

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Χρούσος

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΟΣ (EX VIVO)
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

ΜΑΡΙΑ ΘΕΟΔΟΣΑΚΗ

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ·
ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΪΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

Ημερομηνία αίτησης έναρξης διδακτορικής διατριβής: 15-5-02

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 24-9-02

Ημερομηνία ορισμού του θέματος της διατριβής: 28-11-02

Ημερομηνία κατάθεσης 1^{ης} προόδου: 1-3-04

Ημερομηνία κατάθεσης 2^{ης} προόδου: 22-3-10

Ημερομηνία κατάθεσης 3^{ης} προόδου: 7-2-11

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 16-11-12

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Γ. Χρούσος , Καθηγητής (Επιβλέπον μέλος)

Ε. Καναβάκης, Καθηγητής

Α. Καττάμης, Αναπλ. Καθηγητής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γ. Χρούσος, Καθηγητής

Ε. Καναβάκης, Καθηγητής

Σ. Κίτσιου-Τζέλλη, Καθηγήτρια

Α. Καττάμης, Αναπλ. Καθηγητής

Π. Παναγιωτίδης, Αναπλ. Καθηγητής

Π. Τσιριγώτης, Επ. Καθηγητής

Α. Σολδάτου, Επ. Καθηγήτρια

Ημερομηνία παρουσίασης διδακτορικής διατριβής: 27-2-2013

Βαθμός διδακτορικής διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών: Καθηγητής, Α.Μ. Δημόπουλος

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο:	Θεοδοσάκη Μαρία
Ημερομηνία Γέννησης:	14 Ιανουαρίου 1967
Τόπος Γέννησης:	Άγ. Νικόλαος, Νομού Λασιθίου
Οικογενειακή κατάσταση:	Άγαμη, 2 παιδιά

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

12/02 έως σήμερα Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία», Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Θέμα: «Απομόνωση και εξωσωματικός (ex vivo) πολλαπλασιασμός στρωματικών στελεχιαίων κυττάρων από τον ανθρώπινο μυελό των οστών»

9/88 – 4/95 Πτυχίο Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας
Βαθμός: Λίαν Καλώς (7.39)

2/85 - 12/88 Πτυχίο Ραδιολογίας-Ακτινολογίας
Τ.Ε.Ι Αθηνών, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Ραδιολογίας-Ακτινολογίας
Βαθμός: 8

6/84 Αποφοίτηση από τη Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση
Βαθμός: 18,5

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ Αγγλικά

- First Certificate in English, University of Cambridge
- Certificate in Advanced English, University of Cambridge

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

6/97 έως σήμερα Εργάζομαι ως Βιολόγος, κατέχοντας οργανική θέση του κλάδου ΠΕ Βιολόγων, στο Εργαστήριο της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία».

4/92-6/97 Εργάστηκα ως Τεχνολόγος Ραδιολογίας – Ακτινολογίας, κατέχοντας οργανική θέση του κλάδου ΤΕ Ραδιολόγων-Ακτινολόγων, στο τμήμα Αξονικής Τομογραφίας, Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία».

ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 1: Goussetis E, Peristeri I, Kitra V, Vessalas G, Paisiou A, Theodosaki M, Petrakou E, Dimopoulou MN, Graphakos S. HLA-matched sibling stem cell transplantation in children with β -thalassemia with anti-thymocyte globulin as part of the preparative regimen: the Greek experience. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47(8): 1061-6
- 2: Goussetis E, Peristeri I, Kitra V, Papassavas AC, Theodosaki M, Petrakou E, Spiropoulos A, Paisiou A, Soldatou A, Stavropoulos-Giokas C, Graphakos S. Low usage rate of banked sibling cord blood units in hematopoietic stem cell transplantation for children with hematological malignancies: implications for directed cord blood banking policies. *Blood Cells Mol Dis*. 2011; 46(2): 177-81
- 3: Spiropoulos A, Theodosaki M, Stefanaki K, Paterakis G, Tzetzis M, Giannikou K, Petrakou E, Dimopoulou MN, Papassotiriou I, Roma ES, Kanavakis E, Graphakos S, Goussetis E. Rapid clinical-scale propagation of mesenchymal stem cells using cultures initiated with immunoselected bone marrow CD105+ cells. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(9): 1983-8
- 4: Goussetis E, Peristeri I, Kitra V, Traeger-Synodinos J, Theodosaki M, Psarra K, Kanariou M, Tzortzatos-Stathopoulou F, Petrakou E, Fylaktou I, Kanavakis E, Graphakos S. Successful long-term immunologic reconstitution by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation cures patients with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126(2): 392-4
- 5: Goussetis E, Spiropoulos A, Theodosaki M, Stefanaki K, Petrakou E, Graphakos S. Myofibroblasts generated in culture from sclerotic skin lesions of a patient with extensive chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation are of recipient origin. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(9): 1285-7
- 6: Goussetis E, Petrakou E, Theodosaki M, Kitra V, Peristeri I, Vessalas G, Dimopoulou MN, Spiropoulos A, Papassavas AC, Stavropoulos-Giokas C, Graphakos S. Directed sibling donor cord blood banking for children with beta-thalassemia major in Greece: usage rate and outcome of transplantation for HLA-matched units. *Blood Cells Mol Dis*. 2010; 44(2): 107-10
- 7: Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, Leontiadis E, Plessas N, Theodosaki M, Graphakos S, Cokkinos DV. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007; 69(6): 773-81
- 8: Goussetis E, Manginas A, Koutelou M, Peristeri I, Theodosaki M, Kollaros N, Leontiadis E, Theodorakos A, Paterakis G, Karatasakis G, Cokkinos DV, Graphakos S. Intracoronary infusion of CD133+ and CD133-CD34+ selected autologous bone marrow progenitor cells in patients with chronic ischemic cardiomyopathy: cell isolation, adherence to the infarcted area, and body distribution. *Stem Cells* 2006; 24(10): 2279-83

