την επόμενη μέτρηση, η σταγόνα με το PL που είχε μετρηθεί,

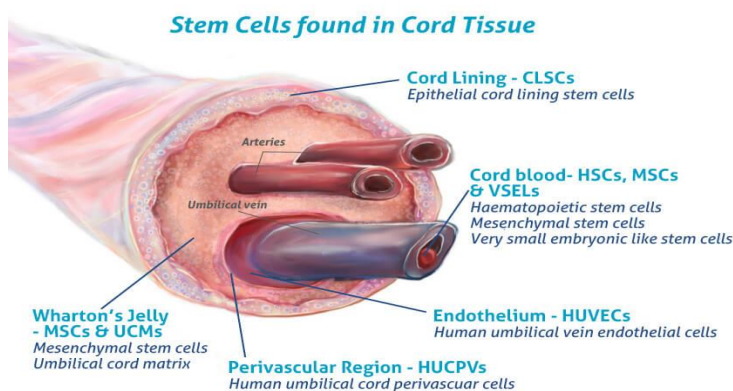
σκουπιζόταν με ένα κομμάτι απορροφητικής πετσέτας ώστε να μην επηρεαστούν οι επόμενες μετρήσεις.

Κεφάλαιο 4: Καλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων από βαρτόναιο γέλη

4.1 Πηγή WJ-MSCs

Για την δεύτερη σειρά πειραμάτων απαιτούνταν η απομόνωση και η καλλιέργεια μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων βαρτονείου γέλης ή WJ-MSCs (Walton's Jelly mesenchymal stromal cells).

Εάν κοπεί ο ομφάλιος λώρος σε εγκάρσια τομή, τότε ο ιστός που βρίσκεται γύρο από τις αρτηρίες και την φλέβα αλλά και γενικά ο ιστός που βρίσκεται μεταξύ των αρτηριών και της φλέβας αποτελεί την βαρτόναιο γέλη (Εικ. 28). Αυτός ο ιστός είναι πλούσιος σε MSCs.



Εικόνα 28 - Εγκάρσια τομή ομφαλίου λώρου.

Πηγή: <https://cells4life.com/2016/08/umbilical-cord-tissue-stem-cells-more-valuable-than-you-think/>

Οι ομφάλιοι λώροι που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούσαν δωρεές μαζί με τις CBU's στην ΕΛΤΟΠΑ. Οι ομφάλιοι λώροι βρισκότουσαν μέσα σε σωλήνα προπυλενίου falcon των 50ml.

4.2 Απομόνωση WJ-MSCs

Υλικά και εξοπλισμός:

- Κλίβανος αποστείρωσης (Techno-Gaz)
- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Χειρουργικές λαβίδες και ψαλίδια
- σωλήνες προπυλενίου falcon 50ml (BD, Biosciences)
- Τριβλία Petri (Corning)
- 6-well (Corning)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- PBS 10%

- Θρεπτικό υλικό 20%



Εικόνα 29 - Ομφάλιος λώρος πριν την απομόνωση της βαρτοννείας γέλης.

Διαδικασία απομόνωσης: Όλη η διαδικασία πραγματοποιούνταν μέσα σε βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τοποθετηθεί μέσα στον βιολογικό θάλαμο πριν την έναρξη της διαδικασίας της απομόνωσης. Αρχικά πραγματοποιούνταν η προσθήκη 10 με 15ml PBS 10% σε ένα άδειο σωλήνα προπυλενίου falcon των 50 ml. Από τον σωλήνα προπυλενίου falcon το οποίο περιείχε τον ομφάλιο λώρο, με τη βοήθεια χειρουργικής λαβίδας και ψαλιδιού απομονώνονταν ένα μικρό κομμάτι του ομφαλίου λώρου, το οποίο στη συνέχεια τοποθετούνταν μέσα στον σωλήνα προπυλενίου falcon με το PBS 10% για πλύσιμο. Το πλύσιμο πραγματοποιούνταν αφού σφραγιζόταν ο σωλήνα προπυλενίου falcon με το καπάκι του και ανακινούνταν καλά. Ύστερα, το κομμάτι αυτό του ομφαλίου τοποθετούνταν σε ένα στείρο τριβλίο Petri (εικ. 29) όπου με την βοήθεια χειρουργικών λαβίδων απομονώνονταν η βαρτόνειας γέλη από τα σημεία που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μόλις

απομονώνονταν μια ικανοποιητική ποσότητα βαρτοννείου γέλης, αυτή τεμαχιζόταν με την βοήθεια ψαλιδιού και τα κομμάτια της τοποθετούνταν μέσα σε 6-well. Συνολικά 8 με 10 κομμάτια τοποθετούνταν σε κάθε well. Τέλος, στα 6-well προστέθηκε θρεπτικό υλικό 20% με την βοήθεια πιπέτας των 10ml. Σε κάθε well προστίθονταν 1 με 1,5ml θρεπτικού υλικού 20%.

Τα 6-well παρέμεναν σε επωαστικό κλίβανο σε στους 37°C με 5% CO₂ για 18 ημέρες μέχρι την ανακαλλιέργεια τους σε φλάσκες.

Όλα τα χειρουργικά εργαλεία ήταν αποστειρωμένα από κλίβανο σε πρόγραμμα 134°C για 30 λεπτά.

4.2.1 Πλύσιμο MSCs στα 6-well

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- Τριβλία Petri (Corning)
- PBS 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%

Διαδικασία: Μετά από 10 ημέρες επώασης των MSCs Στα 6-well, γινόταν πλύσιμο των κυττάρων και αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Εφόσον τα 6-well μεταφέρονταν στον βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής, απορρίπτονταν το περιεχόμενο τους (θρεπτικό υλικό) σε ένα στείρο τριβλίο Petri. Με την βοήθεια πιπέτας των 10ml, πραγματοποιούνταν η προσθήκη 1ml PBS 10% σε κάθε well. Τα 6-well ανακινούνταν ώστε να απλωθεί το PBS σε όλη την επιφάνεια. Το PBS το πολύ μετά από 1 λεπτό απορρίπτονταν στο τριβλίο. Με την βοήθεια πιπέτας των 10ml, πραγματοποιούνταν η προσθήκη 1 με 1,5 ml θρεπτικού υλικού σε κάθε well. Τα 6-well μεταφερόντουσαν ξανά στον επωαστικό θάλαμο σε 37°C με 5% CO₂ για άλλες 8 μέρες μέχρι την ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε φλάσκες.

4.3 Ανακαλλιέργεια των WJ-MSCs

4.3.1 Ανακαλλιέργεια από 6-well σε φλάσκα

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)

- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25 και 75 cm² με φίλτρο (TPP)
- Τριβλία Petri (Corning)
- Αυτόματη πιπέτα 100-10000μl
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco)
- PBS 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%

Μετά από 18 ημέρες επώασης των κυττάρων στα 6-well γινόταν ανακαλλιέργεια (passage) σε φλάσκες. Τα 6-well παρατηρούνταν σε οπτικό μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί εάν τα κύτταρα είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια του κάθε well. Εάν σε κανένα από τα wells ενός 6-well δεν παρατηρούνταν ανάπτυξη κυττάρων, τότε το 6-well αυτό απορρίπτονταν. Εάν παρατηρούνταν πλήρης ανάπτυξη των κυττάρων και κάλυψη όλης της επιφάνειας σε 1 ή 2 well ενός 6-well, τότε πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια σε φλάσκα των 25 cm². Εάν παρατηρούνταν πλήρης ανάπτυξη των κυττάρων και κάλυψη όλης της επιφάνειας σε 3 ως 6 wells ενός 6-well, τότε γινόταν ανακαλλιέργεια σε φλάσκα των 75 cm².

Διαδικασία: Τα 6-well μεταφέρονταν στον βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής. Το θρεπτικό υλικό απορρίπτονταν σε τριβλίο. Σε κάθε well πραγματοποιούνταν η προσθήκη PBS 10% 1ml με την βοήθεια πιπέτας των 10ml. Τα 6-well ανακινούνταν ώστε να απλωθεί το PBS σε όλη την επιφάνεια. Το PBS, το πολύ μετά από 1 λεπτό, απορρίπτονταν και με την χρήση πιπέτας γινόταν η συλλογή και η απόρριψη κάθε σταγόνας PBS από κάθε well. Ύστερα, με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας των 100-1000 μl γινόταν η προσθήκη 300 με 400 μl θρυψίνης-EDTA σε κάθε well. Τα 6-well μεταφέρονταν στον επωαστικό κλίβανο σε 37°C με 5% CO₂ για 10 λεπτά. Μετά από 10 λεπτά πραγματοποιούνταν παρατήρηση των wells στο οπτικό μικροσκόπιο. Εάν τα κύτταρα είχαν ξεκολλήσει θα φαινότουσαν να κινούνται μέσα στο διάλυμα θρυψίνης-EDTA. Στη συνέχεια, τα 6-well μεταφέρονταν στον βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής ξανά. Σε κάθε well, με την βοήθεια πιπέτας των 10ml, μεταφέρονταν τουλάχιστον 1 ml θρεπτικού υλικού 20% ώστε να γίνει η αδρανοποίηση της θρυψίνης. Από κάθε well, συλλέγονταν όλο το διάλυμα θρεπτικού υλικού και αδειάζονταν ξανά στο ίδιο well ώστε να ξεπλυθεί η πλαστική επιφάνεια του well για να ξεκολλήσουν τυχόν κύτταρα που έχουν παραμείνει προσκολλημένα σε αυτή. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβανόταν δύο με τρεις φορές. Το θρεπτικό υλικό από το ένα well μεταφέρονταν στο επόμενο και το ξέπλυμα επαναλαμβανόταν. Τέλος, όλο το θρεπτικό υλικό από τα well μεταφέρονταν στις φλάσκες και γινόταν επιπλέον προσθήκη θρεπτικού υλικού ανάλογα με την χωρητικότητα της φλάσκας (Πιν. 3). Πριν την τοποθέτηση της φλάσκας στον

επωαστικό κλίβανο, πραγματοποιούνταν η παρατήρηση της στο μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί ότι τα κύτταρα έχουν μεταφερθεί σε αυτή.



Εικόνα 30 - Φλάσκες TPP με φίλτρο (25cm^2 με πορτοκαλί καπάκι, 75cm^2 με κίτρινο καπάκι) που περιέχουν τις κατάλληλες ποσότητες θρεπτικού υλικού μετά από ανακαλλιέργεια WJ-MSCs από 6-well.

Πίνακας 3 - Ποσότητες διαλυμάτων (θρεπτικού υλικού, PBS, θρυψίνης-EDTA) που χρησιμοποιούνται σε κάθε είδους φλάσκα.

Τύπος Φλάσκας	Ποσότητα Θρεπτικού υλικού 20%	Ποσότητα PBS 10%	Ποσότητα Trypsin-EDTA
6-well	1-1,5ml	1ml	300-400μl
25cm^2	7-8ml	2-3ml	2ml
75cm^2	14ml	8-10ml	3-4ml
175cm^2	25-30ml	10-15ml	7-8ml

4.3.2 Ανακαλλιέργεια από φλάσκα σε φλάσκα

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 75 και 175 cm^2 με φίλτρο (TPP)
- Πιπέτες 10 και 25ml (Sarstedt)

- 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco)
- PBS 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%

Διαδικασία: Μετά από μερικές ημέρες τα κύτταρα είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Οπότε ήταν αναγκαίο να γίνει η δεύτερη ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερες ή περισσότερες φλάσκες. Αρχικά οι φλάσκες τοποθετούνταν όρθιες στον βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής και με την βοήθεια πιπέτας αφαιρούνταν όλη η ποσότητα του θρεπτικού υλικού (μια πιπέτα για κάθε φλάσκα). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν η προσθήκη ποσότητας PBS 10% ανάλογα με τον τύπο της φλάσκας (Πίν. 3). Οι φλάσκες τοποθετούνταν σε ξαπλωμένη θέση και ανακινούνταν ώστε να απλωθεί το PBS σε όλη την επιφάνεια. Το PBS το πολύ μετά από 1 λεπτό απορρίπτονταν και με την χρήση πιπέτας. Πραγματοποιούνταν η προσθήκη ποσότητας θρυψίνης-EDTA με την βοήθεια πιπέτας ανάλογα με τύπο της φλάσκας (Πίν. 3) και μεταφέρονταν στον επωαστικό κλίβανο για 10 λεπτά. Μετά από 10 λεπτά επιβεβαιωνόταν στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα είχαν ξεκολλήσει και οι φλάσκες τοποθετούνταν ξανά όρθιες μέσα στον βιολογικό θάλαμο. Με την βοήθεια πιπέτας πραγματοποιούνταν η προσθήκη θρεπτικού υλικού ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη. Κατά την προσθήκη του θρεπτικού υλικού, η πιπέτα είχε τέτοια κλίση ώστε το θρεπτικό υλικό να πέφτει πάνω στην επιφάνεια όπου αναπτύσσονταν τα κύτταρα για να παρασύρει και να ξεκολλήσει τυχόν κύτταρα που ήταν ακόμα προσκολλημένα. Τέλος, όλο το θρεπτικό υλικό μεταφέρονταν από την μία φλάσκα στην καινούρια και γινόταν επιπλέον προσθήκη θρεπτικού υλικού ανάλογα με τον τύπο της νέας φλάσκας (Πίν. 3). Πριν η νέα φλάσκα μεταφερόταν στον επωαστικό κλίβανο, γινόταν επιβεβαίωση στο μικροσκόπιο ότι όλα τα κύτταρα είχαν μεταφερθεί σε αυτή.

Στις περιπτώσεις όπου γινόταν ανακαλλιέργεια από μία φλάσκα σε δύο ή τρεις καινούριες, τότε, μετά την επώαση της παλιάς φλάσκας με την θρυψίνη, πραγματοποιούνταν η προσθήκη του θρεπτικού υλικού όπως περιγράφηκε παραπάνω και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό μοιραζόταν σε ίσα ποσά στις νέες φλάσκες.

4.3.3 Πλύσιμο των MSCs στις φλάσκες.

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Πιπέτες 10 και 25ml (Sarstedt)
- PBS 10%

- Θρεπτικό υλικό 20%

Διαδικασία: Σε περιπτώσεις όπου τα κύτταρα καθυστερούσαν να αναπτυχθούν σε όλη την επιφάνεια της φλάσκας ή σε περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατή η ανακαλλιέργεια, πραγματοποιούνταν πλύσιμο της φλάσκας και αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Μέσα σε βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής, οι φλάσκες τοποθετούνταν σε όρθια θέση. Με την βοήθεια πιπέτας αφαιρούνταν και απορρίπτονταν όλο το θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν η προσθήκη ποσότητας PBS 10% ανάλογα με τον τύπο της φλάσκας (Πίν. 3) με την βοήθεια πιπέτας. Οι φλάσκες τοποθετούνταν σε ξαπλωτή θέση και ανακινούνταν ώστε το PBS να καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Το PBS αφαιρούνταν και απορρίπτονταν όλο με την βοήθεια πιπέτας και τέλος, πραγματοποιούνταν προσθήκη εκ νέου ποσότητας θρεπτικού υλικού ανάλογα με τον τύπο της φλάσκας (Πίν. 3). Οι φλάσκες μεταφέρονταν ξανά στον επωαστικό κλίβανο σε 37°C με 5% CO₂.

Κεφάλαιο 5: Μέτρηση και κυτταρομετρία ροής των WJ-MSCs

5.1 trypsinisation WJ-MSCs

Το trypsinization αποτελεί μια διαδικασία όπου τα κύτταρα ξεκολλάνε από τις φλάσκες με σκοπό να καταμετρηθούν και να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω πειράματα.

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Φυγόκεντρος
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)
- Αυτόματη πιπέτα 2-200μl
- Πιπέτες 10 και 25ml (Sarstedt)
- σωλήνες προπυλενίου falcon tubes 50ml (BD, Biosciences)
- Cryotubes (BD, Biosciences)
- Φλάσκες με WJ-MSCs
- 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco)
- PBS 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%

Διαδικασία: Εφόσον επιβεβαιωνόταν ότι τα κύτταρα είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας, αυτές τοποθετούνταν όρθιες μέσα στον βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής και με την βοήθεια πιπέτας αφαιρούταν όλο το θρεπτικό υλικό και απορρίπτονταν. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν η προσθήκη ποσότητας PBS 10% ανάλογα με τον τύπο της φλάσκας (Πίν. 2) με την βοήθεια πιπέτας. Οι φλάσκες τοποθετούνταν σε ξαπλωτή θέση και ανακινούνταν ώστε το PBS να καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Το PBS αφαιρούταν και απορρίπτονταν όλο με την βοήθεια πιπέτας. Στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα θρυψίνης-EDTA ανάλογα με τον τύπο της φλάσκας (Πίν. 2). Οι φλάσκες τοποθετούνταν στον επωαστικό κλίβανο για 10 λεπτά για να αποκολλήσουν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 10 λεπτά, επιβεβαιωνόταν στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα έχουν ξεκολλήσει και προστέθηκαν 30ml PBS 10% σε κάθε φλάσκα. Όλο το περιεχόμενο από κάθε φλάσκα μεταφέρθηκε σε σωλήνα

προπυλενίου falcon των 50ml και φυγοκεντρήθηκαν στα 500g για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα ήταν ορατά με γυμνό μάτι στο κάτω μέρος του σωλήνα προπυλενίου falcon. Τέλος, έγινε ανασύσταση των κυττάρων με 1 ή 2 ml θρεπτικό υλικό 20% και αυτά ήταν έτοιμα για περαιτέρω χρήση. 50μl συλλέχθηκαν σε cryotube από τους σωλήνα προπυλενίου falcon για προσδιορισμό της συγκέντρωσης των MSCs, εφόσον αυτά είχαν ανακινηθεί για να μοιραστούν ομοιόμορφα τα κύτταρα σε όλο το διάλυμα.

Όλα τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε trypsinization, προέρχονταν από φλάσκες 175cm^2

5.2 μέτρηση κυττάρων και προσδιορισμός ζωτικότητας

Υλικά και εξοπλισμός:

- Αυτόματο κυτταρόμετρο Countess II (Thermo Fisher Scientific)
- Cell counting chamber slides Countess II (Thermo Fisher Scientific)
- Cryotubes (BD, Biosciences)
- Αυτόματη πιπέτες 2-20μl
- Trypan blue solution

Διαδικασία: Εφόσον τα κύτταρα είχαν αποκολληθεί με την παραπάνω διαδικασία και είχε συλλεχθεί δείγμα μικρή ποσότητα κυττάρων με θρεπτικό υλικό σε cryotube, τότε ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τους. Σε ένα καθαρό cryotube μεταφέρονταν 10μl δείγματος και 10μl trypanblue με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας. Το μίγμα αυτό αναδεύονταν καλά με διαδοχικά πιπεταρίσματα ώστε η χρωστική και το δείγμα να αναμειχθούν ομοιόμορφα. Στη συνέχεια 10μl από αυτό το δείγμα τοποθετούνταν σε μία από τις εσοχές ενός cell counting chamber slide, το οποίο με τη σειρά του τοποθετούνταν στο αυτόματο κυτταρόμετρο. Με αυτό τον τρόπο προσδιοριζόταν η συγκέντρωση των κυττάρων καθώς και το ποσοστό της ζωτικότητας.

Προσοχή: το αποτέλεσμα της συγκέντρωσης ήταν σε κύτταρα ανα ml. Εάν η ανασύσταση είχε γίνει με διαφορετικό όγκο από 1ml, τότε το αποτέλεσμα πρέπει να διαιρεθεί για να υπολογίσουμε την πραγματική συγκέντρωση.

5.3 Κυτταρομετρία ροής

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να χαρακτηριστούν τα κύτταρα ως προς του δείκτες των MSCs.

Υλικά και εξοπλισμός:

- Κυτταρόμετρο (Beckman Coulter) (Εικ. 31)
- Φυγόκεντρος
- Δοκιμασικά σωληνάρια
- Αυτόματη πιπέτα 2-20μl
- PBS 1X
- CD90-FITC (Beckman Coulter)
- ABC-FITC (Beckman Coulter)
- CD29-FITC (Beckman Coulter)
- CD19-FITC (Beckman Coulter)
- CD31-FITC (Beckman Coulter)
- CD45-FITC (Beckman Coulter)
- CD105-PE (Beckman Coulter)
- CD73-PE (Beckman Coulter)
- CD44-PE (Beckman Coulter)
- CD3-PE (Beckman Coulter)
- CD14-PC5 (Beckman Coulter)
- HLA-DR-PC5 (Beckman Coulter)



Εικόνα 31 - Κυτταρόμετρο beckman coulter

Διαδικασία: Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής, είχαν προηγουμένως μετρηθεί ως προς την συγκέντρωσή τους με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Εφόσον είχε γίνει ανασύσταση των κυττάρων με θρεπτικό υλικό μετά το trypsinization, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε 7 δοκιμαστικούς σωλήνες. Προστέθηκαν 1ml κυττάρων με θρεπτικό υλικό σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Το πρώτο σωληνάριο περιείχε μόνο το 1ml κυττάρων με το θρεπτικό υλικό και καθόλου αντισώματα. Στα υπόλοιπα μαζί με το 1ml των κυττάρων με το 1ml προστέθηκαν επίσης μικρή ποσότητα από αντισώματα (Πίν. 4). Όλα τα σωληνάρια επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό χώρο. Μετά το πέρας της επώασης, προστέθηκαν 1ml PBS 1x σε κάθε σωληνάριο και στη συνέχεια τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν στα 500g για 5 λεπτά. Μόλις τελείωσε η φυγοκέντρωση το

υπερκείμενο απορρίφθηκε από κάθε σωληνάριο και έγινε ανασύσταση των κυττάρων με την επιπλέον προσθήκη 1ml PBS 1X. Τέλος τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στο καρουσέλ του κυτταρόμετρου όπου και πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός των κυττάρων ως προς του MSCs δείκτες.

Πίνακας 4 - Σωληνάρια με WJ-MSCs και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής.

Σωληνάριο	MSCs	1ο αντίσωμα	2ο αντίσωμα
1	NAI	ΌΧΙ	ΌΧΙ
2	NAI	CD90-FITC 20μl	CD105-PE 20μl
3	NAI	ABC-FITC 20μl	CD73-PE 20μl
4	NAI	CD29-FITC 20μl	CD44-PE 20μl
5	NAI	CD19-FITC 20μl	CD3-PE 20μl
6	NAI	CD31-FITC 20μl	CD14-PC5 20μl
7	NAI	CD45-FITC 20μl	HLA-DR-PC5 20μl

Κεφάλαιο 6: Οι τρεις συνθήκες, εφαρμογή του Platelet Rich Plasma στις κυτταροκαλλιέργειες των WJ-MSCs

Για αυτή την σειρά πειραμάτων, δημιουργήθηκαν τρεις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων παρουσία PL medium και γέλης αιμοπεταλίων προερχόμενη είτε από περιφερικό είτε από ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Σκοπός ήταν να μελετηθεί πως επηρεάζεται η ανάπτυξη των WJ-MSCs παρουσία αυτών των μέσων.

6.1 Α' Συνθήκη: WJ-MSCs + PL medium

Σε αυτή την συνθήκη τα WJ-MSCs 3ης ανακαλλιέργειας, μεταφέρθηκαν σε δύο 6-well στα οποία εφαρμόσθηκε η προσθήκη του PL medium

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)
- 6-well (Corning)
- Τριβλία Petri (Corning)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- PBS 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%
- α-MEM 500ml (Gibco)
- UCPL medium
- PBPL medium

Διαδικασία: Σε κύτταρα τα οποία είχαν αποκολληθεί από φλάσκες μετά από trypsinization, έγινε η ανασύσταση τους με θρεπτικό υλικό 2ml και προσδιορίσθηκε η συγκέντρωση τους όπως περιγράφεται παραπάνω. Στον σωλήνα προπυλενίου falcon όπου έγινε η ανασύσταση προστέθηκε επιπλέον θρεπτικό υλικό 20% ώστε να είναι αρκετό για να μοιρασθεί σε 2 6-well με την βοήθεια πιπέτας (βλέπε πίν. 3 για ποσότητα θρεπτικού υλικού σε κάθε well). Έπειτα, επιβεβαιώθηκε ότι τα κύτταρα είχαν περάσει στα 6-well μετά από παρατήρηση των wells

στο μικροσκόπιο. Τα 2 6-well τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂ για μία ημέρα.

Την επόμενη ημέρα παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια των wells. Πάνω σε κάθε 6-well σημειώθηκαν δύο wells τα οποία θα χρησίμευαν ως δείγματα αναφοράς. Τα 6-well μεταφέρθηκαν μέσα στον βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής όπου απορρίφθηκε το θρεπτικό τους υλικό. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml α-MEM στο well των κυττάρων του θετικού δείγματος αναφοράς του κάθε 6-well και 1 ml θρεπτικό υλικό 20% στο well των κυττάρων του αρνητικού control του κάθε 6-well. Στη συνέχεια στα υπόλοιπα wells του ενός 6-well, προστέθηκε από 1ml PBPL medium και στα υπόλοιπα wells του άλλου 6-well προστέθηκε 1ml UCPL medium (Εικ 32). Τα δύο 6-well τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂. Καθημερινά πραγματοποιούνταν η λήψη



Εικόνα 32 - δύο 6-well όπου τα WJ-MSCs αναπτύσσονται παρουσία PBPL medium (επάνω) και UCPL medium (Κάτω). Κάθε 6-well έχει δύο wells όπου χρησιμεύουν ως controls (φαίνοντα διαχωρισμένα με μαρκαδόρο στην εικόνα).

φωτογραφιών με την βοήθεια κάμερας που τοποθετούνταν στο μικροσκόπιο και λογισμικού IC Capture.

6.2 Β' Συνθήκη: WJ-MSCs + PLGEL

Σε αυτή την συνθήκη τα WJ-MSCs καλλιεργήθηκαν μέσα σε 6-well όπου στην συνέχεια προστέθηκε το PL απο πάνω τους με γλυκονικό ασβέστιο για να δημιουργηθεί η γέλη.

6.2.1 πρώτη εφαρμογή Β' συνθήκης

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Υδατόλουτρο
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)
- 6-well (Corning)
- Τριβλία Petri (Corning)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- Σύριγγες 10ml
- Βελόνες 21G
- Σύστημα φιλτραρίσματος σύριγγας 0.45 και 0,20 μm (Corning)
- PBS 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%
- α -MEM 500ml (Gibco)
- Γλυκονικό ασβέστιο 10%
- UCPL
- PBPL

Διαδικασία: Σε κύτταρα 3ης ανακαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε trypsinization και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τους. Στα κύτταρα αυτά έγινε ανασύσταση με 2ml θρεπτικού υλικού 20% και στην συνέχεια προστέθηκε επιπλέον θρεπτικό υλικό σε κατάλληλη ποσότητα για να μοιρασθεί σε δύο 6-well. Επιβεβαιώθηκε ότι τα κύτταρα είχαν περάσει στα 6-well μετά από παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO για μια ημέρα.

Την επόμενη ημέρα παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια των wells. Πάνω σε κάθε 6-well, σημειώθηκαν δύο wells τα οποία θα χρησίμευαν ως δείγματα αναφοράς. Τα 6-well μεταφέρθηκαν μέσα στον βιολογικό θάλαμο

νηματικής ροής όπου απορρίφθηκε το θρεπτικό τους υλικό. Στη συνέχεια προστέθηκε 1ml α-MEM στο well των κυττάρων του θετικού δείγματος αναφοράς του κάθε 6-well και 1ml θρεπτικό υλικό 20% στο well των κυττάρων του αρνητικού δείγματος αναφοράς του κάθε 6-well. Στη συνέχεια, εφόσον τα UCPL και PBPL ξεπαγώθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C και συλλέχθηκαν με σύριγγα και βελόνα. Από την σύριγγα αφαιρέθηκε η βελόνα και τοποθετήθηκε το φίλτρο. Σκοπός ήταν να φιλτραριστεί 1ml PL στα υπόλοιπα wells. Το φιλτράρισμα ήταν εξαιρετικά δύσκολο καθώς τα φίλτρα βουλώνανε αμέσως. Για αυτό τον λόγο το PL προστέθηκε αυτούσιο στα υπόλοιπα wells. Στο ένα 6-well προστέθηκε PBPL και στο άλλο UCPL. Τέλος σε όλα τα wells όπου είχε γίνει η προσθήκη PL, έγινε επιπλέον προσθήκη 0,5ml γλυκονικού ασβεστίου με σκοπό να δημιουργηθεί η γέλη. Οπότε, στο ένα 6-well τα MSCs είχαν απο πάνω τους PBGEL και στο άλλο UCGEL (Εικ. 33). Τα 6-well τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂. Καθημερινά πραγματοποιούνταν η λήψη φωτογραφιών με την βοήθεια κάμερας που τοποθετούνταν στο μικροσκόπιο και λογισμικού IC Capture.

Το α-MEM μετά απο μία ημέρα αφαιρέθηκε και στην θέση του προστέθηκε

PBS10% ως θετικό δείγμα αναφοράς.



Εικόνα 33 - δύο 6-well όπου τα WJ-MSCs αναπτύσσονται παρουσία PBGEL (επάνω) και UCGEL (Κάτω). Κάθε 6-well έχει δύο wells όπου χρησιμεύουν ως controls (φαίνονται διαχωρισμένα με μαρκαδόρο στην εικόνα).

6.2.2 Δεύτερη εφαρμογή Β' συνθήκης

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)
- σωλήνα προπυλενίου falcon tubes 50ml (BD, Biosciences)
- 6-well (Corning)
- Τριβλία Petri (Corning)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- Σύριγγες 10ml
- Βελόνες 21G
- PBS 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%
- Γλυκονικό ασβέστιο 10%
- UCPL
- PBPL

Διαδικασία: Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στην πρώτη εφαρμογή της Β' συνθήκης. Κύτταρα 3ης ανακαλλιέργειας μετά από trypsinization έγινε η ανασύσταση τους σε 2ml θρεπτικού υλικού και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε δύο 6-well όπου και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂ για μία ημέρα.

Την επόμενη μέρα έγινε η απόρριψη του θρεπτικού υλικού και προστέθηκαν τα κατάλληλα υλικά σε κάθε δείγμα αναφοράς. Αυτή τη φορά στο θετικό δείγμα αναφοράς προστέθηκε κατευθείαν PBS 10%. Τα PBPL και UCPL ξεπαγώθηκαν στο υδατόλουτρο στους 37°C και μεταφέρθηκε όλο το περιεχόμενο τους σε έναν διαφορετικό σωλήνα προπυλενίου falcon των

50ml το κάθε ένα. Οι δύο σωλήνα προπυλενίου falcon φυγοκεντρήθηκαν στα 1800g για 10 λεπτά. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης, 1ml απο το υπερκείμενο του σωλήνα προπυλενίου falcon με το UCPL μεταφέρθηκε στα υπόλοιπα wells του ενός 6-well και 1ml από το υπερκείμενο του σωλήνα προπυλενίου falcon με το PBPL μεταφέρθηκε στα υπόλοιπα wells του δεύτερου 6-well. Σε όλα τα wells όπου είχε γίνει η προσθήκη PL, έγινε επιπλέον προσθήκη 0,5ml γλυκονικού ασβεστίου με σκοπό να δημιουργηθεί η γέλη. Όπως και την πρώτη φορά, έτσι και τώρα υπήρχαν δύο 6-well όπου στο ένα τα MSCs αναπτύσσονταν με PBGEL από πάνω τους και στο δεύτερο τα MSCs αναπτύσσονταν με UCGEL από πάνω τους. Καθημερινά πραγματοποιούνταν η λήψη φωτογραφιών από το μικροσκόπιο με το λογισμικό IC Capture.

6.3 Γ' Συνθήκη: PLGEL + WJ-MSCs

Σε αυτή την συνθήκη τα WJ-MSCs καλλιεργήθηκαν πάνω σε γέλη αιμοπεταλίων μέσα σε 6-wells και culture slides. Όπως και στις προηγούμενες συνθήκες, έτσι και εδώ, η γέλη προερχόταν απο PL περιφερικού και ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

6.3.1 Πρώτη εφαρμογή Γ' συνθήκης

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Υδατόλουτρο
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)
- 6-well (Corning)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- Σύριγγες 10ml
- Βελόνες 21G
- Σύστημα φιλτραρίσματος σύριγγας 0.45 και 0,20 μm (Corning)
- Γλυκονικό ασβέστιο 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%
- UCPL
- PBPL

Διαδικασία: Τα PBPL και UCPL ξεπαγώθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Συλλέχθηκε ποσότητα PBPL και UCPL με σύριγγα και βελόνα και δοκιμάστηκε να φιλτραριστεί στα 6-well. Εν τέλει, τα PL προστέθηκαν αυτούσια στα 6-well εφόσον τα φίλτρα βούλωναν αμέσως. Σε ένα 6-well προστέθηκε στα 3 wells 1ml PBPL, Σε ένα δεύτερο 6-well προστέθηκε στα 2 wells 1ml UCPL. Σε όλα τα wells που είχε γίνει προσθήκη PL, προστέθηκε επιπλέον ποσότητα 0,5ml γλυκονιού ασβεστίου 10% ώστε να σχηματιστεί η γέλη. Τα 6-well τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂ για μία ημέρα.

Την επόμενη ημέρα έγινε trypsinization σε MSCs 3ης ανακαλλιέργειας, και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους. Μετά από ανασύσταση με 2ml θρεπτικού υλικού 20%, τα MSCs αραιώθηκαν με επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού ώστε να προστεθούν στα 6-well. Τέλος, αυτά τα 6-well τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂. Καθημερινά πραγματοποιούνταν η λήψη φωτογραφιών από το μικροσκόπιο με κάμερα και λογισμικό IC Capture.

Σε αυτή την συνθήκη δεν χρησιμοποιήθηκαν controls. Όλα τα MSCs αναπτύσσονταν μέσα σε θρεπτικό υλικό 20% πάνω σε PBPG και UCPG. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο τρία wells από κάθε 6-well (Εικ. 34).



Εικόνα 34 - Δύο 6-well όπου τα WJ-MSCs αναπτύσσονται επάνω σε PBGEL (επάνω) και UCGEL (κάτω).

6.3.2 Δεύτερη εφαρμογή Γ' συνθήκης (culture slides)

Υλικά και εξοπλισμός:

- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Επωαστικός κλίβανος (Thermo Scientific)
- Υδατόλουτρο
- Οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMIL)
- Culture slides
- Αυτόματη πιπέτα 100-10000μl
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- Σύριγγες 10ml
- Βελόνες 21G
- Σύστημα φιλτραρίσματος σύριγγας 0.45 και 0,20 μm (Corning)
- Γλυκονικό ασβέστιο 10%
- Θρεπτικό υλικό 20%
- UCPL
- PBPL

Διαδικασία: Τα PBPL και UCPL ξεπαγώθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Συλλέχθηκε ποσότητα PBPL και UCPL με σύριγγα και βελόνα και δοκιμάστηκε να φιλτραριστεί στα 6-well. Εν τέλει, τα PL προστέθηκαν αυτούσια στα Culture slides εφόσον τα φίλτρα βούλωναν αμέσως. Σε δύο culture slides προστέθηκε 1ml PBPL και σε ένα culture slide προστέθηκε 1ml UCPL εξαιτίας απώλειας του υλικού. Έπειτα, σε αυτά τα culture slides προστέθηκε από 0,5ml γλυκονικού ασβεστίου για να σχηματιστεί η γέλη. Τα culture slides τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO για μία ημέρα.

Την επόμενη ημέρα, MSCs 3ης ανακαλλιέργειας υποβλήθηκαν σε trypsinization, προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους και πραγματοποιήθηκε ανασύσταση με 2ml θρεπτικού υλικού 20%.

Ο ιδανικός αριθμός κυττάρων σε κάθε slide ήταν 40000 MSCs. Μετρήθηκε η συγκέντρωση των κυττάρων και με βάση αυτά τα δεδομένα υπολογίστηκε ο όγκος των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού για κάθε slide. Άλλα τρία culture slides χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς, δύο αρνητικά (MSCs + θρεπτικό υλικό 20%) και ένα αρνητικό (MSCs + PBS 10%) (Εικ. 35).



Εικόνα 35 - Culture slides με WJ-MSCs στην Γ' συνθήκη (WJ-MSCs να αναπτύσσονται επάνω στην γέλη αιμοπεταλίων)

6.3.2.1 ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί και να αξιολογηθεί η ανάπτυξη των κυττάρων στην τρίτη συνθήκη εφόσον η αξιολόγηση της ανάπτυξης των κυττάρων ήταν αδύνατη με το οπτικό μικροσκόπιο.

Υλικά και εξοπλισμός:

- Μικροσκόπιο (Leica DMIRE)
- Βιολογικός θάλαμος (Bionair)
- Πιπέτες 10ml (Sarstedt)
- Αυτόματη πιπέτα 20-200μl
- PBS 10%

- Χρωστική DAPI
- Αντίσωμα με φθορίζουσα χρωστική FITC

Διαδικασία: Τα κύτταρα που αναπτύσσονταν για 2 ημέρες στα culture slides τοποθετήθηκαν μέσα στον βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής. Αφαιρέθηκε και απορρίφθηκε το θρεπτικό τους υλικό. Στα culture slides προστέθηκε χρωστική DAPI και αντίσωμα με φθορίζουσα χρωστική FITC αραιωμένα με PBS. Στη συνέχεια τα culture slides επώαστηκαν για 30 λεπτά. Στο τέλος της επώασης τα culture slides πλύθηκαν με PBS και μεταφέρθηκαν για μικροσκόπηση.

Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα μονάδων PRP

7.1 Αποτελέσματα μονάδων PRP προερχόμενο από ομφαλοπλακουντιακό αίμα.

Συνολικά, από τον Νοέμβριο ως τον Δεκέμβριο του 2019, 39 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή PRP. Καμία από αυτές τις μονάδες δεν συμπλήρωνε τα κριτήρια ώστε να μπορέσουν να επεξεργαστούν για την ανάπτυξη μοσχευμάτων για ασθενείς με αιματολογικά προβλήματα.

Πίνακας 5 - Αποδεκτά κριτήρια από την ΕΛ.Τ.ΟΠΑ. για την επεξεργασία προς μεταμόσχευση μιας μονάδας ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Κριτήρια	Μη συγγενική δωρεά	Συγγενική δωρεά
Μεικτό βάρος ασκού	120 – 280gr	100 – 220 gr
Απόλυτος αριθμός λευκοκυττάρων	120 – 250 x 10 ⁷ cells	100 – 250 x 10 ⁷ cells
Συγκέντρωση Λευκοκυττάρων	13 – 29.5 cells/μL	10 – 29.5 cells/μL
Ζωτικότητα κυττάρων	85 – 100%	85 – 100%

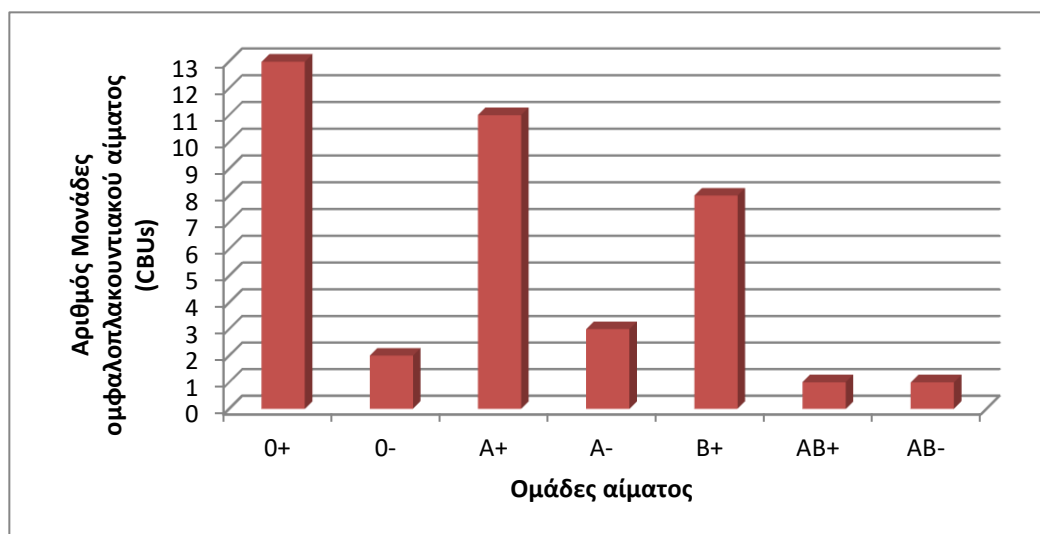
Από τις 39 μονάδες μόνο οι 8 (20,51%) μπόρεσαν να επεξεργαστούν αυτούσιες για την παραγωγή PRP. Οι υπόλοιπες, επειδή είχαν χαμηλό όγκο αίματος, ενώθηκαν ανά δύο ή τρεις μεταξύ τους για τον σχηματισμό μονάδων αίματος μεγαλύτερου όγκου οι οποίες μπορούσαν να επεξεργαστούν για τον σχηματισμό PRP. Συνολικά, από τις 39 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος παρασκευάστηκαν 22 μονάδες PRP.