- 9:** Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Tsecoura C, Graphakos S. In vitro identification of a cord blood CD133+CD34-Lin+ cell subset that gives rise to myeloid dendritic precursors. Stem Cells 2006; 24(4): 1137-40
- 10:** Goussetis E, Spiropoulos A, Theodosaki M, Paterakis G, Peristeri I, Kitra V, Petrakou E, Soldatou A, Graphakos S. Culture of bone marrow CD105+ cells allows rapid selection of pure BM-stromal cells for chimerism studies in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2005; 36(6): 557-9
- 11:** Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Stefanaki K, Tsecoura C, Papassarandis C, Graphakos S. Kinetics of quiescent cord blood stem/progenitor cells with high proliferative potential in stem-cell expansion culture. Cytotherapy 2003; 5(6): 500-8
- 12:** Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Peristeri J, Petropoulos D, Kitra V, Papassarandis C, Graphakos S. A functional hierarchy among the CD34+ hematopoietic cells based on in vitro proliferative and differentiative potential of AC133+CD34(bright) and AC133(dim)/-CD34+ human cord blood cells. J Hematother Stem Cell Res. 2000; 9(6): 827-40
- 13:** Peristeri J, Kitra V, Goussetis E, Petropoulos D, Theodosaki M, Kattamis A, Graphakos S. Haematopoietic stem cell transplantation for the management of haemoglobinopathies in Greek patients. Transfus Sci. 2000; 23(3): 263-4

***Είναι σπουδαίο να φρονείς αυτά που πρέπει
όταν σε βρίσκουν συμφορές***

Ισοκράτης 436-338 π.Χ.

***στη Λήδα και τον Αλέξανδρο
μα και σε όλα τα παιδιά
ελπίζοντας ότι έστω και αργοπορημένα
θα μπορέσουμε να τους μιλήσουμε λίγο
για τα Σωστά και τα Μεγάλα***

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1. Στελεχιαία κύτταρα (Stem cells)	13
1.1.1. Εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα	15
1.1.2. Επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα	18
1.1.3. Ενήλικα στελεχιαία κύτταρα	19
1.2. ΣΚ του μυελού των οστών	21
1.2.1. Ιστορική αναδρομή	21
1.2.2. Ονοματολογία	23
1.2.3. Απομόνωση και πολλαπλασιασμός των ΣΣΚ	25
1.2.4. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ΣΣΚ	27
1.2.5. Πληθυσμοί των ΣΣΚ	29
1.2.6. Διαφοροποίηση των ΣΣΚ	31
1.2.7. Πλαστικότητα και πιθανοί μηχανισμοί πλαστικότητας	32
1.2.8. Ετερογένεια των ΣΣΚ	34
1.2.9. Πηγές των ΜΣΚ	35
1.2.10. Θέσεις (niches) των ΜΣΚ in vivo	35
1.2.11. Τα Περικύτταρα	36
1.2.12. Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των ΜΣΚ	37
1.2.13. Ο ρόλος των ΣΣΚ στην ανάπτυξη των ιστών	41
1.3. Κλινικές εφαρμογές των ΣΣΚ	42
1.3.1. ΣΣΚ και μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων	42
1.3.2. ΣΣΚ και Νόσος Μοσχεύματος κατά Ξενιστή	44
1.3.3. ΣΣΚ και Αναγεννητική Ιατρική	45
1.4. Σκοπός	48
1.5. Σχεδιασμός Μελέτης	48
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	50
2.1. Απομόνωση των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του ΜΟ	50
2.2. Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός	51
2.2.1. Επιλογή των CD34 ⁺ κυττάρων	52
2.2.2. Επιλογή των CD133 ⁺ κυττάρων	53