Από τις 39 μονάδες, οι 8 ήταν ομάδας αίματος B+ (20,51%), οι 11 ήταν A+ (28,21%), οι τρεις ήταν A- (7,69%), οι 13 ήταν O+ (33,33%), οι 2 ήταν O- (5,13%), η μία ήταν AB+ (2,56%) και μία AB- (2,56%) (Διάγραμμα 1). Από τις 22 μονάδες PRP οι 5 ήταν B+ (22,73%), οι 6 ήταν A+(27,27%), οι 2 ήταν A- (9,09%), οι 7 ήταν O+ (31,82%), η μία ήταν O- (4,55%) και μία AB+ (4,55%). Από τις 22 μονάδες PRP μόνο οι 10 (45%) είχαν τελική ανάκτηση αιμοπεταλίων πάνω από 40% (Final recovery of PLTs) και μόνο οι 16 (72,73%) είχαν συγκέντρωση αιμοπεταλίων πάνω από 800*10⁶ PLTs/μl. Από αυτές τις 22 μονάδες PRP οι 18 (81,82%) είχαν απόλυτο αριθμό αιμοπεταλίων πάνω από 4000*10⁶. Όλες αυτές οι μονάδες είχαν όγκο από 5 ως 14 ml με μέσο όρο 7,83ml για τις πρώτες 12 μονάδες PRP και 5,6ml για τις επόμενες 10 μονάδες PRP.

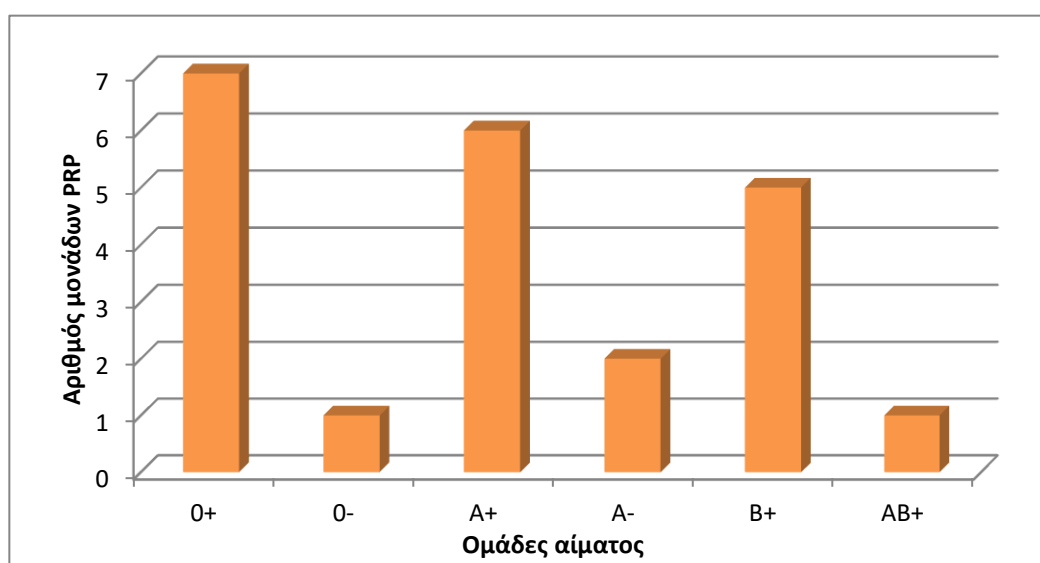
Οι πρώτες 12 μονάδες και οι επόμενες 10 μονάδες που έγιναν PRP ενώθηκαν όλες μαζί σε δύο pool. Οι συγκεντρώσεις και ο απόλυτος αριθμός των αιμοπεταλίων και στις δύο pooled μονάδες ήταν αρκετά υψηλότερος από τα όρια αναφοράς (Πίν. 12).

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται αναλυτικά όλες οι μετρήσεις κατά την επεξεργασία όλων των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την επεξεργασία του PRP. Συγκεκριμένα δίνονται οι μετρήσεις και τα χαρακτηριστικά του αίματος πριν την επεξεργασία (Πίν. 6,7), μετά

την πρώτη φυγοκέντρηση (Πιν 8,9) και τα χαρακτηριστικά και οι μετρήσεις των τελικών προϊόντων PRP (Πίν. 10,11).



Διάγραμμα 1 - Ομάδες αίματος στις μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος



Διάγραμμα 2 - Ομάδες αίματος στις μονάδες PRP

Πίνακας 6 - Χαρακτηριστικά των πρώτων 12 ομφαλοπλακουντιακών μονάδων πριν την επεξεργασία τους για την παρασκευή PRP. Στην στήλη CBUs είναι ο κωδικός των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού αίματος	Αιμοπετάλια ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Μεικτό βάρος (gr)	Καθαρό βάρος αίματος (gr)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων ($\times 10^6$)	Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	ABO
1	154	116	83	12782	5	B+
2	237	127	94	22278	12	A+
3	202	128	95	19190	12,8	A-
4	305	134	101	30805	10,1	O-
5	143	102	69	9867	10	A+
6	182	169	136	24752	10	O+
7	251	113	80	20080	9,9	O+
8	153	201	168	25704	8	A+
9	142	172	139	19738	10,1	O+
10	164	153	120	19680	9,8	O+
11	257	130	97	24929	10,8	B+
12	136	145	112	15232	9,9	O+
Μέσος όρος	193,8333	140,8333	107,8333	20419,75	9,866667	
Τυπική απόκλιση	55,95913	28,55563	28,55563	5858,791	1,938759	

Πίνακας 7 - Χαρακτηριστικά των επόμενων 10 μονάδων ομφαλοπλακουντιακών μονάδων πριν την επεξεργασία τους για την παρασκευή PRP. Στην στήλη CBUs είναι ο κωδικός των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού αίματος	Αιμοπετάλια ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Μεικτό βάρος (gr)	Καθαρό βάρος αίματος (gr)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων ($\times 10^6$)	Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	ABO
13	219	158	125	27375	10,2	A-
14	267	137	104	27768	7,8	B+
15	126	190	157	19782	7,3	O+
16	145	160	127	18415	9,3	A+
17	266	127	94	25004	8,6	B+
18	123	156	123	15129	7,3	O+
19	131	132	99	12969	7,3	B+
20	128	152	119	15232	6,2	A+
21	186	183	150	27900	10,7	AB+
22	79	120	87	6873	16,9	A+
Μέσος όρος	167	151,5	118,5	19644,7	9,16	
Τυπική απόκλιση	64,57382	23,07596	23,07596	7239,501	3,067464	

Πίνακας 8 – Χαρακτηριστικά των πρώτων 12 μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος μετά την πρώτη φυγοκέντρωση.

Μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού αίματος	Αιμοπετάλια ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Συγκέντρωση αιμοπεταλίων στον ασκό με τα ερυθροκύτταρα ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Μεικτό βάρος ασκού PRP (gr)	Μεικτό βάρος ασκού ερυθροκυττάρων (ml)	Όγκος PRP (ml)	Όγκος Ερυθροκυττάρων (ml)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων στον ασκό του PRP ($\times 10^6$)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων στον ασκό των ερυθροκυττάρων ($\times 10^6$)	Ανάκτηση αιμοπεταλίων στον ασκό του PRP %	Ανάκτηση αιμοπεταλίων στον ασκό με τα ερυθροκύτταρα %
1	53	282	93	55	60	22	3180	15510	24,87874	82,41135
2	186	631	62	95	29	62	5394	59945	24,21223	37,16407
3	100	845	78	74	45	41	4500	62530	23,44971	30,68927
4	163	102	102	102	69	69	11247	10404	36,51031	296,088
5	72	539	70	61	37	28	2664	32879	26,99909	30,01004
6	253	111	87	100	54	67	13662	11100	55,19554	222,991
7	166	485	72	65	39	32	6474	31525	32,24104	63,69548
8	151	145	136	91	103	58	15553	13195	60,50809	194,8011
9	138	109	100	95	67	62	9246	10355	46,84365	190,6132
10	162	128	98	80	65	47	10530	10240	53,5061	192,1875
11	408	164	71	78	38	45	15504	12792	62,19263	194,8796
12	110	160	92	76	59	43	6490	12160	42,60767	125,2632
Μέσος όρος	163,5	308,4167	88,416	81	55,4166	48	8703,667	23552,92	40,76207	138,3995
Τυπική απόκλιση	93,70602	252,3556	20,0656	15,69598	20,065	15,69598	4605,59	19285,15	14,66691	88,67626

Πίνακας 9 – Χαρακτηριστικά των επόμενων 10 μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος μετά την πρώτη φυγοκέντρηση

Μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού αίματος	Αιμοπετάλια ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Συγκέντρωση αιμοπεταλίων στον ασκό με τα ερυθροκύτταρα ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Μεικτό βάρος ασκού PRP (gr)	Μεικτό βάρος ασκού ερυθροκυττάρων (ml)	Όγκος PRP (ml)	Όγκος Ερυθροκυττάρων (ml)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων στον ασκό του PRP ($\times 10^6$)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων στον ασκό των ερυθροκυττάρων ($\times 10^6$)	Ανάκτηση αιμοπεταλίων στον ασκό του PRP %	Ανάκτηση αιμοπεταλίων στον ασκό με τα ερυθροκύτταρα %
16	239	126	91	66	58	33	13862	8316	50,63744	329,1847
17	130	51	99	61	66	28	8580	3111	30,89888	892,5747
18	130	80	135	80	102	47	13260	6400	67,03063	309,0938
19	73	100	84	85	51	52	3723	8500	20,21721	216,6471
20	102	82	83	67	50	34	5100	5494	20,39674	455,1147
21	123	99	111	70	78	37	9594	6930	63,41463	218,3117
22	111	113	97	97	64	64	7104	10961	54,77678	118,3195
23	82	116	116	69	83	36	6806	8004	44,68225	190,3048
24	243	90	100	105	67	72	16281	9450	58,35484	295,2381
25	170	109	74	66	41	33	6970	7194	101,4113	95,53795
Μέσος όρος	140,3	96,6	99	76,6	66	43,6	9128	7436	51,18207	312,0327
Τυπική απόκλιση	59,56891	21,8388	17,9629	14,78137	17,9629	14,78137	4092,691	2175,005	24,37821	229,7779

Πίνακας 10 - Χαρακτηριστικά των 12 πρώτων μονάδων PRP μετά την δεύτερη φυγοκέντρηση

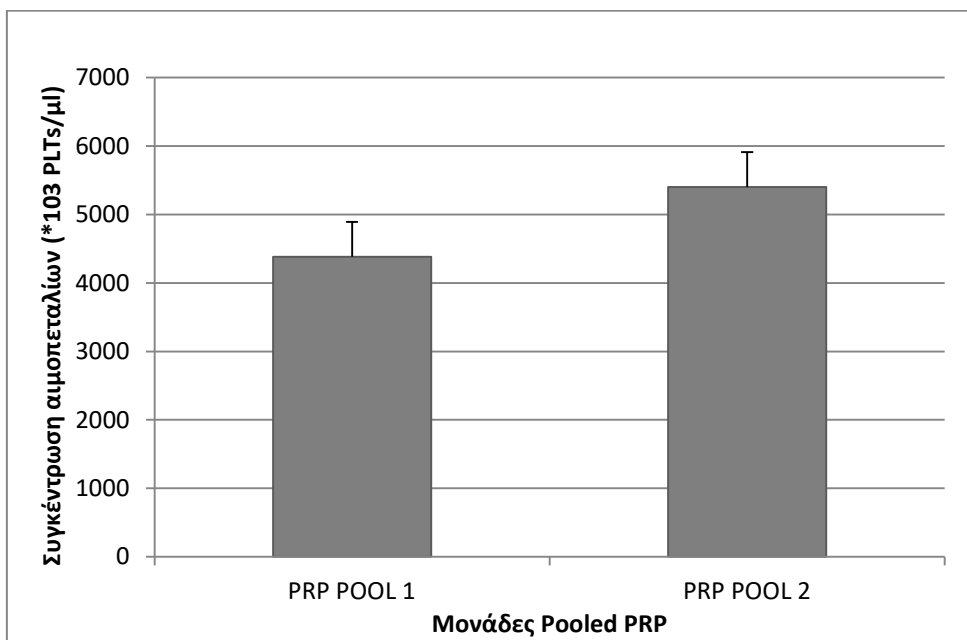
Μονάδα PRP	Συγκέντρωση αιμοπεταλίων (Χ10 ³ /μl)	Όγκος τελικού PRP (ml)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων (x10 ⁶)	Λευκά αιμοσφαίρια (Χ10 ³ /μl)	Απόλυτος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στο PRP (x10 ⁶)	Ερυθρά αιμοσφαίρια (Χ10 ⁶ /μl)	Τελική ανάκτηση αιμοπεταλίων στο PRP (%)	Ημέρα παρασκευής μονάδας PRP	ABO
PRP 1	238	13	3094	0,3	3,9	0,13	24,20591	5/11/2019	B+
PRP 2	387	14	5418	2,4	33,6	0,04	24,31996	6/11/2019	A+
PRP 3	234	13	3042	0,3	3,9	0,1	15,85201	11/11/2019	A-
PRP 4	856	6	5136	6,3	37,8	0,1	16,67262	12/11/2019	O-
PRP 5	387	5	1935	1	5	0,05	19,61082	13/12/2019	A+
PRP 6	1674	7	11718	1,7	11,9	0,06	47,34163	19/11/2019	O+
PRP 7	970	6	5820	3,3	19,8	0,05	28,98406	19/11/2019	O+
PRP 8	2196	5	10980	9,8	49	0,07	42,71709	20/11/2019	A+
PRP 9	1396	5	6980	4,6	23	0,06	35,36326	20/11/2019	O+
PRP 10	1245	7	8715	3,1	21,7	0,07	44,28354	25/11/2019	O+
PRP 11	2210	7	15470	6,9	48,3	0,09	62,05624	27/11/2019	B+
PRP 12	877	6	5262	4,7	28,2	0,2	34,54569	27/11/2019	O+
Μέσος όρος	1055,833	7,833333	6964,167	3,7	23,84167	0,085	32,99607		
Τυπική Απόκλιση	706,0729	3,406767	4042,211	2,902036902	16,10982	0,04462	14,10472		

Πίνακας 11- Χαρακτηριστικά των 10 επόμενων μονάδων PRP μετά την δεύτερη φυγοκέντρηση.

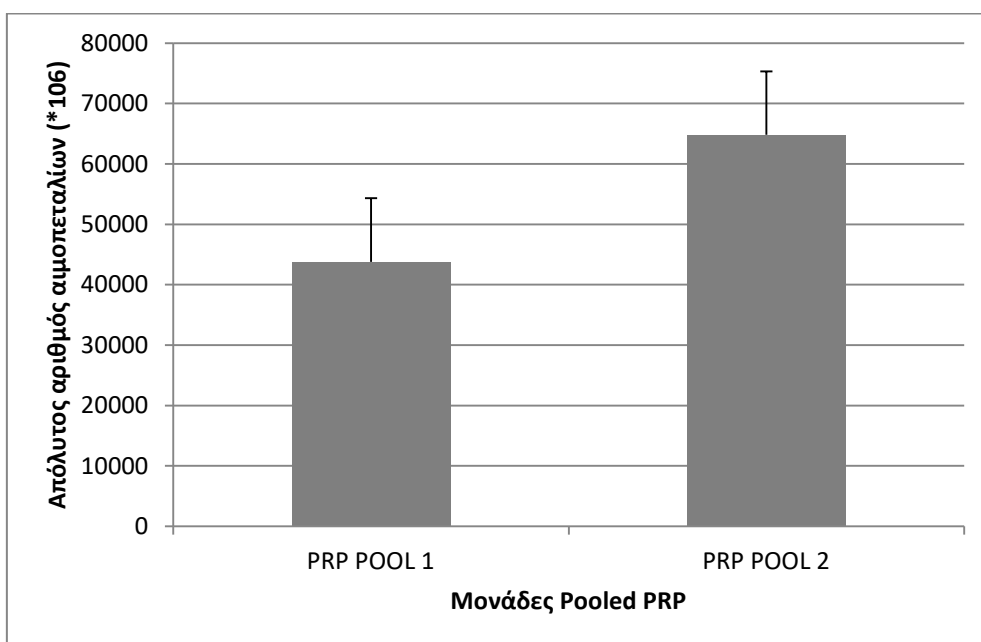
Μονάδα PRP	Συγκέντρωση αιμοπεταλίων (x10 ³ /μl)	Όγκος τελικού PRP (ml)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων (x10 ⁶)	Λευκά αιμοσφαίρια (x10 ³ /μl)	Απόλυτος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στο PRP (x10 ⁶)	Ερυθρά αιμοσφαίρια (x10 ⁶ /μl)	Τελική ανάκτηση αιμοπεταλίων στο PRP (%)	Ημέρα παρασκευής μονάδας PRP	ABO
PRP 13	2242	5	11210	4,4	22	0,21	40,94977	9/12/2019	A-
PRP 14	1385	5	6925	3,7	18,5	0,17	24,93878	9/12/2019	B+
PRP 15	1860	6	11160	10,5	35	0,45	56,41492	11/12/2019	O+
PRP 16	558	7	3906	2,8	19,6	0,05	21,21097	11/12/2019	A+
PRP 17	743	6	4458	3,9	23,4	0,19	17,82915	17/12/2019	B+
PRP 18	1564	5	7820	4,9	24,5	0,11	51,68881	19/12/2019	O+
PRP 19	1124	5	5620	4,4	22	0,12	43,3341	19/12/2019	B+
PRP 20	936	6	5616	2,8	16,8	0,15	36,86975	24/12/2019	A+
PRP 21	1888	6	11328	12,9	77,4	0,22	40,60215	24/12/2019	AB+
PRP 22	1025	5	5125	3,6	18	0,1	74,56715	30/12/2019	A+
Μέσος όρος	1332,5	5,6	7316,8	5,39	27,72	0,177	40,84055		
Τυπική Απόκλιση	549,0372	0,699206	2921,297	3,438491271	18,19718	0,109651	17,28035		

Πίνακας 12 – Χαρακτηριστικά Μονάδων PRP μετά το Pool

Πριν την επεξεργασία					Μετά την επεξεργασία							
Pooled CBU's	Συγκέντρωση Αιμοπεταλίων (x10 ³ /μl)	Μεικτό Βάρος Ασκού (gr)	Καθαρό Βάρος περιεχομένου (gr)	Απόλυτος Αριθμός Αιμοπεταλίων (x10 ⁶)	Pooled PRP	Συγκέντρωση αιμοπεταλίων στο PRP (x10 ³ /μl)	Όγκος τελικού PRP (ml)	Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων (x10 ⁶)	Λευκά αιμοσφαίρια (x10 ³ /μl)	Απόλυτος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (x10 ⁶)	Ερυθρά αιμοσφαίρια (x10 ⁶ /μl)	Τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων στο PRP(%)
Pooled CBU 1	950	122	89	84550	PRP POOL 1	4380	10	43800	5,4	54	0,34	49213,48
Pooled CBU 2	1422	86	53	75366	PRP POOL 2	5400	12	64800	4,5	54	0,62	122264,2
Μέσος όρος	1186	104	71	79958		4890	11	54300	4,95	54	0,48	85738,82
Τυπική απόκλιση	333,754	25,4558	25,4558	6494,06		721,248	1,41421	14849,2	0,63639610	0	0,19799	51654,62



Διάγραμμα 3- Συγκέντρωση αιμοπεταλίων στις Pooled μονάδες PRP μετά την επεξεργασία τους.