2.2.3. Επιλογή των CD105 ⁺ κυττάρων	55
2.2.4. Επιλογή των CD271 ⁺ κυττάρων	56
2.3. Κυτταρομετρία ροής	58
2.4. Ανοσοκυτταροχημεία	63
2.5. Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των ανοσοεπιλεγμένων κυττάρων	66
2.5.1. Πολλαπλασιασμός των ΣΣΚ	66
2.5.2. Διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα-οστεοκύτταρα-χονδροκύτταρα	67
2.5.3. Διαφοροποίηση σε ενδοθηλιακά κύτταρα	68
2.6. Μοριακή ανάλυση των διαφοροποιημένων κυττάρων	69
2.6.1. Απομόνωση ολικού RNA	69
2.6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του RNA	71
2.6.3. PCR - Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription-PCR, RT - PCR)	72
2.6.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	77
2.7. Επιλογή των CD133⁺ και CD133⁻CD34⁺ κυττάρων για κλινική Χρήση	80
2.7.1. Επιλογή των CD133 ⁺ κυττάρων	83
2.7.2. Επιλογή των CD133 ⁻ CD34 ⁺ κυττάρων	84
2.8. Επιλογή ασθενών-Σχεδιασμός μελέτης	85
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
3.1. Συλλογή και επεξεργασία του μυελού των οστών	87
3.2. Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού των ΣΣΚ	89
3.3. Φαινοτυπική ανάλυση των καλλιεργημένων κυττάρων	91
3.4. Διαφοροποίηση των ΣΣΚ	93
3.5. Διαφοροποίηση σε ενδοθηλιακά κύτταρα	94
3.6. Συμπεράσματα	96
3.7. Κλινικές εφαρμογές	97
3.7.1. Απομόνωση και εξωσωματικός πολλαπλασιασμός αλλογενών ΣΣΚ για την αντιμετώπιση της GVHD	97
3.7.2. Απομόνωση και έγχυση αυτόλογων CD133 ⁺ και CD34 ⁺ κυττάρων για τη θεραπεία ασθενών με χρόνια ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια	97

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	102
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	112
6. ABSTRACT	114
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	116

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία». Την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση διεκπεραίωσε η κ. Κ. Στεφανάκη, Διευθύντρια στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του νοσοκομείου, ενώ η κυτταρομετρική μελέτη έγινε στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Γ. Γεννηματάς», υπό την επίβλεψη του Αιματολόγου, Διευθυντή, κ. Γ. Πατεράκη. Τους ευχαριστώ θερμά.

Η κλινική μελέτη που αφορά στους ασθενείς με χρόνια ισχαιμική καρδιομυοπάθεια πραγματοποιήθηκε από την Α΄ Καρδιολογική Κλινική του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου, με τη συμμετοχή και της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών και αναφέρεται στη διατριβή ως άμεση κλινική εφαρμογή των εργαστηριακών ευρημάτων.

Ολοκληρώνοντας το πόνημα αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην υλοποίησή του.

Καταρχάς, ευχαριστώ τις νέες συναδέλφους Α. Σπυροπούλου, Α. Καραγιαννίδου και Ι. Βαρελά για τη συνεργασία και την προθυμία τους να με βοηθήσουν όποτε το χρειάζομαι. Όντας η μοναδική εργαζόμενη στο εργαστήριο της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών για αρκετά χρόνια, αναμφισβήτητα θεωρώ καλή τύχη την ευκαιρία που μου δόθηκε να τις καλωσορίσω στο χώρο αυτό και να επωφεληθώ από το δικό τους τρόπο εργασίας και σκέψης.

Ιδιαίτερως, ευχαριστώ τη βιολόγο Ε. Πετράκου, η παρουσία της οποίας στο εργαστήριο αποδείχτηκε καταλυτική και αναντικατάστατη, αφού επωμιζόμενη με μοναδικό ζήλο και αυτοθυσία το μεγαλύτερο μέρος των καθημερινών υποχρεώσεων, με απάλλαξε από μεγάλο φόρτο εργασίας, δίνοντάς μου έτσι τη δυνατότητα να ασχοληθώ με την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συγγραφή της μελέτης. Η αστείρευτη ενεργητικότητα, ο επαγγελματισμός και η συνέπεια που τη διακρίνουν είναι παραδειγματικά και σπάνια.

Επίσης, ευχαριστώ όλους τους γιατρούς της Μονάδας για τη διάθεση των δειγμάτων μυελού των οστών και κυρίως το διευθυντή κ. Σ. Γραφάκο για την ενθάρρυνση και την ανοχή του. Ακόμα, τον Καθηγητή κ. Γ. Χρούσο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ ερευνητικά στην Α΄ Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητή κ. Ε. Καναβάκη και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Α. Καττάμη, για την

κατανόηση που έδειξαν όσον αφορά το χρόνο που τελικά διήρκεσε η προσπάθεια αυτή.

Τέλος, δε θα ήταν δυνατόν να παραλείψω τον εμπνευστή και επιστημονικό υπεύθυνο της διατριβής, Παιδίατρο-Αιματολόγο, Διευθυντή στη Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, κ. Ε. Γουσέτη, που αν και κατεξοχήν κλινικός γιατρός, και μάλιστα σε πεδίο με ιδιαίτερα αυξημένες απαιτήσεις σε επιστημονική κατάρτιση αλλά και ψυχικά αποθέματα, αποτελεί συνεχώς τον κινητήριο μοχλό του εργαστηρίου. Το πάθος του για την έρευνα, την προαγωγή αλλά και τη μετάδοση της γνώσης, τον καθιστούν εξαιρετο δάσκαλο που ωθεί όλους μας να γίνουμε καλύτεροι.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΣΚ: Αιμοποιητικά Στελεχιαία Κύτταρα
ΔΚ: Δενδριτικά Κύτταρα
αΔΚ: ανώριμα Δενδριτικά Κύτταρα
ΚΔ: Κυτταρικοί Διπλασιασμοί
ΜΑ: Μονοκλωνικό Αντίσωμα
ΜΜΜΟ: Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών
ΜΟ: Μυελός των Οστών
ΜΣΚ: Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα
ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
ΟΠΑ: Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα
ΣΚ: Στελεχιαία Κύτταρα
ΣΣΚ: Στρωματικά Στελεχιαία Κύτταρα
ΩΚΚ: Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο
ALP: Alkaline Phosphatase
APAAP: Alkaline Phosphatase - Anti-Alkaline Phosphatase
BM : Bone Marrow
hBMSCs: human Bone marrow – derived Multipotent Stem Cells
CFUs: Colony-Forming-Units
COL2A1: Collagen 2A1
GAPDH=Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GVHD: Graft Versus Host Disease
aGVHD: acute- Graft Versus Host Disease
cGVHD: chronic- Graft Versus Host Disease
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HSC: Hematopoietic Stem Cell
IDO: Indoleamine 2,3-Dioxygenase
LPL=Lipoprotein Lipase
MACS: Magnetic Activated Cell Sorting
MAPCs: Multipotent Adult Progenitor Cells
M-CSF: Macrophage - Colony Stimulating Factor
MDSCs: Marrow-Derived Stromal Cells
MIAMI: Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

NK: Natural Killer

PGE₂: Prostaglandin E₂

iPS: induced Pluripotent Stem cells

RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

SSC: Stromal Stem Cells

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

Th: T-helper cells

Tl-201: Θάλλιο-201

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στελεχειαία κύτταρα (Stem cells)

Ο όρος στελεχειαία κύτταρα (ΣΚ) αναφέρεται στα αδιαφοροποίητα εκείνα κύτταρα που εκπληρούν τρία βασικά κριτήρια: Πρώτον, έχουν την ικανότητα της **αυτοανανέωσης** (self-renewal) πραγματοποιώντας συμμετρικές ή ασύμμετρες διαιρέσεις, έτσι ώστε ο αριθμός τους να διατηρείται σταθερός εφ' όρου ζωής. Η συμμετρική διαίρεση υποδηλώνει ότι τα δύο θυγατρικά κύτταρα που παράγονται είναι όμοια και διατηρούν όλα τα χαρακτηριστικά των ΣΚ. Αντιθέτως, η ασύμμετρη διαίρεση έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία θυγατρικών κυττάρων από τα οποία το ένα παραμένει στελεχειαίο, ενώ το άλλο δεσμεύεται προς διαφοροποίηση. Δεύτερον, το κάθε κύτταρο ξεχωριστά –και όχι πληθυσμός κυττάρων- διαθέτει την ικανότητα της **πολυδυναμίας**, δηλαδή τη δυνατότητα παραγωγής πολλών κυτταρικών τύπων. Τρίτον, θα πρέπει να έχουν τη δυνατότητα της **in vivo λειτουργικής ανασύστασης** του ιστού από τον οποίο προέρχονται (Ulloa-Montoya et al, 2005). Τα αιμοποιητικά στελεχειαία κύτταρα (ΑΣΚ) αποτελούν το χαρακτηριστικότερο ίσως παράδειγμα ΣΚ, αφού έχουν τη δυνατότητα της αυτοανανέωσης, το καθένα από αυτά μπορεί να διαφοροποιηθεί σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αίματος και επίσης, μπορούν να μεταμοσχευθούν και να αποκαταστήσουν την αιμοποίηση ασθενών που έχουν υποβληθεί σε μυελοεκκένωση και ανοσοκαταστολή (Serafini et al, 2006).