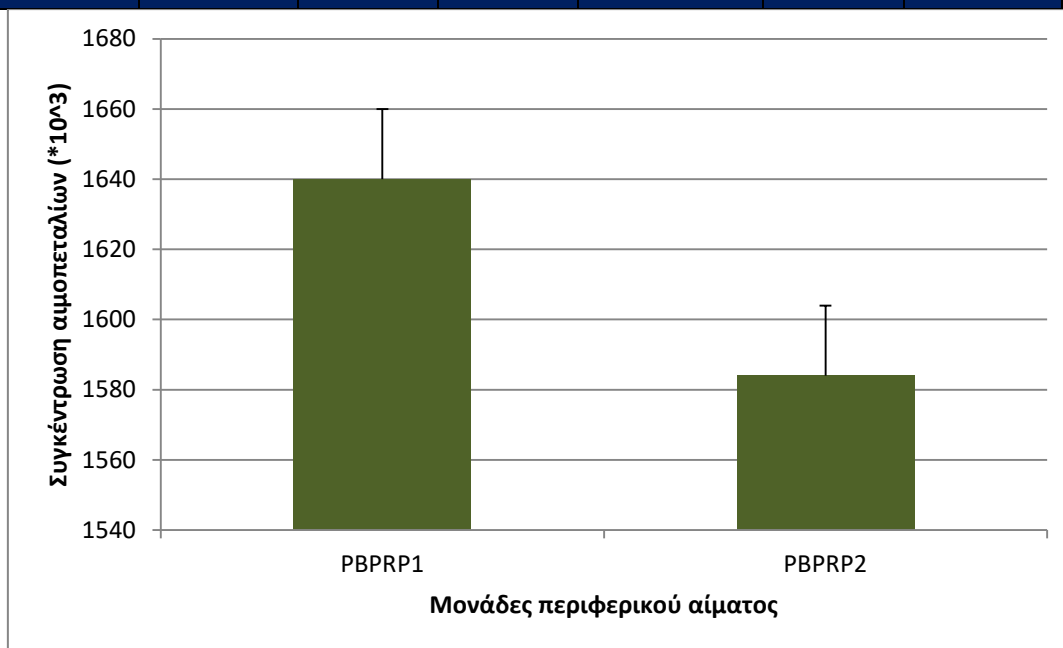
Διάγραμμα 4 - Διάγραμμα απόλυτου αριθμού αιμοπεταλίων για κάθε τελική μονάδα Pooled PRP

7.2 Αποτελέσματα μονάδων PRP προερχόμενα από περιφερικό αίμα

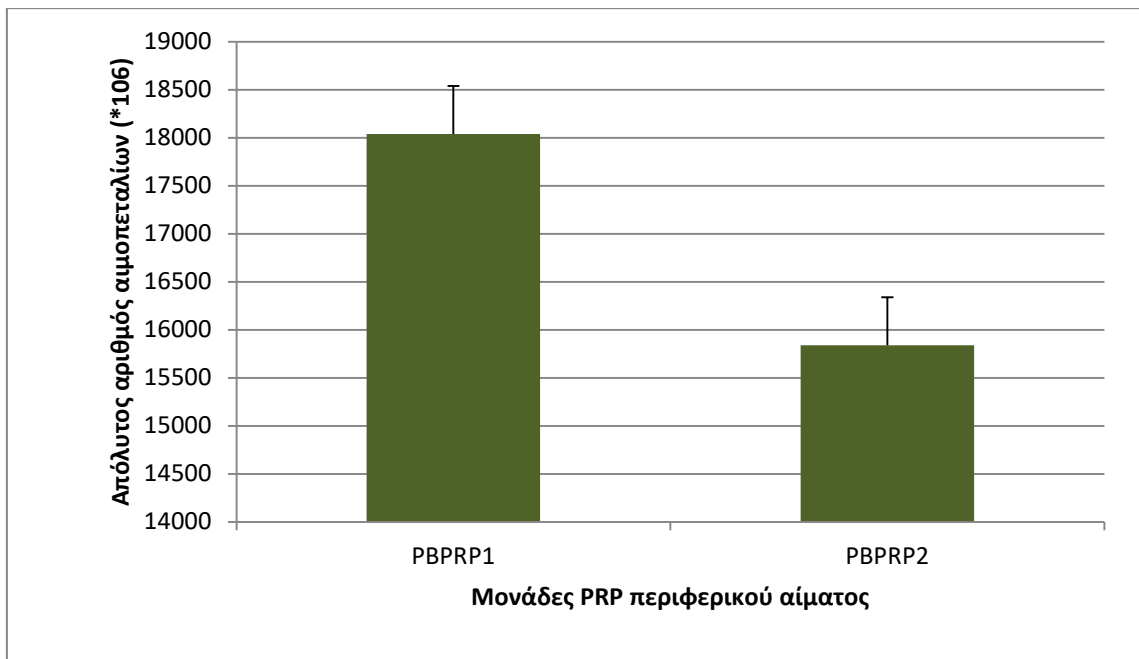
Στον πίνακα 12 φαίνονται τα χαρακτηριστικά των δύο μονάδων περιφερικού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή του PRP. Στον παρακάτω (Πίν. 12) πίνακα και στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 5, 6, 7) φαίνονται τα χαρακτηριστικά των μονάδων PRP που προέκυψαν μετά την επεξεργασία των μονάδων του πίνακα 1. Οι μονάδες περιφερικού αίματος ήταν ήδη Pooled από δύο ή περισσότερες μονάδες αίματος, Οπότε τα αρχικά χαρακτηριστικά της κάθε μονάδας είναι άγνωστα.

Πίνακας 12 - Χαρακτηριστικά μονάδων PRP απο περιφερικό αίμα.

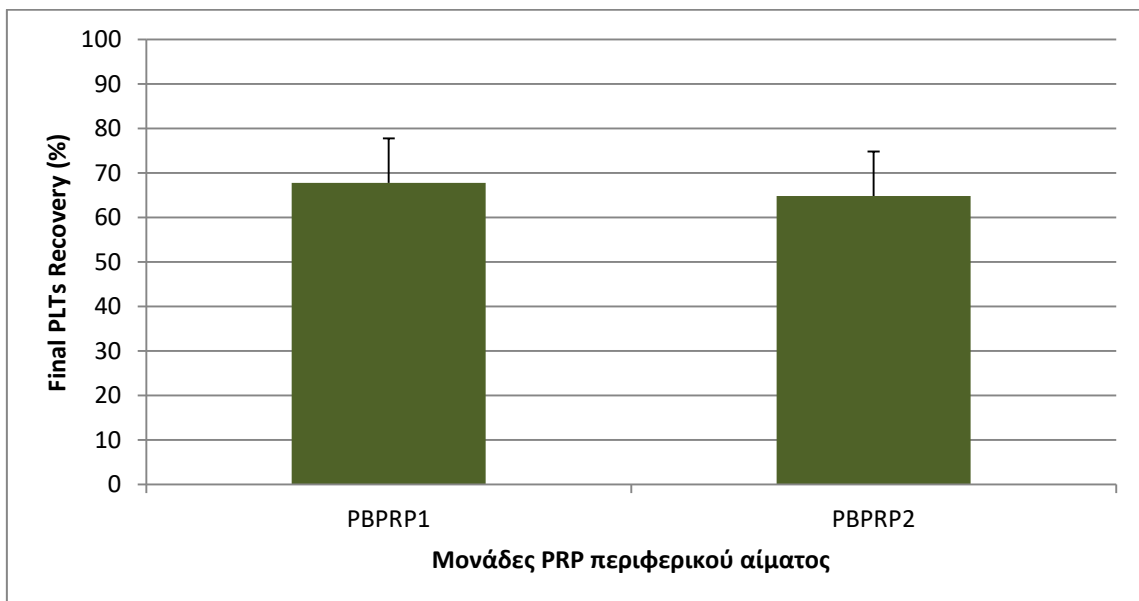
PRP UNIT	PRP PLTs ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	PRP Net Volume (ml)	PRP Total PLTs ($\times 10^6$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	PRP Total WBCs ($\times 10^6$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	PRP PLT: FINAL RECOVERY (%)
PBPRP1	1640	11	18040	0,5	5,5	0,01	67,71772
PBPRP2	1584	10	15840	0,3	3	0,02	64,81178
average	1612	10,5	16940	0,4	4,25	0,015	66,26475
Standart deviation	39,59798	0,707107	1555,635	0,141421356	1,767767	0,007071	2,054805



Διάγραμμα 5 - Συγκέντρωση αιμοπεταλίων στις μονάδες PRP από περιφερικό αίμα.



Διάγραμμα 6 - Απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων στις τελικές μονάδες PRP από περιφερικό αίμα.



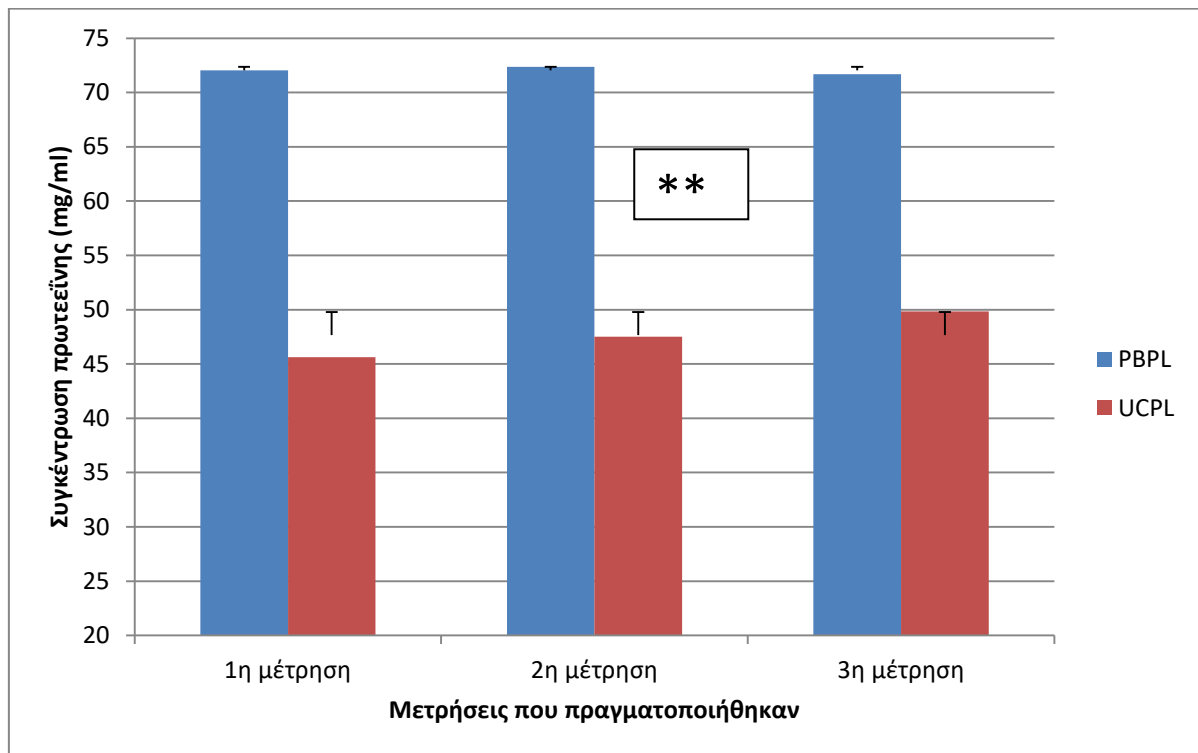
Διάγραμμα 7 - Ανάκτηση αιμοπεταλίων στις τελικές μονάδες PRP από περιφερικό αίμα.

7.3 Αποτελέσματα από την μέτρηση των πρωτεϊνών των PL μονάδων.

Όταν οι pooled μονάδες PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα και οι PRP μονάδες από περιφερικό αίμα αποθηκεύονταν στους -20°C , οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων λύνονταν και αυτό που προέκυπτε ήταν το PL. Στον παρακάτω (Πίν. 13) πίνακα και διάγραμμα (Διάγραμμα 8) φαίνονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις της πρωτεΐνης που πραγματοποιήθηκαν στα PBPL και UCPL.

Πίνακας 13 - Μετρήσεις πρωτεΐνης στα PBPL και UCPL.

<u>Μετρήσεις</u>	<u>Protein PBPC (mg/ml)</u>	<u>Protein UCPC (mg/ml)</u>
<u>1^η μέτρηση</u>	72,047	45,615
<u>2^η μέτρηση</u>	72,357	47,524
<u>3^η μέτρηση</u>	71,690	49,852

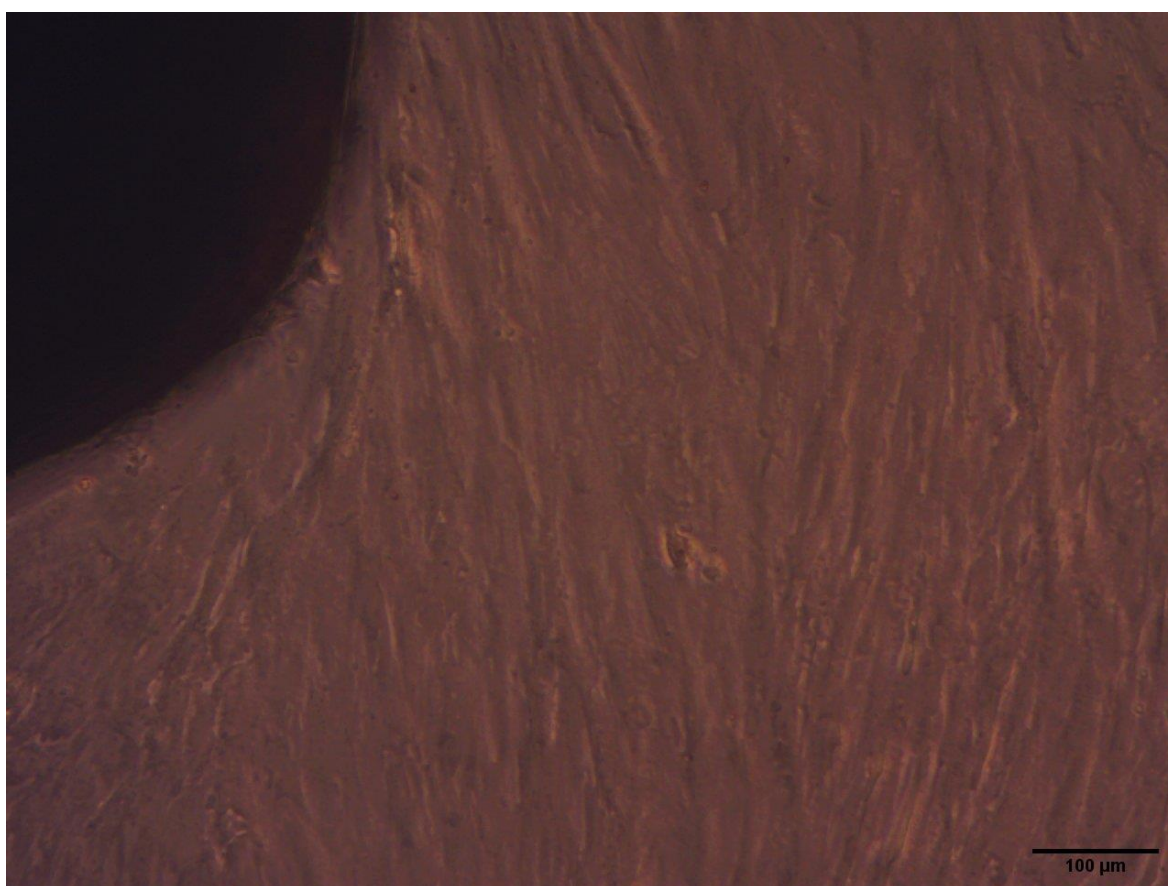


Διάγραμμα 8 - Σε αυτό το διάγραμμα απεικονίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο PBPL (μπλε χρώμα) και UCPL (κόκκινο χρώμα) στις τρεις διαφορετικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν. Η διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης πρωτεϊνών είναι στατιστικά σημαντική $p=0.002053 < 0,005$

Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα κυτταροκαλλιιεργιών

8.1 Αρχική Καλλιέργεια WJ-MSCs

Όταν πραγματοποιήθηκε απομόνωση MSCs από βαρτόναιο γέλη, τοποθετήθηκε σε 6-wells όπου και παρέμεναν για 18 ημέρες μέχρι την ανακαλλιέργεια τους σε φλάσκες των 75cm² ή 175cm². Όπως περιγράφηκε και παραπάνω, για να πραγματοποιηθεί η ανακαλλιέργεια των MSCs από 6-well σε φλάσκα θα έπρεπε τα MSCs να είχαν αναπτυχθεί σε όλη την επιφάνεια από τουλάχιστον ένα well. Στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 40) φαίνονται πώς τα MSCs αναπτύσσονται γύρω από το κομμάτι βαρτονείου γέλης που τοποθετήθηκε σε 6-well.

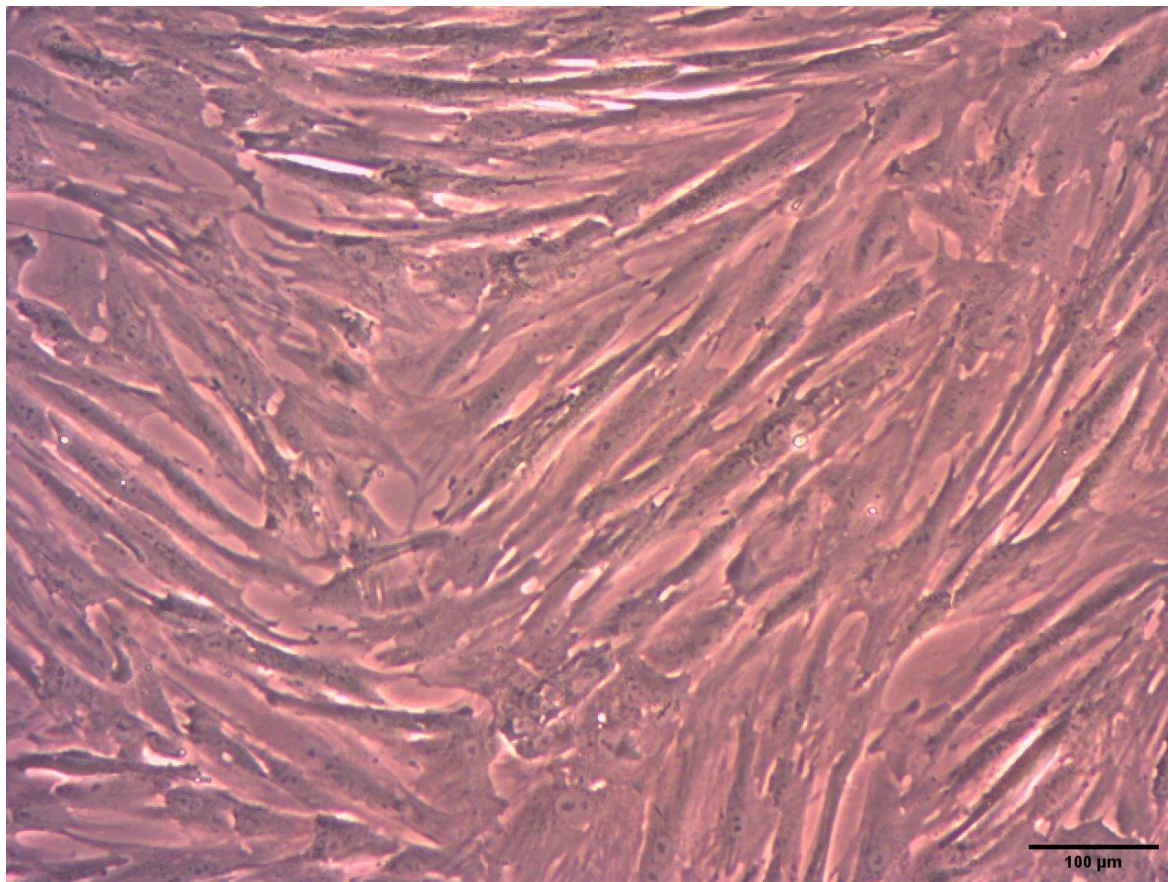


Εικόνα 36 - Εικόνα από μικροσκόπιο Leica DMIL στην οποία φαίνονται τα WJ-MSCs να έχουν αναπτυχθεί στην επιφάνεια του 6-well γύρω από το κομμάτι της βαρτονείου γέλης. 10x1280x960 bin 2x, scale bar 100μm.