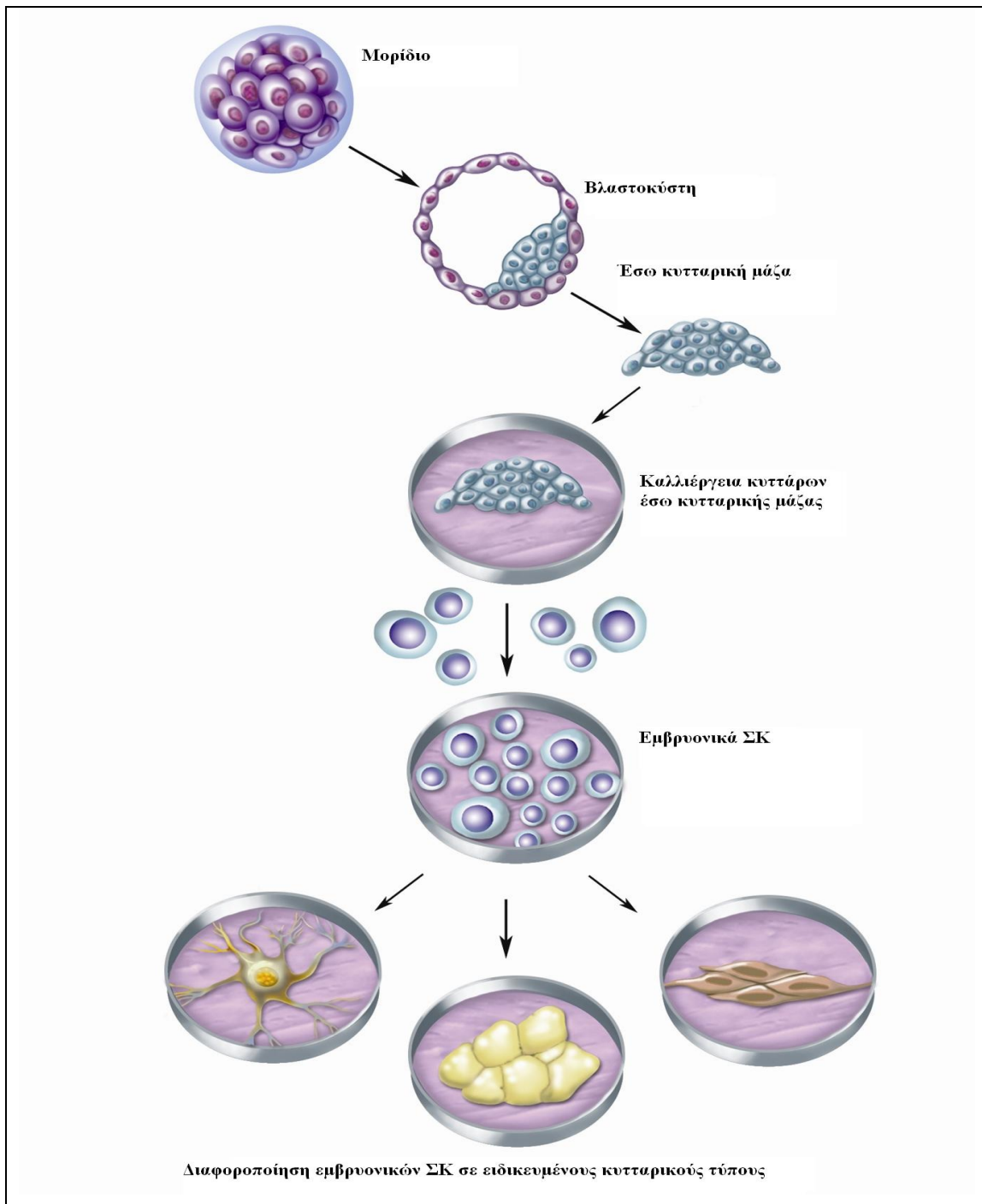
Τα ΣΚ ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης που διαθέτουν χαρακτηρίζονται ως **ολοδύναμα** (totipotent), **πολυδύναμα** (pluripotent) και **πλειοδύναμα** (multipotent).

Ολοδύναμα ΣΚ θεωρούνται το ζυγωτό, καθώς και τα κύτταρα που προκύπτουν κατά τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις μετά τη γονιμοποίηση, μέχρι το στάδιο του μοριδίου (Εικόνα 1.1.). Τα κύτταρα του μοριδίου δεν έχουν υποστεί κανενός είδους διαφοροποίηση. Το καθένα από αυτά έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει οποιοδήποτε κύτταρο του εμβρύου αλλά και των ιστών που το υποστηρίζουν κατά την ανάπτυξή του μέσα στη μήτρα (πλακούντα και ομφάλιου λώρου).

Πολυδύναμα ΣΚ χαρακτηρίζονται τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας (inner cell mass) της βλαστοκύστης (Εικόνα 1.1.). Βλαστοκύστη είναι ο σχηματισμός που δημιουργείται κατά την εξέλιξη του μοριδίου με συνεχιζόμενες μιτωτικές διαιρέσεις και κυτταρικές ανακατατάξεις. Στο στάδιο αυτό εμφανίζεται για πρώτη φορά το φαινόμενο της διαφοροποίησης. Έτσι, τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας προορίζονται να σχηματίσουν όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς, ενώ τα κύτταρα της

περιφερικής στοιβάδας της βλαστοκύστης είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία του πλακούντα και του ομφάλιου λώρου.

Τέλος, ο όρος πλειοδύναμα αναφέρεται στα κύτταρα αυτά που είναι ικανά να δώσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους από τους οποίους αποτελείται ο ιστός στον οποίο εδράζουν. Τα ΑΣΚ που ήδη αναφέρθηκαν είναι τα περισσότερο μελετημένα και χαρακτηρισμένα multipotent στελεχιαία κύτταρα (Serafini et al, 2006).



Εικόνα 1.1. Εμβρυονικά ΣΚ

1.1.1. Εμβρυονικά ΣΚ

Κατά τη διαδικασία της φυσιολογικής (in vivo) γονιμοποίησης στο στάδιο της βλαστοκύστης αρχίζει η εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται ταυτόχρονα σε νέους κυτταρικούς τύπους, ολοένα και περισσότερο δεσμευμένους προς συγκεκριμένη αναπτυξιακή κατεύθυνση.

Αντιθέτως, εάν τα κύτταρα αυτά απομονωθούν και καλλιεργηθούν στο εργαστήριο κάτω από κατάλληλες συνθήκες, μπορούν να πολλαπλασιαστούν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να υφίστανται διαφοροποίηση (long-term self-renewal). Αυτό επιτεύχθηκε για πρώτη φορά το 1981, από βλαστοκύστες ποντικού (*Evans et al, 1981; Martin, 1981*) και αρκετά χρόνια αργότερα, το 1998, από ανθρώπινες βλαστοκύστες (*Thomson et al, 1998*), που είχαν παραχθεί από εξωσωματική (in vitro) γονιμοποίηση και είχαν παραχωρηθεί για ερευνητικούς σκοπούς (Εικόνα 1.1.). Τα κύτταρα που δημιουργούνται με τον παραπάνω τρόπο είναι τα λεγόμενα **εμβρυονικά ΣΚ** (embryonic stem cells). Ο όρος εμβρυονικός επινοήθηκε για να υποδηλώσει την προεμβρυϊκή περίοδο, η οποία καλύπτει τις πρώτες εννέα εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου.

Λόγω της ιδιαίτερα αυξημένης ικανότητάς τους για αυτοανανέωση, είναι δυνατόν από ένα τέτοιο κύτταρο να δημιουργηθούν εκατομμύρια πανομοιότυπα κύτταρα που έχουν το ίδιο αναπτυξιακό δυναμικό με το αρχικό. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν τη λεγόμενη **εμβρυονική κυτταρική σειρά**. Μέχρι σήμερα έχουν παραχθεί περισσότερες από 400 ανθρώπινες τέτοιες σειρές.

Εκτός όμως από τη δυνατότητα της αυτοανανέωσης που επιδεικνύουν τα εμβρυονικά ΣΚ, τα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν και την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα). Διατηρούν δηλαδή την πολυδυναμία τους ακόμα και μετά την παραμονή τους στην καλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Όσον αφορά τα εμβρυονικά ΣΚ ποντικού, τρία είδη πειραμάτων καταδεικνύουν την πολυδυναμία τους: Το πρώτο, περιλαμβάνει τα πειράματα εκείνα κατά τα οποία, κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας μιας βλαστοκύστης μεταφέρονται στην κοιλότητα μιας άλλης βλαστοκύστης. Η δεύτερη εμφυτεύεται στη μήτρα ενός θηλυκού ποντικού και εξελίσσεται σε χιμαιρικό έμβρυο, ένα έμβρυο δηλαδή που αποτελείται από κύτταρα που προέρχονται από δύο διαφορετικά άτομα. Το ίδιο είναι δυνατόν να

συμβεί και στην περίπτωση που σε μια δεύτερη βλαστοκύστη μεταφερθούν εμβρυονικά ΣΚ που προέρχονται από καλλιέργεια. Η διαδικασία όμως αυτή είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική και εξαρτάται κατά πολύ από το χρόνο που τα κύτταρα παρέμειναν στην καλλιέργεια. (Martin 1981; Nagy et al, 1990; Nagy et al, 1993).

Το δεύτερο, αφορά τα πειράματα εκείνα κατά τα οποία, εμβρυονικά ΣΚ ποντικού εμφυτεύονται κάτω από το δέρμα ή στη νεφρική κάψα ενός ενήλικου ατόμου, το οποίο προηγουμένως έχει καταστεί γενετικά ανίκανο να απορρίπτει κύτταρα ξένου οργανισμού. Τα εμφυτευμένα κύτταρα δημιουργούν καλοήθεις όγκους, που ονομάζονται τερατώματα και περιέχουν κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων (Smith, 2001).

Το τρίτο είδος πειραμάτων που υποστηρίζει την πολυδυναμία των εμβρυονικών ΣΚ του ποντικού σχετίζεται με την in vitro διαφοροποίησή τους. Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν στο καλλιεργητικό τρυβλίο, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, συναθροίσματα κυττάρων (embryoid bodies) που αποτελούνται από περισσότερο ή λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα και των τριών βλαστικών δερμάτων και ομοιάζουν κατά πολλούς τρόπους με τα τερατώματα που προαναφέρθηκαν (Fraichard et al, 1995; Nakano et al, 1996; Lumelsky et al, 2001).