8.2 Τα MSCs στις φλάσκες.

Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φλάσκες μέχρι να αναπτυχθούν και να καλύψουν όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Εφόσον είχε επιβεβαιωθεί μετά από μικροσκοπικό έλεγχο ότι τα κύτταρα είχαν επικαλύψει πλήρως την επιφάνεια της φλάσκας τότε ήταν έτοιμα για

ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερες ή περισσότερες φλάσκες. Τα MSCs σε όλη την φάση της ανάπτυξης τους και σε κάθε ανακαλλιέργεια είχαν το χαρακτηριστικό σχήμα ινοβλάστη (Εικ. 37).



Εικόνα 37 - Σε αυτήν την εικόνα φαίνονται τα WJ-MSCs στην επιφάνεια μίας φλάσκας καθώς και το σχήμα ινοβλάστη που έχουν αυτά τα κύτταρα. 10x1280x960 bin 2x, scale bar 100μm.

8.3 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής των WJ-MSCs

Τα MSCs που χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής ήταν 4^{ης} ανακαλλιέργειας (P4) από φλάσκα 175cm². Τα κύτταρα αυτά υποβλήθηκαν σε κυτταρομετρικό έλεγχο ως προς τους δείκτες που εκφράζονται και χαρακτηρίζουν τα MSCs σύμφωνα με την ISCT. Τα κύτταρα μετρήθηκαν ως προς την συγκέντρωση και την ζωτικότητα τους. Το δείγμα της μέτρησης προερχόταν από ανασύσταση των παραπάνω κυττάρων σε 2ml θρεπτικού υλικού 20%. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε αυτοματοποιημένο σύστημα καταμέτρησης κυττάρων Countess II (Thermo Fisher Scientific). Τα αποτελέσματα ήταν: 3,24*10⁶ Cells/ml με 86% ζωτικότητα. Στον επόμενο πίνακα (πιν. 14) φαίνονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας.

Πίνακας 14 - Σε αυτό τον πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής των MSCs. Μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι οι δείκτες που εκφράζονται είναι αυτοί που χαρακτηρίζουν τα MSCs

<u>Επιφανειακό αντιγόνο</u>	<u>Ποσοστό έκφρασης (%)</u>
CD90	94,7
CD105	94,7
HLA-ABC	97,2
CD73	99,6
CD29	94,4
CD44	99,2
CD19	3,2
CD3	2,8
CD31	4,1
CD14	1,5
HLA-DR	2,1
CD45	1,3

8.4 Αποτελέσματα από τις τρεις συνθήκες ανάπτυξης των MCSs.

8.4.1 Α' συνθήκη: WJ-MSCs + PL medium.

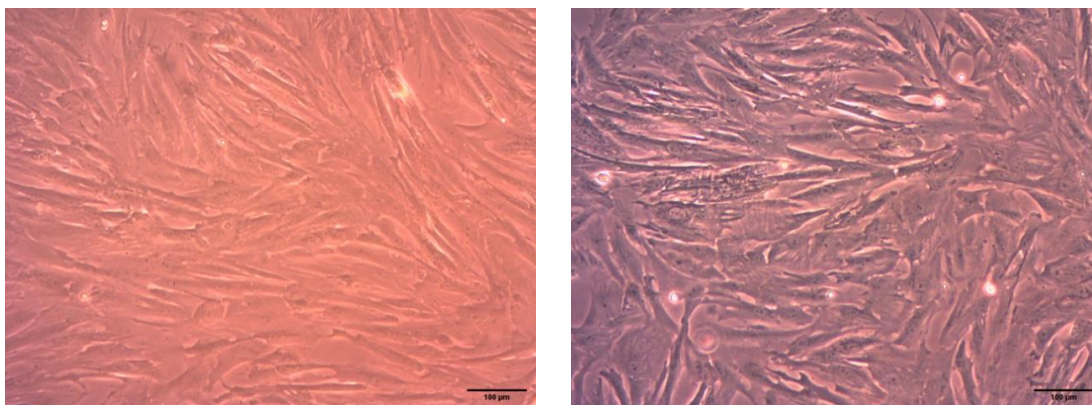
Τα κύτταρα που εφαρμόστηκαν σε αυτή την συνθήκη ήταν κύτταρα WJ-MSCs τρίτης ανακαλλιέργειας. Εφόσον αποκολλήθηκαν από τις φλάσκες, μετρήθηκαν ως προς την συγκέντρωση και την ζωτικότητα τους. Το δείγμα της μέτρησης προερχόταν από ανασύσταση των παραπάνω κυττάρων σε 2ml θρεπτικού υλικού 20%. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε αυτοματοποιημένο σύστημα καταμέτρησης κυττάρων Countess II (Thermo Fisher Scientific) με την χρήση χρωστικής Trypan Blue. Τα αποτελέσματα ήταν: $2,72 \cdot 10^6$ cells/ml με 34% ζωτικότητα.

Πρώτα τοποθετήθηκαν σε 6-well για μία ημέρα με θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια έγινε η προσθήκη του medium και των δειγμάτων αναφοράς. Στη συνέχεια, στα κύτταρα πραγματοποιούταν μικροσκοπικός έλεγχος σχεδόν καθημερινά και καταγράφονταν ο πολλαπλασιασμός τους και η ανάπτυξη τους. Στα 6-well που είχε προστεθεί PBPL medium παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα αποκτούσαν ένα πεπλατυσμένο (**μορφολογία ινοβλάστη**) σχήμα από την πρώτη κιόλας ημέρα. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα αυτά μπορούσαν να διατηρηθούν ζωντανά στο PBPL medium ως και 6 ημέρες. Εξαιτίας της απώλειας του 6-well με το PBPL medium την 6^η ημέρα, δεν μπόρεσε να διαπιστωθεί το ακριβές χρονικό διάστημα ζωής των κυττάρων στο PBPL medium. Στα 6-well όπου είχε προστεθεί το UCPL medium, διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα πέθαιναν μετά από 4 ημέρες. Το σχήμα των κυττάρων στο UCPL medium παρέμενε το ίδιο όπως και στις καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό 10%, δηλαδή είχαν σχήμα ινοβλάστη.

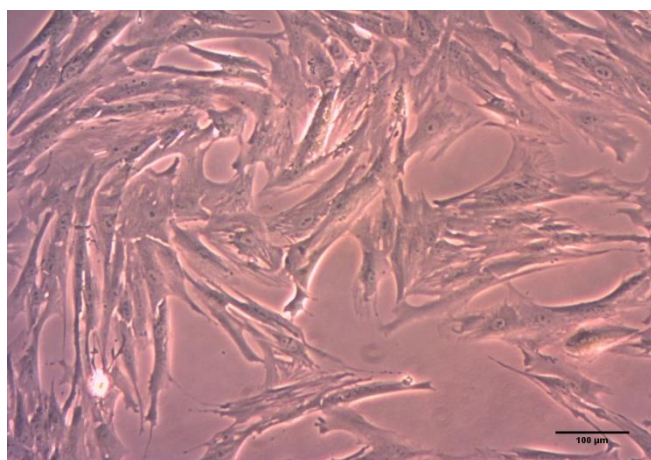
Μετά την δεύτερη ημέρα το θετικό δείγμα αναφοράς όπου μέχρι εκείνη την στιγμή περιείχε WJ-MSCs + 1ml α-MEM, το α-MEM αλλάχθηκε με 1ml PBS 10% και τα κύτταρα πέθαιναν.

Τα κύτταρα του αρνητικού δείγματος αναφοράς παρέμειναν ζωντανά μέχρι το τέλος των παρατηρήσεων (6 ημέρες).

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα κύτταρα πως αναπτύσσονταν πριν την εφαρμογή του PBPL medium (Εικ. 38) και πριν την εφαρμογή του UCPL medium (Εικ. 39).



Εικόνα 38 - WJ-MSCs σε δύο τυχαία wells πριν την εφαρμογή του PBPL medium. Τα κύτταρα φαίνονται να έχουν μορφολογία ινοβλάστη. 10x1280x960 bin 2x, scale bar 100μm.



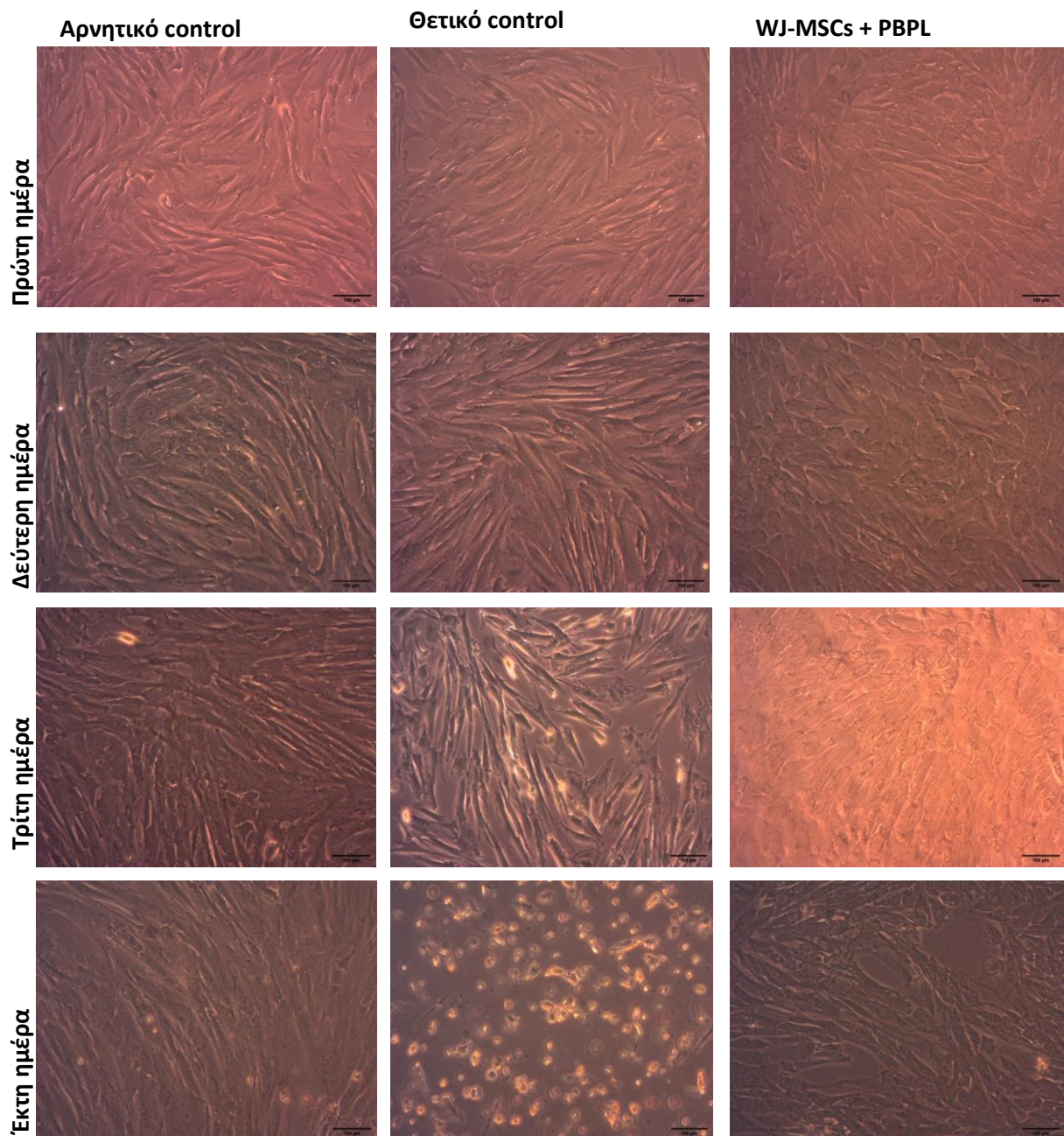
Εικόνα 39 - WJ-MSCs σε ένα τυχαίο well πριν την εφαρμογή του UCPL medium. Τα κύτταρα φαίνονται να έχουν μορφολογία ινοβλάστη. 10x1280x960 bin 2x, scale bar 100μm.

84.1.1 WJ-MSCs + PBPL medium

Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η πρόοδος της ανάπτυξης των κυττάρων για 6 ημέρες μετά την εφαρμογή το PBPL medium. Παρατηρούμε πως τα κύτταρα απέκτησαν πεπλατυσμένο σχήμα και ότι παρέμειναν ζωντανά μέχρι και την 6^η ημέρα.

Θετικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + a-MEM (τις πρώτες δύο ημέρες), WJ-MSCs + PBS 10% (τις υπόλοιπες ημέρες).

Αρνητικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%.



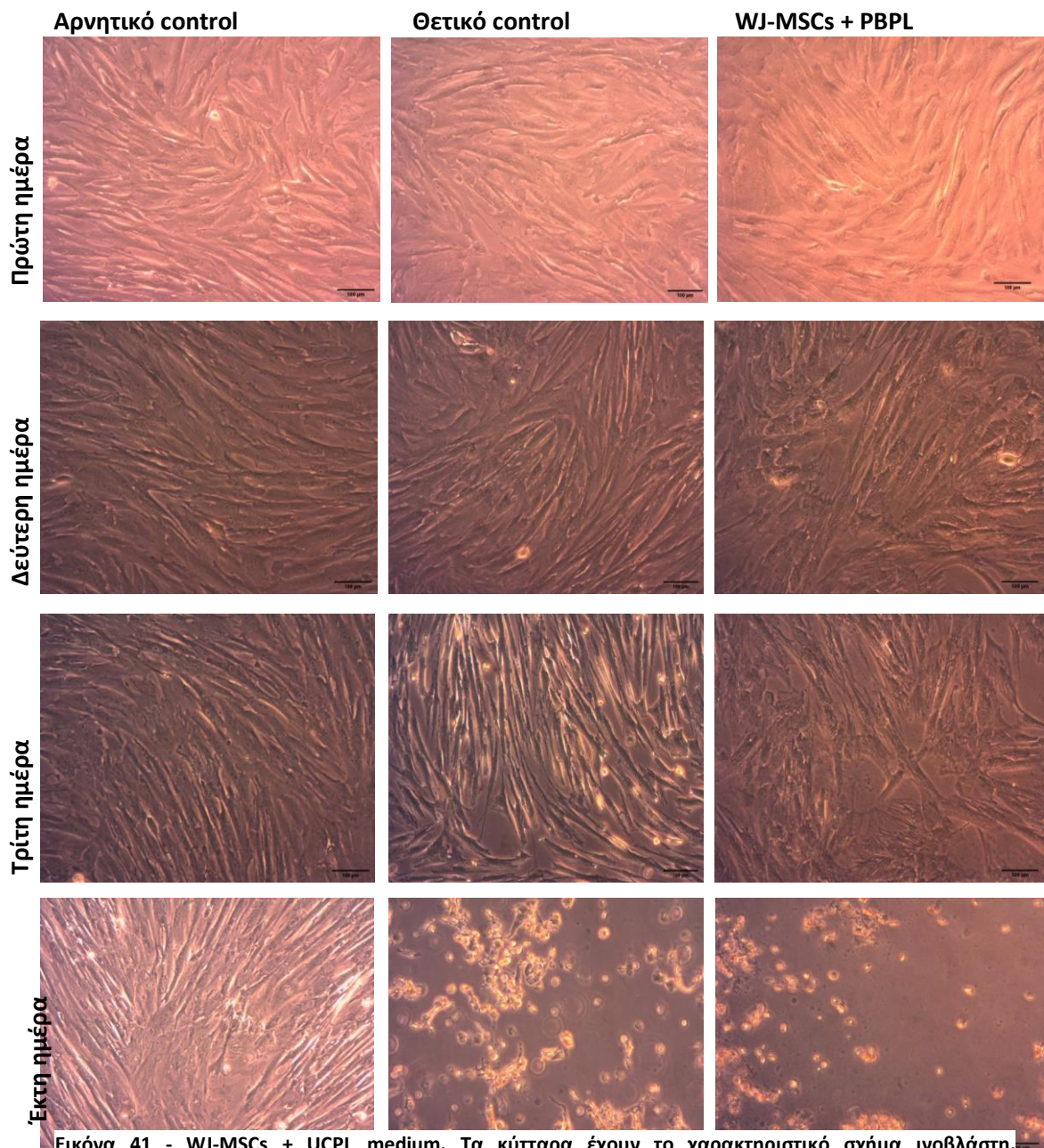
Εικόνα 40 - WJ-MSCs + PBPL medium την πρώτη μέρα εφαρμογής του PBPL medium. Παρατηρείται ότι τα κύτταρα έχουν πάρει πεπλατυσμένο σχήμα από την πρώτη κιόλας ημέρα εφαρμογής του PBPL medium και το οποίο διατηρούν μέχρι την έκτη ημέρα. Αρνητικό control (WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%). Θετικό control (WJ-MSCs + a-MEM τις δύο πρώτες ημέρες και WJ-MSCs + PBS 10% τις υπόλοιπες ημέρες). Παρατηρείται εκφύλιση των κυττάρων του θετικού control λίγες ώρες μετά την προσθήκη του PBS 10% 10x1280x960, scale bar 100μm.

8.4.1.2 WJ-MSCs + UCPL medium

Παρακάτω φαίνεται η πρόοδος της ανάπτυξης των κυττάρων παρουσία του UCPL medium. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα πεθαίνουν σε λιγότερες από 6 ημέρες. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι την 4^η ημέρα τα κύτταρα άρχισαν να πεθαίνουν όμως δεν λήφθηκαν φωτογραφίες εκείνη την ημέρα.

Θετικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + α-MEM (τις πρώτες δύο ημέρες), WJ-MSCs + PBS 10% (τις υπόλοιπες ημέρες).

Αρνητικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%.



Εικόνα 41 - WJ-MSCs + UCPL medium. Τα κύτταρα έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα ινοβλάστη. Παρατηρείται ότι την έκτη ημέρα τα κύτταρα έχουν πεθάνει. Αρνητικό control (WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%). Θετικό control (WJ-MSCs + α-MEM τις πρώτες δύο ημέρες και WJ-MSCs + PBS 10% τις υπόλοιπες ημέρες). Τα κύτταρα του θετικού control αρχίζουν να εκφυλίζονται από τις πρώτες ώρες της προσθήκης του PBS. 10x1280x960 bin2x, scale bar 100μm.

8.4.2 Β' συνθήκη: WJ-MSCs + PLGEL.