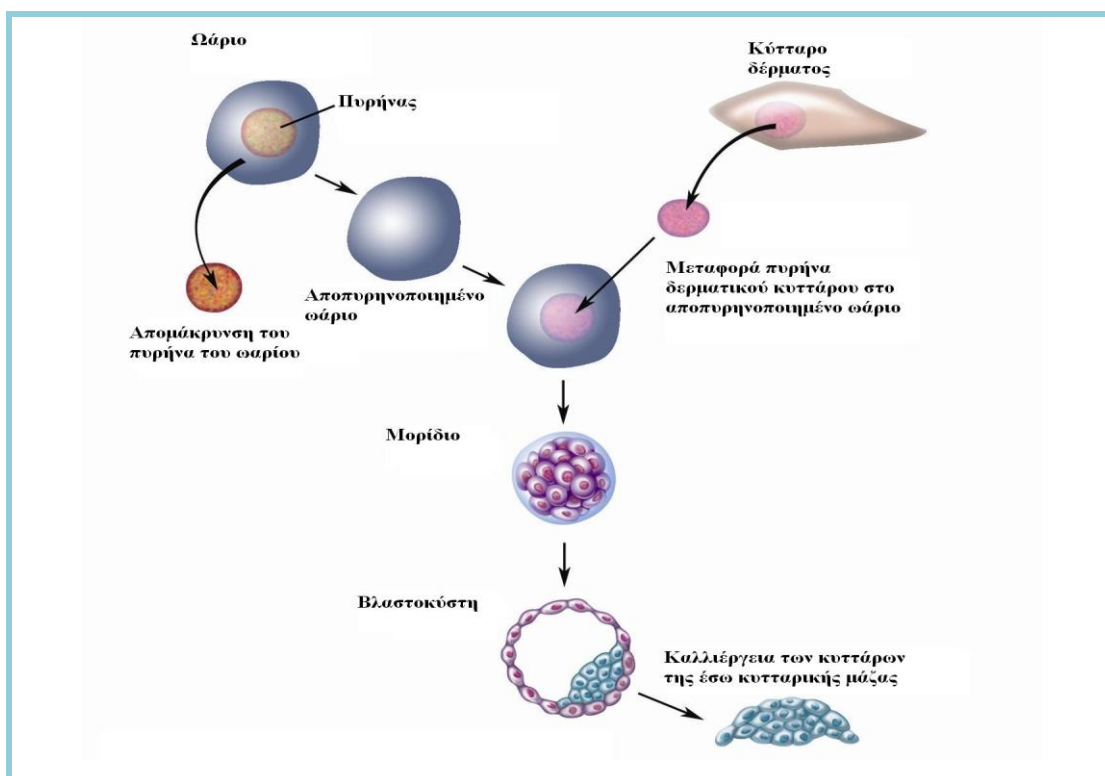
Στον άνθρωπο, για ηθικούς λόγους, οι πειραματικοί σχεδιασμοί είναι πιο περιορισμένοι. Οι μόνες μελέτες, που καταδεικνύουν την πολυδυναμία τους in vivo, περιλαμβάνουν την έγχυσή τους σε ποντίκια και την ανάπτυξη τερατωμάτων (Thomson et al, 1998), ενώ οι υπόλοιπες, περιγράφουν την in vitro διαφοροποίησή τους σε κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων (Amit et al, 2000; Itskovitz-Eldor et al, 2000; Reubinoff et al, 2000).

Είναι βέβαια σκόπιμο στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι, μέχρι τώρα τουλάχιστον, δεν έχει καταστεί δυνατή η δημιουργία in vitro ολοκληρωμένου ιστού ή οργάνου από τα εμβρυονικά ΣΚ. Εν τούτοις, τα ήδη υπάρχοντα πειραματικά ευρήματα διανοίγουν νέους ορίζοντες στην ιατροβιολογική έρευνα. Τα εμβρυονικά ΣΚ μπορούν να συμβάλλουν στη μελέτη της ανθρώπινης αναπτυξιακής και εξελικτικής βιολογίας και στην εξιχνίαση των μηχανισμών εκείνων που οδηγούν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη παρεμβάσεων για την αποφυγή τους. Τα εμβρυονικά ΣΚ μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμή ουσιών που προορίζονται για θεραπευτική χρήση, ή την ανάπτυξη νέων μεθόδων γενετικής τροποποίησης. Η μεγαλύτερη βέβαια πρόκληση αφορά το πεδίο

των μεταμοσχεύσεων και της ανανεωτικής ιατρικής. Άμεσος στόχος των ερευνητών είναι η χρησιμοποίηση των εμβρυονικών ΣΚ για τη λειτουργική αποκατάσταση πασχόντων οργάνων, αντιμετωπίζοντας νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η νόσος του Parkinson, η ατελής οστεογένεση, η οστεοαρθρίτιδα και η οστεοπόρωση, η εκφύλιση της ωχράς κηλίδος κ.ά.