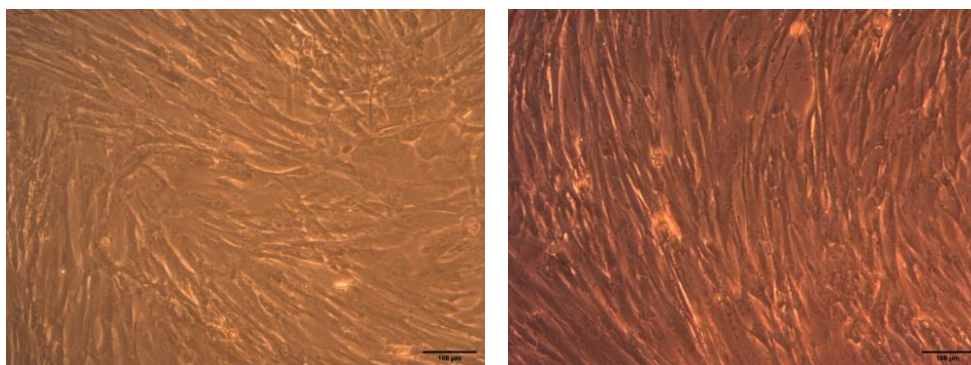
Η Β' συνθήκη εφαρμόστηκε δύο φορές καθώς την ήταν αδύνατη η εξαγωγή συμπερασμάτων μετά την πρώτη εφαρμογή. Την πρώτη φορά που εφαρμόστηκε αυτή η συνθήκη, το PL δεν μπορούσε να φιλταριστεί με αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια να εμποδίζουν την μικροσκόπηση των κυττάρων. Αυτή την φορά ήταν γνωστός ο παράγοντας που οδήγησε στο πρόβλημα κατά την μικροσκόπηση της των κυττάρων. Όμως, εξακολουθούσε να είναι αδύνατο το φιλτράρισμα των PL. Για αυτό το λόγο αποφασίστηκε τα PL να φυγοκεντρηθούν ώστε τα αιμοπετάλια να καθιζάνουν και να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο του PL για τις κυτταροκαλλιέργειες των MSCs.

Τα κύτταρα που εφαρμόστηκαν σε αυτή την συνθήκη ήταν κύτταρα WJ-MSCs τρίτης ανακαλλιέργειας. Αποκολλήθηκαν από τις φλάσκες και μετρήθηκαν ως προς την συγκέντρωση και την ζωτικότητα τους. Το δείγμα της μέτρησης προερχόταν από ανασύσταση των παραπάνω κυττάρων σε 2ml θρεπτικού υλικού 20%. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο κυτταρόμετρο Countess II (Thermo Fisher Scientific). Τα αποτελέσματα ήταν: $3,16 \cdot 10^6$ cells/ml με 95% ζωτικότητα.

Αρχικά, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 6-well για μία ημέρα με θρεπτικό υλικό 20% και στη συνέχεια έγινε η προσθήκη των δειγμάτων αναφοράς και του PL με το γλυκονικό ασβέστιο για την δημιουργία της γέλης. Στη συνέχεια τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο σχεδόν καθημερινά.

Σε αυτή την περίπτωση ήταν απολύτως επιτυχής η παρατήρηση των κυττάρων καθώς μόνο ελάχιστα αιμοπετάλια ήταν παρόν στα 6-well. Τα αιμοπετάλια αυτά φαίνεται ότι συλλέχθηκαν από το υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση. Δηλαδή, παρόλο που ήταν φανερό η στοιβάδα των αιμοπεταλίων στο κάτω μέρος του σωλήνα προπυλενίου falcon μετά την φυγοκέντρηση, ένας μικρός αριθμός από αυτά παρέμεινε στο υπερκείμενο τα οποία φαίνονται σαν μικρές κουκίδες πάνω και γύρο από τα κύτταρα.

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα κύτταρα πως αναπτύσσονταν πριν την εφαρμογή του PBGEL και πριν την εφαρμογή του UCGEL medium (Εικ. 42).



Εικόνα 42 - WJ-MSCs σε δύο τυχαία wells πριν την εφαρμογή του PBGEL (αριστερά) και του UCGEL (δεξιά) Τα κύτταρα φαίνονται να έχουν μορφολογία ινοβλάστη. 10x1280x960 bin 2x, scale bar 100μm.

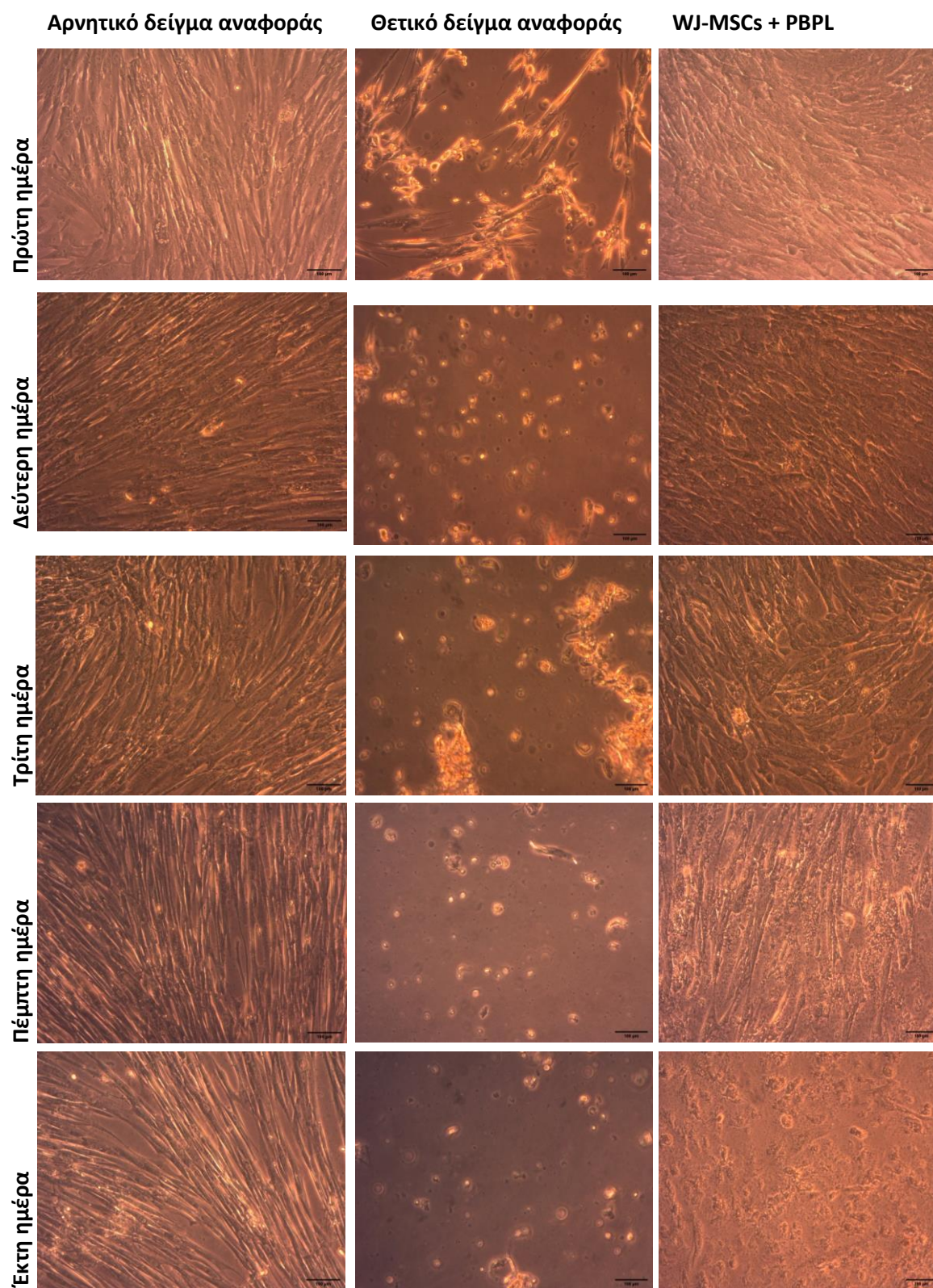
8.4.2.1 WJ-MSCs + PBGEL

Τα κύτταρα παρατηρούνταν κάθε μέρα και αξιολογούνταν η ανάπτυξη τους κάτω από την γέλη. Διαπιστώθηκε ότι την πέμπτη ημέρα τα κύτταρα άρχισαν να εκφυλίζονται και την έκτη ημέρα ήταν σχεδόν όλα νεκρά. Επίσης όπως στο PBPL medium, έτσι και εδώ τα κύτταρα παρουσίασαν ένα πεπλατυσμένο σχήμα καθώς αναπτύσσονταν κάτω από το PBGEL.

Θετικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + PBS 10%. Σε αυτή την δεύτερη εφαρμογή της Β' συνθήκης το θετικό control περιείχε PBS από την πρώτη ημέρα. Τα κύτταρα πέθαιναν παρουσία PBS.

Αρνητικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%. Τα κύτταρα στο αρνητικό δείγμα αναφοράς παρέμειναν ζωντανά όλες για όλες τις ημέρες όπου πραγματοποιούνταν οι παρατηρήσεις.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι 6 ημέρες κατά τις οποίες παρατηρούνταν η ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κοκκία που φαίνονται να περιβάλλουν τα κύτταρα είναι τα αιμοπετάλια. Δεν πραγματοποιήθηκαν λήψεις φωτογραφιών κατά την τέταρτη ημέρα.



Εικόνα 43 – WJ-MSCs + PBGEL. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα αρχίζουν να εκφυλίζονται την πέμπτη ημέρα παρουσία του PBGEL. Την τέταρτη ημέρα δεν λήφθηκαν εικόνες. Τα «κοκκία» που φαίνονται γύρω από τα κύτταρα είναι αιμοπετάλια. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν πεπλατισμένο σχήμα. Το αρνητικό δείγμα αναφοράς αποτελείται από WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%. Το θετικό δείγμα αναφοράς αποτελείται από WJ-MSCs + PBS 10%. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα στο θετικό δείγμα αναφοράς πεθαίνουν από την πρώτη ημέρα εφαρμογής του PBS 10%. 10x1280x960 bin2x, scale bar 100μm.

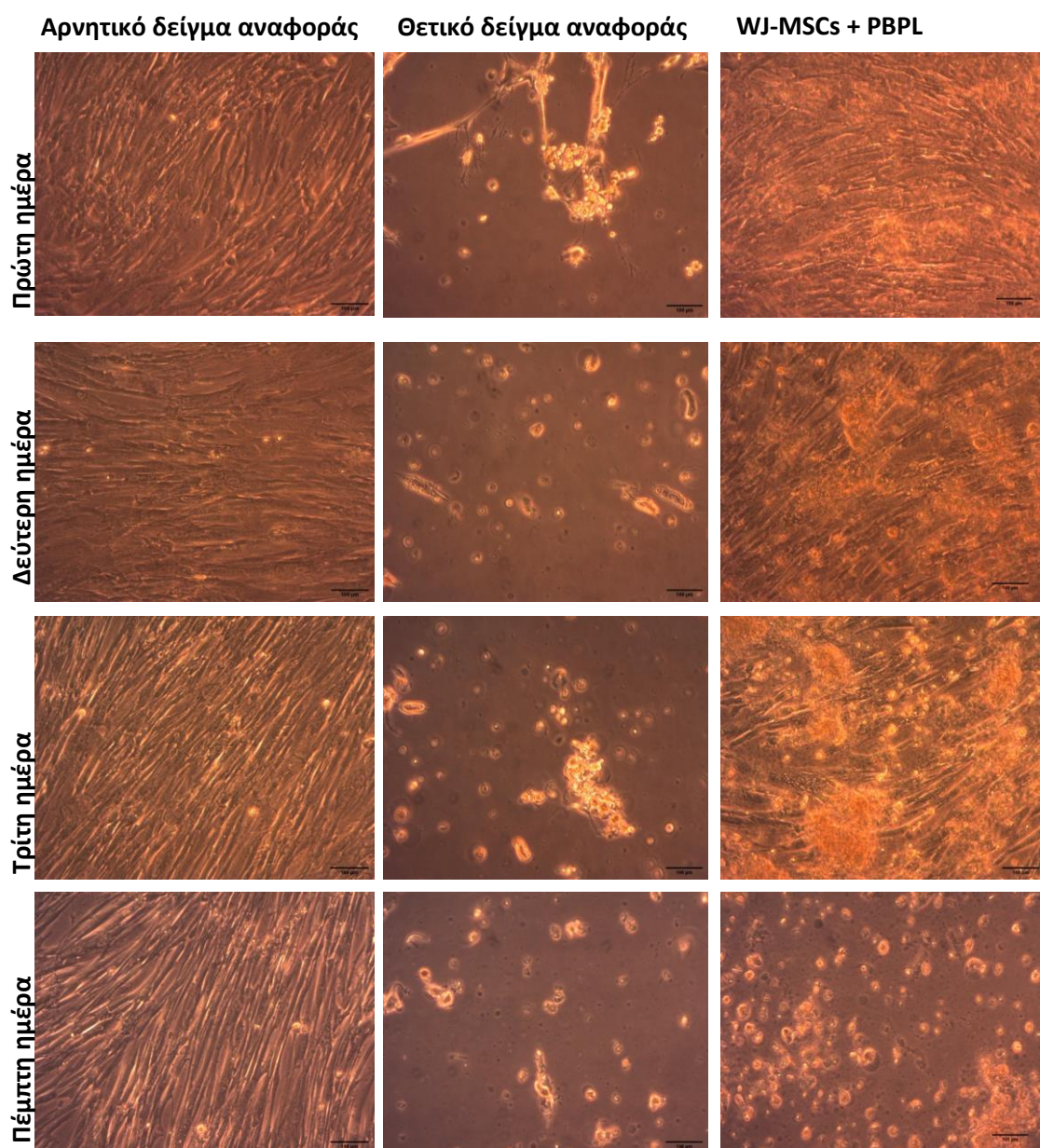
8.4.3.2 WJ-MSCs + UCGEL

Τα κύτταρα παρατηρούνταν κάθε μέρα και αξιολογούνταν η ανάπτυξη τους κάτω από την γέλη. Διαπιστώθηκε ότι την τρίτη ημέρα τα κύτταρα άρχισαν να εκφυλίζονται και την πέμπτη ημέρα ήταν όλα νεκρά. Σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα δεν παρουσίασαν πεπλατυσμένο σχήμα καθώς αναπτύσσονταν κάτω από το UBGEL, αλλά παρουσίασαν το σχήμα ινοβλάστη που έχουν κανονικά αυτά τα κύτταρα. Σε αυτή την εφαρμογή του UCGEL, τα αιμοπετάλια είχαν ισχυρότερη παρουσία σε σχέση με το PBGEL, καθώς μπορούσαν να παρατηρηθούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γύρο από τα κύτταρα σε σχέση.

Θετικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + PBS 10%. Σε αυτή την δεύτερη εφαρμογή της Β' συνθήκης το θετικό δείγμα αναφοράς περιείχε PBS από την πρώτη ημέρα. Τα κύτταρα πέθαιναν παρουσία PBS.

Αρνητικό δείγμα αναφοράς: WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%. Τα κύτταρα στο θετικό δείγμα αναφοράς παρέμειναν ζωντανά όλες για όλες τις ημέρες όπου πραγματοποιούνταν οι παρατηρήσεις.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι 5 ημέρες κατά τις οποίες παρατηρούνταν η ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κοκκία που φαίνονται να περιβάλλουν τα κύτταρα είναι τα αιμοπετάλια. Δεν πραγματοποιήθηκαν λήψεις φωτογραφιών κατά την τέταρτη ημέρα.



Εικόνα 44 – WJ-MSCs + UCCEL. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα αρχίζουν να εκφυλίζονται από την δεύτερη ημέρα και την πέμπτη ημέρα παρουσία του UCCEL είναι όλα νεκρά. Την τέταρτη ημέρα δεν λήφθηκαν εικόνες. Τα «κοκκία» που φαίνονται γύρω από τα κύτταρα είναι αιμοπετάλια. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν σχήμα ινοβλάστη. Το αρνητικό δείγμα αναφοράς αποτελείται από WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%. Το θετικό δείγμα αναφοράς αποτελείται από WJ-MSCs + PBS 10%. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα στο θετικό δείγμα αναφοράς πεθαίνουν από την πρώτη ημέρα εφαρμογής του PBS 10%. 10x1280x960 bin2x, scale bar 100μm.

8.4.4 Γ' συνθήκη: PLGEL + WJ-MSCs (πρώτη εφαρμογή).

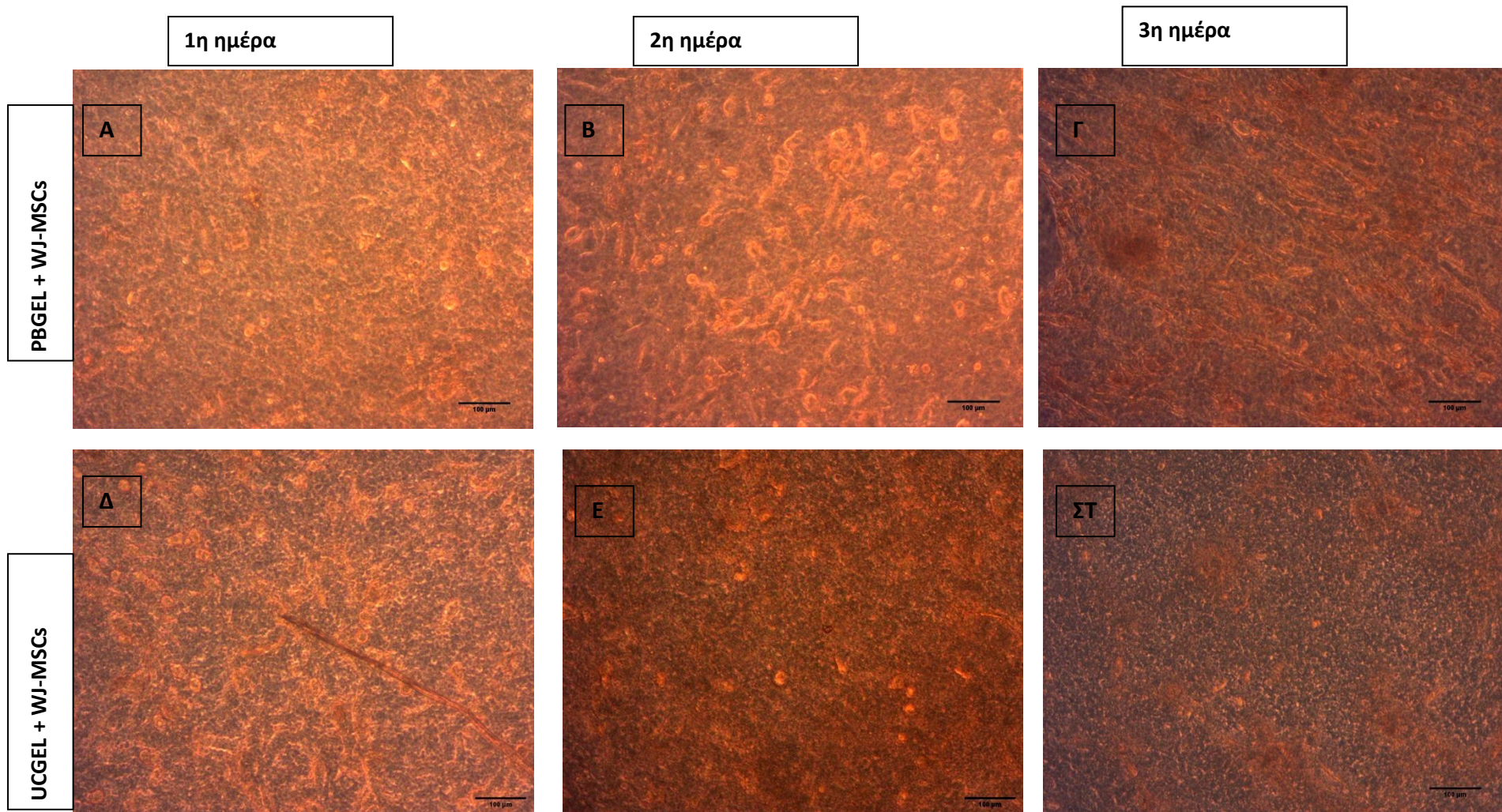
Κατά την πρώτη εφαρμογή της Γ' συνθήκης, τοποθετήθηκε το PL στα 6-well αφιλτράριστο (ήταν αδύνατο να φιλτραρισθεί εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης αιμοπεταλίων τα οποία βούλωναν τα φίλτρα) μαζί με γλυκονικό ασβέστιο ώστε να σχηματιστεί η γέλη. Μία ημέρα μετά, εφόσον η γέλη είχε σχηματιστεί με επιτυχία, ακολούθησε η προσθήκη των MSCs.

Τα κύτταρα που εφαρμόστηκαν σε αυτή την συνθήκη ήταν κύτταρα WJ-MSCs τρίτης ανακαλλιέργειας. Αποκολλήθηκαν από τις φλάσκες και μετρήθηκαν ως προς την συγκέντρωση και την ζωτικότητα τους. Το δείγμα της μέτρησης προερχόταν από ανασύσταση των παραπάνω κυττάρων σε 2ml θρεπτικού υλικού 20%. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο κυτταρόμετρο Countess II (Thermo Fisher Scientific). Τα αποτελέσματα ήταν: $2,79 \cdot 10^6$ cells/ml με 43% ζωτικότητα.

Τα κύτταρα αυτά τοποθετήθηκαν επάνω στην γέλη αιμοπεταλίων μαζί με θρεπτικό υλικό 20% με σκοπό να προσδιοριστεί ο τρόπος και ο ρυθμός ανάπτυξης τους.

Η μικροσκόπηση και σε αυτή την περίπτωση ήταν αδύνατη, καθώς η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ήταν εξαιρετικά υψηλή με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην είναι ευδιάκριτα πάνω στην γέλη. Σε μερικές περιπτώσεις ήταν δυνατή η παρατήρηση «σκιών» που σχημάτιζαν τα κύτταρα πάνω στην γέλη. Σε αυτή την πρώτη εφαρμογή της Γ' συνθήκης δεν υπήρχαν δείγματα αναφοράς. Υπήρχαν μόνο δύο 6-well το ένα με PBGEL και το άλλο με UCGEL στα οποία είχε γίνει η προσθήκη WJ-MSC. Όμως σε κανένα από αυτά τα 6-well δεν μπορούσε να παρατηρηθεί εάν τα κύτταρα αναπτύσσονται για τους λόγους που αναφέρονται παραπάνω.

Στην επόμενη εικόνα φαίνονται μερικές φωτογραφίες που λήφθηκαν από τα δύο 6-well κατά την διάρκεια 6 ημερών. Η καφέ αδιάφανη στρώση που παρατηρείται είναι το αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων στα PBGEL και UCGEL.



Εικόνα 45 – Α) PBGEL + MSCs 1^η ημέρα. Β) PBGEL + MSCs 2^η ημέρα. Γ) PBGEL + MSCs 6^η ημέρα. Δ) UCGEL + MSCs 1^η ημέρα. Ε) UCGEL + MSCs 2^η ημέρα. ΣΤ) UCGEL + MSCs 6^η ημέρα. Σε όλες τις περιπτώσεις δεν είναι ευδιάκριτα τα κύτταρα. Μόνο χαρακτηριστικές «σκιές» μπορούν να παρατηρηθούν επάνω στην γέλη οι οποίες σχηματίζονται από τα κύτταρα μπροστά από το φως του μικροσκοπίου. 10x1280x960 bin2x, scale bar 100μm.

8.4.5 Γ' συνθήκη: PLGEL + MSCs (δεύτερη εφαρμογή). Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού.

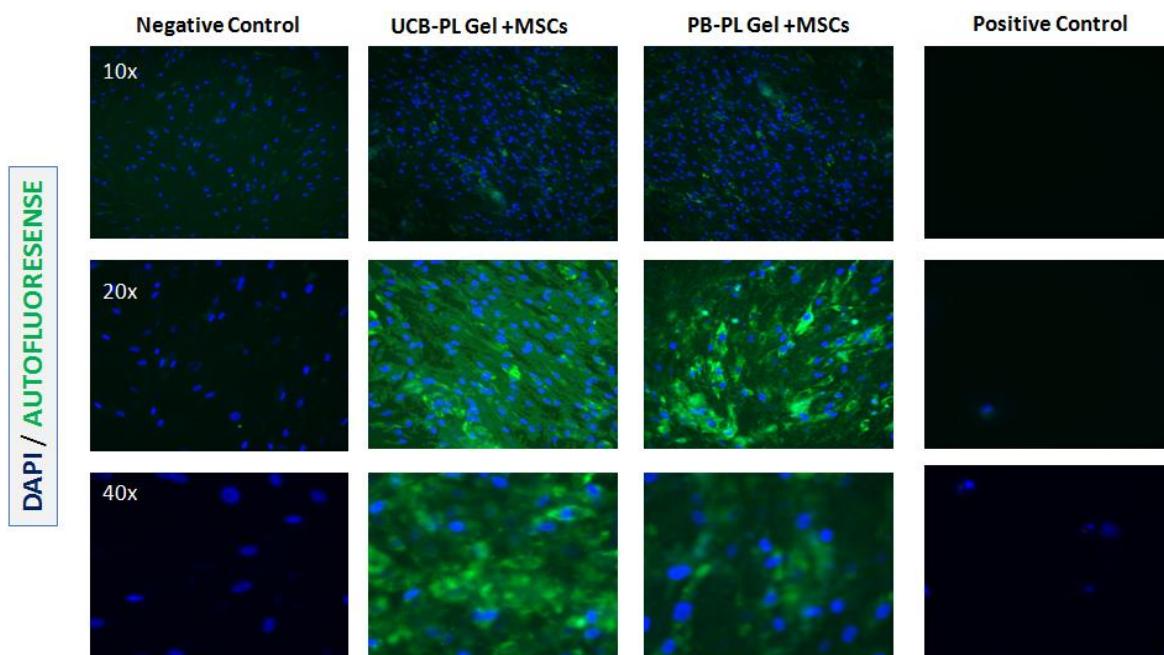
Η Γ' συνθήκη εφαρμόστηκε ξανά καθώς την ήταν αδύνατη η εξαγωγή συμπερασμάτων μετά την πρώτη εφαρμογή. Αυτή την φορά ήταν γνωστός ο παράγοντας που οδήγησε στο πρόβλημα κατά την μικροσκόπηση των κυττάρων. Αυτή τη φορά πραγματοποιήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση για την λύση του παραπάνω προβλήματος. Και σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να εφαρμοστεί η λύση που εφαρμόστηκε στην Β' συνθήκη, δηλαδή να φυγοκεντρηθούν τα PL με σκοπό να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο, το οποίο θα περιείχε λίγα αιμοπετάλια, για τα πειράματα. Όμως, αποφασίστηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και στην πρώτη εφαρμογή αυτής της συνθήκης να εφαρμοστεί το PL αφιltrάριστο σε culture slides μαζί με τα MSCs και στο τέλος να πραγματοποιηθεί ανοσοφθορισμός για την διαπίστωση της ανάπτυξης των κυττάρων.

Τα κύτταρα που εφαρμόστηκαν σε αυτή την συνθήκη ήταν κύτταρα WJ-MSCs τρίτης ανακαλλιέργειας. Αποκολλήθηκαν από τις φλάσκες και μετρήθηκαν ως προς την συγκέντρωση και την ζωτικότητα τους. Το δείγμα της μέτρησης προερχόταν από ανασύσταση των παραπάνω κυττάρων σε 2ml θρεπτικού υλικού 20%. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο κυτταρόμετρο Countess II (Thermo Fisher Scientific). Τα αποτελέσματα ήταν: $3,26 \cdot 10^6$ cells/ml με 99% ζωτικότητα.

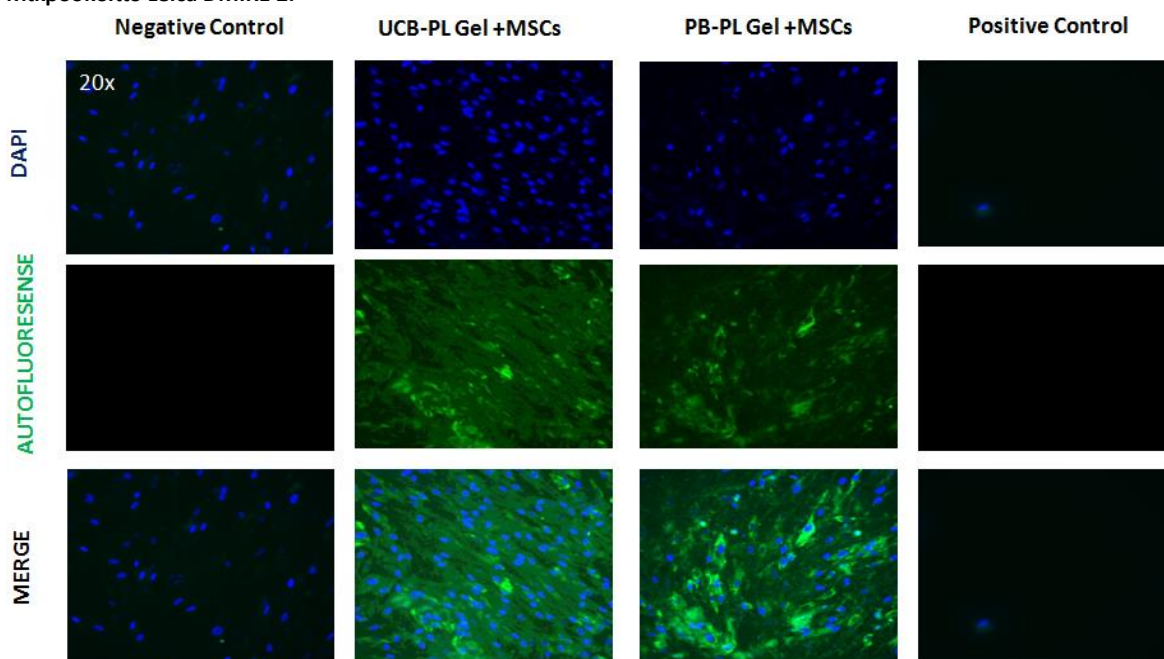
Τα κύτταρα αυτά τοποθετήθηκαν στα culture slides επάνω στην γέλη αιμοπεταλίων μαζί με θρεπτικό υλικό 20%. Δύο slides με PBGEL + WJ-MSCs και ένα slide με UCGEL + WJ-MSCs. Επίσης σε αυτή την περίπτωση της Γ' συνθήκης υπήρχαν τρία slides που χρησίμευαν ως δείγματα αναφοράς, ένα θετικό δείγμα αναφοράς με WJ-MSCs + PBS 10% και ένα αρνητικό δείγμα αναφοράς με WJ-MSCs + θρεπτικό υλικό 20%.

Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε δύο ημέρες μετά. Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα είχαν προσκολληθεί και αναπτύσσονταν εξαιρετικά καλά πάνω στα δύο ειδών γέλης (PBGEL και UCGEL).

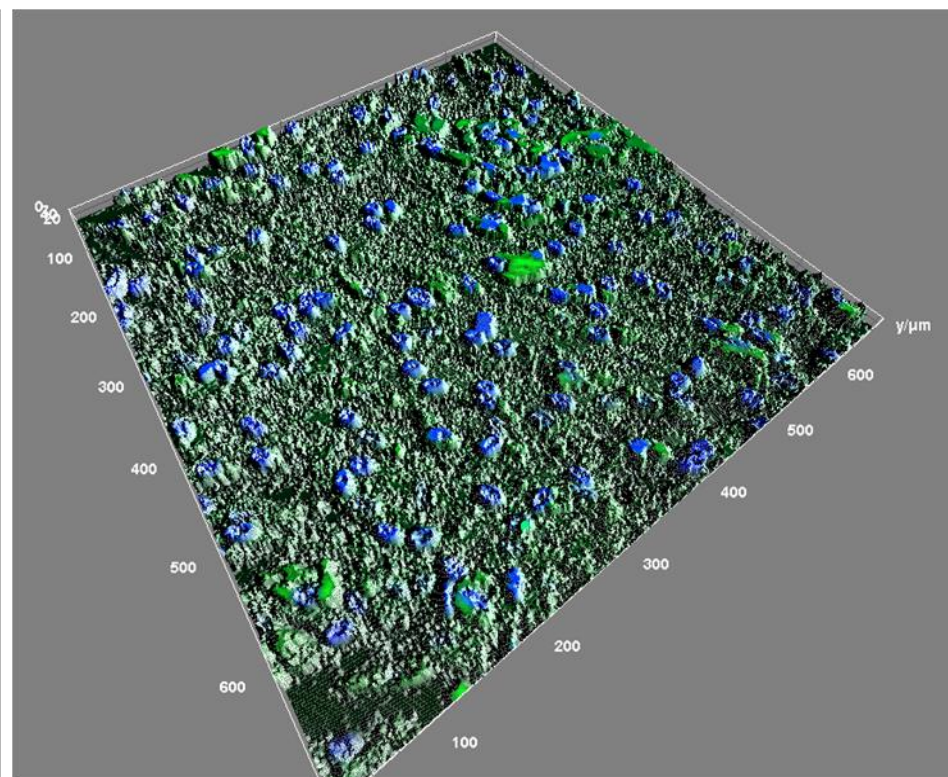
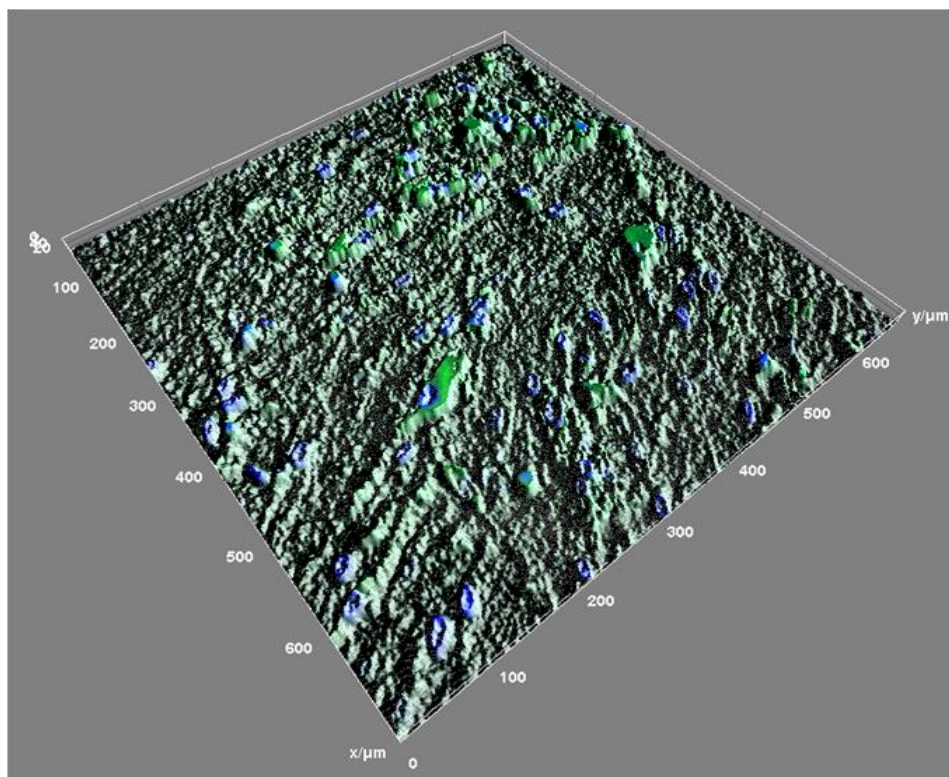
Στις επόμενες εικόνες φαίνονται οι φωτογραφίες και οι απεικονίσεις των κυττάρων που λήφθηκαν από μικροσκόπιο Leica DMIRE 2 (Εικ. 46,47). Με μπλε χρώμα φαίνονται οι πυρήνες βαμμένοι από την χρωστική DAPI και με πράσινο χρώμα ο φθορισμός από την χρωστική FITC.



Εικόνα 46 - Τα κύτταρα απο τα culture slides όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο μετά τον ανοσοφθορισμό τους. Κάθε σειρά αποτελεί μία διαφορετική μεγένθυση. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται πλήρως στα PBGEL και UCGEL. Στο αρνητικό control παρατηρείται φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων. Στο θετικό control όλα τα κύτταρα είναι πεθαμένα επειδή περιέχει PBS 10%. Με μπλε χρώμα φαίνονται οι πύρινες από την χρωστική DAPI και με πράσινο ο φθορισμός που δίνει η χρωστική FITC από το αντίσωμα που έχει ενωθεί με τα κύτταρα και την γέλη. Μικροσκόπιο Leica DMIRE 2.



Εικόνα 47 - Εικόνες απο τον ανοσοφθορισμό ενός απο τα δείγματα. Σε κάθε σειρά φαίνεται η εικόνα που λήφθηκε απο το μικροσκόπιο για κάθε χρωστική στο ίδιο οπτικό πεδίο. Στην τελευταία σειρά φαίνεται ο συνδιασμός των δύο εικόνων. Μικροσκόπιο Leica DMIRE 2, 2x



Εικόνα 48 - σε αυτή την 3D απεικόνιση φαίνεται πως τα WJ-MSCs έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια του PBGEL (αριστερά, μεγένθυση 20x απο την εικόνα 48) και του UCGEL (αριστερά, μεγέθυνση 20x από την εικόνα 68).

Συζήτηση

Το PRP είναι χρήσιμο εργαλείο για την ιατρική καθώς μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλαπλές παθήσεις. Η τεχνική και το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την ανάπτυξη του PRP είναι ο βασικός παράγοντας για την ποιότητα αυτού του προϊόντος και κατά συνέπεια της αποτελεσματικότητάς του.

Σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιήθηκαν μονάδες από ομφαλοπλακουντιακό και περιφερικό αίμα για την ανάπτυξη του PRP. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν βασισμένη στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί η ΕΛ.Τ.ΟΠΑ. για την παρασκευή PRP. Συνολικά παρασκευάστηκαν 22 μονάδες PRP από ομφαλοπλακουντιακό αίμα, τα αποτελέσματα των μονάδων PRP αυτής της εργασίας δεν διαφέρουν πολύ από αυτά που προέκυψαν από το πρωτόκολλο που ανέπτυξε η ΕΛ.Τ.ΟΠΑ το οποίο περιγράφηκε νωρίτερα. Συγκεκριμένα, η ανάκτηση και ο απόλυτος αριθμός αιμοπεταλίων στα PRP των δύο ερευνών δεν φαίνεται να έχουν σημαντικές διαφορές, όμως όσο αφορά την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων, στην παρούσα έρευνα οι μονάδες PRP με τελική συγκέντρωση άνω του $1400 \cdot 10^3$ PLTs/μl θεωρούνταν αποδεκτές σε σχέση με την έρευνα των Mallis et al. όπου το $1400 \cdot 10^3$ PLTs/μl είναι το άνω όριο αναφοράς (Mallis, et al. 2019).

Όπως αναφέρθηκε από την αρχή, συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 39 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την παρασκευή 22 μονάδων PRP. Αυτό σημαίνει ότι πολλές από τις 39 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος ενώθηκαν μεταξύ τους για την δημιουργία μεγαλύτερων σε όγκο μονάδων αίματος οι οποίες στη συνέχεια επεξεργάστηκαν για να παραχθεί το PRP. Κριτήριο για την ένωση δυο μονάδων είναι οι ομάδες αίματος ABO οι οποίες πρέπει να είναι ίδιες στις δύο μονάδες αίματος που πρόκειται να ενωθούν. Σε αυτή την έρευνα όλες οι μονάδες που ενώθηκαν ήταν συμβατές κατά ABO. Κάποιες από τις μονάδες ήταν ασύμβατες ως προς το αντιγόνο Rhesus D. Δηλαδή έτυχε κάποιες μονάδες Rhesus (+) να ενωθούν με μονάδες Rhesus (-). Το αποτέλεσμα ήταν η νέα μονάδα που προέκυψε από αυτή την ένωση να είναι Rhesus (+).

Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στις συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης στα PRP του περιφερικού και του ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Συγκεκριμένα οι συγκέντρωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε στα PL του περιφερικού και ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Η συγκέντρωση στο PBPL ήταν αρκετά υψηλότερη από αυτή στο UCPL το οποίο ήταν μη αναμενόμενο καθώς, το UCPL προερχόταν από PRP με πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση αιμοπεταλίων.

Στο δεύτερο στάδιο αυτής της έρευνας, το PRP εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη μεσεγχυματικών κυττάρων βαρτονείου γέλης. Στην πρώτη συνθήκη τα WJ-MSCs αναπτύσσονταν παρουσία PBPL medium και UCPL medium. Στην δεύτερη συνθήκη τα WJ-MSCs αναπτύσσονταν κάτω από την γέλη αιμοπεταλίων (PG) η οποία σχηματίστηκε μετά από την προσθήκη γλυκονικού ασβεστίου στα UCPL και PBPL. Στην τρίτη συνθήκη τα κύτταρα αναπτύσσονταν επάνω στην γέλη αιμοπεταλίων μαζί με θρεπτικό υλικό 20%.

Ένα από τα κύρια ευρήματα αυτής της έρευνας είναι ότι στις πρώτες δύο συνθήκες τα κύτταρα αναπτύσσονταν για περισσότερο διάστημα στο PBPL medium και όταν βρισκόντουσαν κάτω από την γέλη αιμοπεταλίων. Δηλαδή τα κύτταρα παρουσίαζαν καλύτερη ανάπτυξη όταν το PL και το PG προερχόταν από περιφερικό αίμα. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με άλλες μελέτες που δοκίμασαν την ανάπτυξη MSCs παρουσία PBPL και UCPL. Στην ίδια μελέτη μετά από ποσοτικοποίηση των αυξιτικών παραγόντων, βρέθηκε ότι το PBPL είχε συγκέντρωση σε αυξιτικούς παράγοντες μεγαλύτερη από το UCPL (Christou, et al. 2018). Αυτό το εύρημα δίνει την εξήγηση γιατί τα κύτταρα αναπτύχθηκαν καλύτερα στο PBPL medium και στο PBGEL.

Όσο αφορά την τρίτη συνθήκη, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον ανοσοφθορισμό, έδειξαν ότι τα κύτταρα είχαν προσκολληθεί κανονικά επάνω στην γέλη και ότι αναπτύσσονταν ικανοποιητικά και στα δύο ειδών PG (PBPGEL, UCPGEL). Η προσκόλληση των WJ-MSCs επάνω στην γέλη οφείλεται στα RGD biding motifs. Αυτά είναι μικρά μόρια τριών πεπτιδίων (αργινίνη, γλυκίνη, ασπρατικό οξύ) τα οποία βρίσκονται στο μόριο του ινοδογόνου και βοηθούν στην προσκόλληση των κυττάρων (Nieberler, et al. 2017). Όσο αφορά την ικανότητα των κυττάρων αυτών να αναπτύσσονται με τον ίδιο ρυθμό επάνω στο PBPGEL και στο UCPGEL, το γεγονός ότι στα wells μαζί με τα κύτταρα είχε προστεθεί θρεπτικό υλικό 20% ενδέχεται να είναι ο λόγος για τον οποίο δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στην ανάπτυξη των κυτταροκαλλιέργειων επάνω στο PBGEL και στο UCGEL σε σχέση με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στις προηγούμενες δύο συνθήκες.

Τέλος, πριν την εφαρμογή της πρώτης συνθήκης και της πρώτης εφαρμογής της δεύτερης και τρίτης συνθήκης παρατηρήσαμε ότι κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των MSCs η ζωτικότητα τους ήταν μειωμένη έως και πάνω από 50%. Αυτό οφείλεται ότι οι συγκεκριμένες μετρήσεις καθυστέρησαν να πραγματοποιηθούν μετά την συλλογή του δείγματος με αποτέλεσμα να πεθάνει ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων μέχρι την στιγμή της μέτρησης.

Περαιτέρω πειράματα που θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν είναι η ανάλυση της γέλης αιμοπεταλίων κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καθώς και η ανάλυση της διαφοροποίησης των WJ-MSCs όταν αναπτύσσονται στις παραπάνω συνθήκες. Οι Shirzad et al.

παρατήρησαν ότι τα MSCs παρουσία του PBPL διαφοροποιούνταν κατά κύριο λόγο σε οστεοκύτταρα και τα MSCs παρουσία UCPL διαφοροποιούνταν κατά κύριο λόγο προς χονδροκύτταρα (Shirzad, et al. 2017).

Συμπεράσματα

Το PRP από περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα έχει συγκεκριμένη διαδικασία παρασκευής η οποία αν ακολουθηθεί όπως υποδεικνύουν τα ανάλογα πρωτόκολλα το τελικό προϊόν θα είναι το επιθυμητό. Όσο αναφορά τις διαφορές του PRP από το περιφερικό αίμα και από το ομφαλοπλακουντιακό, βρέθηκε ότι διαφέρουν ως προς την συγκέντρωση τους σε πρωτεΐνες ενώ και τα δύο μπόρεσαν να σχηματίσουν γέλη αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη μισής ή ίσης ποσότητας γλυκονικού ασβεστίου. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι στις κυτταροκαλλιέργειες των MSCs, τα κύτταρα παρουσία medium ή gel από PRP περιφερικού αίματος παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη από αυτά που αναπτύσσονταν παρουσία medium ή gel από PRP από ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Αναφορές

- Chen, Yuanying, Yefeng Yuan, and Wei Li. "Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from α -granules." *Bioscience Report* 38, no. 5 (2018).
- Dohan Ehrenfest, David M. , Lars Rasmusson, and Tomas Albrektsson. "Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)." *Trends in Biotechnology* 27, no. 3 (2009): 158-167.
- Kossev, Pencho, and Tsvetan Sokolov. *Platelet-rich Plasma (PRP) in Orthopedics and Traumatology — Review*. IntechOpen, 2015.
- Akşahin , E, et al. "The comparison of the effect of corticosteroids and platelet-rich plasma (PRP) for the treatment of plantar fasciitis." *Arch Orthop Trauma Surg* 132, no. 6 (2012): 781-785.
- Alissa , R, M Esposito , M Esposito , K Horner , and R Oliver . "The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomised clinical trial." *European Journal of Implantology* 3, no. 2 (2010): 121-134.
- Alves, Rubina, and Ramon Grimalt. "A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification." 4, no. 1 (2018): 18-24.
- Amable, Paola Romina , et al. "Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors." *Stem Cell Research & Therapy* 4, no. 3 (2013).
- Andrew, Maureen, Barbara Schmidt, Lesley Mitchell, Bosco Paes, and Frederick Ofosu. "Thrombin generation in newborn plasma is critically dependent on the concentration of prothrombin." *Thrombosis and Hemostasis*, 1990: 27-30.
- Atala , A. "Regenerative medicine strategies." *Journal of Pediatric Surgeries* 47, no. 1 (2012): 17-28.
- Atala, Anthony , and Gabor Forgacs. "Three-Dimensional Bioprinting in Regenerative Medicine: Reality, Hype, and Future." *Stem Cells Translational Medicine* 8, no. 8 (2019): 744-745.
- Bain, Barbara J., Imelda Bates, Mike A. Laffan, and Mitchell S. Lewis. *Dacie and Lewis Πρακτική Αιματολογία*. 11η έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Λαγός Δημήτριος, 2015.
- Bassiouny, M.R., F. El-Chennawi, A.K. Mansour, S. Yahia, and A. Darwish. "Optimal method for collection of umbilical cord blood: an Egyptian trial for a public cord blood bank." *Transfusion*, 2015: 1263-1268.
- Basu, Debdatta, and Rajendra Kulkarni. "Overview of blood components and their preparation." *Indian Journal of Anaesthesia*, September-October 2014: 529-537.
- Beheshtiha, Seyed Hamed Shirazi , Mohammad Abarkar, and Seyedeh Alaleh Anvar. "Standardization and modification techniques of platelet-rich plasma (PRP) preparation in rabbit." *International Clinical Pathology Journal*, 2015.
- Beitze, Knut , et al. "US Definitions, Current Use, and FDA Stance on Use of Platelet-Rich Plasma in Sports Medicine." *Journal of Knee Surgery* 28, no. 01 (2015): 029 - 034.
- Cervelli, Valerio , et al. "Application of Platelet-Rich Plasma in Plastic Surgery: Clinical and In Vitro Evaluation." *Tissue Engineering* 15, no. 4 (2009): 625-634.

Cervellin, M. , L. de Girolamo, C. Bait, M. Denti, and P. Volpi. "Autologous platelet-rich plasma gel to reduce donor-site morbidity after patellar tendon graft harvesting for anterior cruciate ligament reconstruction: a randomized, controlled clinical study." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20, no. 1 (2012): 114-120.

Dhurat, Rachita , and MS Sukesh. "Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective." *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 7, no. 4 (2014): 189-197.

Dinerstein, Chuck. *American Council on Science and Health*. 2019.
<https://www.acsh.org/news/2019/02/12/platelet-rich-plasma-profitable-how-well-does-it-work-13806> (accessed Δεκέμβριος 2019).

Dohan Ehrenfest, David M. , et al. "In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13, no. 7 (2012): 1131-1137.

Dzobo, Kevin , et al. "Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine." *Stem Cells International*, 2018.

Everts, Peter. *Emcyte Corporation. White blood cells in platelet rich plasma, the good, bad, and ugly?* 08 2017. <https://www.emcyte.com/blog/white-blood-cells-in-platelet-rich-plasma-the-good-bad-and-ugly.html> (accessed 04 24, 2020).

Gelmetti, Alessandra , Noemi Greppi, Sophie Guez, Francesca Grassi, Paolo Rebutta, and Gianluca Tadini. "Cord blood platelet gel for the treatment of inherited epidermolysis bullosa." *Transfusion and Apheresis Science* 57, no. 3 (2018): 370-373.

Hao, Tianzhi , et al. "[Autogenous platelet-rich plasma gel with acellular xenogeneic dermal matrix for treatment of deep II degree burns]." *Europe PMC* 24, no. 6 (2010): 647-649.

Harmon, Kimberly G. , and Ashwin L. Rao. "The use of platelet-rich plasma in the nonsurgical management of sports injuries: hype or hope?" *Hematology* 1 (2013): 620-626.

Howard, Martin R., and Peter J. Hamilton. *Αιματολογία εικονογραφημένο εγχρωμο εγχειρίδιο*. 2η Ελληνική. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνουν Α.Ε, 2004.

Jones, Ian A., Ryan C. Togashi, and C. Thomas Vangsness jr. "The Economics and Regulation of PRP in the Evolving Field of Orthopedic Biologics." *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 11, no. 4 (2018): 558 - 565.

Kindt, Thomas J., Glodby A. Richard, and Osborne A. Barbara. *KYBY ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ*. 2η Ελληνική. Broken Hill Publishers, 2013.

Kon, Elizaveta , et al. "Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model." *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2010.

Lana, Jose Fabio , Alex Macedo, Icaro Lanzoni Gallo Ingraio, Stephany Cares Huber, Gabriel Silva Santos, and Maria Helena Andrade Santana. "Leukocyte-rich PRP for knee osteoarthritis: Current concepts." *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 2019: 179-182.

- Lana, José Fábio, et al. "Leukocyte-rich PRP versus leukocyte-poor PRP - The role of monocyte/macrophage function in the healing cascade." *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 2019: 7-12.
- Longo, Valentina , Paolo Rebulli, Simonetta Pupella, Lello Zolla, and Sara Rinalducci. "Proteomic characterization of platelet gel releasate from adult peripheral and cord blood." *Proteomics. Clinical Application* 10, no. 8 (2016): 870-882.
- Lubkowska, A, B Dolegowska, and G Banfi. "Growth factor content in PRP and their applicability in medicine." *J Biol Regul Homeost Agents*, 2012.
- Ludicone, Paola, et al. "Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells." *Journal of Translational Medicine*, 2014.
- Machado, Edilson Silva , et al. "Turn Down - Turn Up: A Simple and Low-Cost Protocol for Preparing Platelet-Rich Plasma ." *Clinics (Sao Paulo)*, 2019.
- Mahla, Ranjeet Singh . "Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics." *International Journal of Cell Biology*, 2016: 1-24.
- Mallis, Panagiotis, et al. "Short Term Results of Fibrin Gel Obtained from Cord Blood Unit: A Preliminary in Vitro Study." 6, no. 3 (2019).
- Manafi, Ali , Kamran Kaviani far, Masoud Moradi, Amir Manafi, and Farzad Manafi. "Effects of Platelet-Rich Plasma on Cartilage Grafts in Rabbits as an Animal Model." *World Journal of Plastic Surgery* 1, no. 2 (2012): 91-98.
- Mao, Angelo S. , and David J. Mooney. "Regenerative medicine: Current therapies and future directions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, no. 47 (2015): 14452-14459.
- Marck, Roos E. , et al. "The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: A randomized, double-blind, intra-patient controlled study." *Wound Repair and Regeneration* 24, no. 4 (2016): 712-720.
- Mathew, Ansuja P., Robin Augustine, Nandakumar Kalarikal, and Sabu Thomas. "Tissue Engineering: Principles, Recent Trends, and the Future." In *Nanomedicine and Tissue Engineering*. 2016.
- Mei-Dan, O, L Laver, M Nyska, and G Mann. "[Platelet rich plasma-a new biotechnology for treatment of sports injuries]." 150, no. 5 (2011).
- Mescher, Anthony L. *Junqueira's Βασική Ιστολογία*. BROKEN HILL Pyblishers Ltp, 2014.
- Messori, Michel Reis , et al. "A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats." *ICI World of Journals* 8, no. 3 (2011): 299-304.
- Monagle, P, et al. "Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories." *Thrombosis and Hemostasis*, 2006: 362-372.
- Murphy , SV, and A Atala . "3D bioprinting of tissues and organs." *Nature Biotechnology* 32, no. 8 (2014): 773-785.
- Nagata, Maria J. H., et al. "Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits." *European Journal of Dentistry*, 2010: 395-402.

- Nieberler, Markus, et al. "Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer." *Cancers*, september 4, 2017.
- Noh, Kyu-Cheol , et al. "Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma-Derived Growth Factors Enhance Human Fibroblast Proliferation In Vitro." *Clinics in Orthopedic Surgery* 10, no. 2 (2018): 240-247.
- Parazzi , V., L. Lazzari, and P. Rebullà . "Platelet gel from cord blood: a novel tool for tissue engineering." *Platelets* 21, no. 7 (2010): 549-554.
- Pavlovic, Voja, Milan Ciric, Vladimir Jovanovic, and Predrag Stojanovic. "Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components." *Open Med (Wars)*, 2016: 242-247.
- Piccin, Andrea , et al. "Impressive tissue regeneration of severe oral mucositis poststem cell transplantation using cord blood platelet gel." *Transfusion* 57, no. 9 (2017): 2220-2224.
- Pochini, Alberto de Castro, et al. "Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns." *Einstein (Sao Paulo)*, 2016: 391-397.
- Rajabzadeh, Nassim , Ezzatollah Fathi, and Raheleh Farahzadi. "Stem cell-based regenerative medicine." *Stem Cell Investigation*, 2019.
- Rebulla, Paolo, et al. "Multicentre standardisation of a clinical grade procedure for the preparation of allogeneic platelet concentrates from umbilical cord blood." *Blood Transfusion* 14, no. 1 (2016): 73-79.
- Rijal, Girdhari . "The decellularized extracellular matrix in regenerative medicine." *Regenerative Medicine* 12, no. 5 (2017).
- Rosso, Lorenzo, et al. "Pleural tissue repair with cord blood platelet gel." *Blood Transfusion*, 2014: s235–s242.
- Santosh, P . "Impacted Mandibular Third Molars: Review of Literature and a Proposal of a Combined Clinical and Radiological Classification." *Ann Med Health Sci Res* 5, no. 4 (2015): 229-234.
- Shirzad, Negin, et al. "Umbilical Cord Blood Platelet Lysate as Serum Substitute in Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells." *Cell Journal*, 2017: 403-414.
- Sindici , E, et al. "Treatment of Oral Lesions in Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Case Series of Cord Blood Platelet Gel and Low-level Laser Therapy." *Acta Dermato-Venereologia* 97, no. 3 (2017): 383-384.
- Sindici, Ezio , et al. "Cord blood platelet gel alone or in combination with photobiomodulation therapy for the treatment of oral ulcerations in patients with epidermolysis bullosa: a pilot clinical comparative study." *Photodermatol, Photoimmunol & Photomed* 34, no. 4 (2018): 269-272.
- Stammers, Alfred H. , et al. "Autologous Platelet Gel: Fad or Savoir? Do We Really Know?" *the Journal of ExtraCorporeal Technology* 41, no. 4 (2009): 25-30.
- Stone, William L., and Matthew Varacallo. *Physiology, Growth Factor*. StatPearls, 2020.
- Strauss, T, R Sidlik-Muskatell, and G Kenet. "Developmental hemostasis: primary hemostasis and evaluation of platelet function in neonates." *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 2011: 301-304.

Sykova, Eva , and Serhiy Forostyak. "Stem Cells in Regenerative Medicine." *Laser Therapy* 22, no. 2 (2013): 87-92.

Tadini, Gianluca , et al. "Preliminary evaluation of cord blood platelet gel for the treatment of skin lesions in children with dystrophic epidermolysis bullosa." *Blood Transfusion* 13, no. 1 (2015): 153-158.

Tadini, Gianluca , Lidia Pezzani, Stefano Ghirardello, Paolo Rebutta, Susanna Esposito, and Fabio Mosca. "Cord blood platelet gel treatment of dystrophic recessive epidermolysis bullosa." *BMJ Case Reports*, 2015.

Tan, Kok K., Kok Z. Tang, and Sunan Huang. "Devices for Umbilical Cord Blood Collection." *Recent Patents on Engineering* , 2007: 89-94 .

Toulon, P, et al. "Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. Results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges." *Thrombosis and Hemostasis*, 2016: 9-16.

Ugboko, K., Vincent I. Olufemi, and Folusho J. Owotade. "Can autologous platelet-rich plasma gel enhance healing after surgical extraction of mandibular third molars?" *J Oral Maxillofac Surg.* 69, no. 9 (2011): 2305-2310.

Unal, Mehmet . *Platelet-Rich Plasma in Burn Treatment*. IntechOpen, 2017.

Vijayavenkataraman, Sanjairaj , Wei-Cheng Yan, Wen Feng Lu, Chi-Hwa Wang, and Jerry Ying Hsi Fuh. "3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine." *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018: 296-332.

Volpe, Pietro, et al. "Efficacy of cord blood platelet gel application for enhancing diabetic foot ulcer healing after lower limb revascularization." *Seminars in Vascular Surgery*, 2017: 106-112.

Weibrich, Gernot , and Wilfried K. G. Kleis. "Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma." *Clinical Oral Implant Research* 13, no. 4 (2002): 437-443.

Wu, Peter I-Kung , Robert Diaz Diaz, and Joanne Borg-Stein. "Platelet-Rich Plasma." *Platelet-Rich Plasma. Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 27, no. 4 (2016): 825 - 853.

Yi, Sheng , Fei Ding, Leilei Gong , and Xiaosong Gu. "Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine." *Current Stem Cell Research & Therapy* 12, no. 3 (2017): 233-246.

Yin, Wenjing , et al. "Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model." *Experiment and Therapeutic Medicine* 14, no. 3 (2017): 2060-2070.

Yu, Yaling , Ali Alkhawaji, Yuqiang Ding, and Jin Mei. "Decellularized scaffolds in regenerative medicine." *Oncotarget* 7, no. 36 (2016): 58671-58683.

Zimmer Biomet. *Zimmer Biomet*. (accessed 2020).

Τσεβρενη, Ιπποκράτη, and Ειρήνη Κοντοπούλου - Γρίβα. *ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ*. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2013.