Δύο από τα σημαντικότερα προβλήματα, που είναι αναγκαίο να επιλυθούν, προκειμένου τα εμβρυονικά ΣΚ να χρησιμοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο, είναι η δημιουργία όγκων και η πιθανή απόρριψή τους από το λήπτη λόγω της ασυμβατότητας στο HLA σύστημα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κυτταρικές σειρές που έχουν δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας τη τεχνική μεταφοράς πυρήνα σωματικού κυττάρου (Εικόνα 1.1.1.). Κατά τη διαδικασία αυτή ο πυρήνας από ένα σωματικό κύτταρο μεταφέρεται σε ένα αποπυρηνωποιημένο ωάριο με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διπλοειδούς κυττάρου ανάλογου του ζυγωτού. Το ωάριο στη συνέχεια διεγείρεται *in vitro* να διαιρεθεί σαν να ήταν γονιμοποιημένο. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης, που δημιουργείται με αυτόν τον τρόπο, είναι εμβρυονικά ΣΚ που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για κυτταρική θεραπεία στο δότη του σωματικού κυττάρου, χωρίς το κίνδυνο απόρριψης, αφού φέρουν τον ίδιο γονότυπο (θεραπευτική κλωνοποίηση).



Εικόνα 1.1.1. Θεραπευτική κλωνοποίηση

1.1.2. Επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα

Η θεραπευτική κλωνοποίηση θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικές δυνατότητες ίασης σοβαρών ασθενειών με τη χρήση κλωνοποιημένων αρχέγονων κυττάρων. Όμως, η εφαρμογή της μεθόδου στον άνθρωπο είναι ιδιαιτέρως προβληματική αφού η χρησιμοποίηση ανθρώπινων ωαρίων, η καταστροφή των βλαστοκύστεων για την απομόνωση των βλαστοκυττάρων και ο εξαιρετικά χαμηλός βαθμός επιτυχίας της μεθόδου αποτελούν μείζονα ηθικά και τεχνικά προβλήματα.

Εν τούτοις, η επίτευξη της κλωνοποίησης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το κυτταρόπλασμα του ωαρίου περιέχει όλους εκείνους τους παράγοντες που είναι ικανοί και ευθύνονται για την επαναφορά των διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων σε ένα πολύ πρώιμο στάδιο της αναπτυξιακής τους πορείας, όπως είναι αυτό των κυττάρων της έσω στοιβάδας της βλαστοκύστης.

Το 2006 οι ερευνητές κατάφεραν την αποδιαφοροποίηση και τον επαναπρογραμματισμό ινοβλαστών του ποντικού σε πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα, όμοια με τα εμβρυονικά, με τη μεταφορά μέσω ρετροϊών 4 μεταγραφικών παραγόντων, των Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006). Ένα χρόνο αργότερα, αυτό επετεύχθη και με δερματικούς ανθρώπινους ινοβλάστες χρησιμοποιώντας τους ίδιους μεταγραφικούς παράγοντες (Takahashi et al 2007, Yu et al, 2007), ενώ, μέχρι σήμερα η μέθοδος έχει εφαρμοστεί και σε άλλους τύπους σωματικών κυττάρων τόσο του ποντικού όσο και του ανθρώπου (Stadtfield & Hochedlinger 2010, Patel & Yang 2010).

Τα κύτταρα που προκύπτουν ονομάζονται επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPS) και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για την παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων και ιστών στην αναγεννητική ιατρική και τις μεταμοσχεύσεις. Ήδη, σε ζωικό μοντέλο δρεπανοκυτταρικής αναιμίας επιτεύχθηκε απομόνωση και γονιδιακή διόρθωση iPS κυττάρων. Στη συνέχεια τα τροποποιημένα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν για την θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας στο ποντίκι επιτυχώς (Hanna, 2007).

Προκειμένου όμως η χρήση τους να είναι δυνατή και στον άνθρωπο θα πρέπει να αναπτυχθούν απλούστερες και ασφαλέστερες μέθοδοι παραγωγής τους, καθώς η ενσωμάτωση γονιδίων στο γονιδίωμα για τη κωδικοποίηση των απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων, ενέχει τον κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων ή δημιουργίας γενετικής αστάθειας. Σημαντική εξέλιξη προς την κατεύθυνση αυτή

ήταν η επιτυχής ανάπτυξη iPS κυττάρων με συστήματα μεταφοράς των γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων χωρίς την ενσωμάτωση τους στο DNA των κυττάρων, που ανακοινώθηκε από πολλές ερευνητικές ομάδες τα τελευταία δύο χρόνια (*Kaji και συν. 2009, Zhou και συν. 2009, Fusaki 2009, Warren 2010*). Το επόμενο βήμα στην έρευνα της βιολογίας των ανθρώπινων iPS κυττάρων είναι η ανάπτυξη *in vitro* συστημάτων ασφαλούς πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησής τους, σε κλινικά αξιοποιήσιμα πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας. Η κυτταρική θεραπεία εκφυλιστικών νόσων του αμφιβληστροειδούς και η δημιουργία κυτταρικών δερματικών μοσχευμάτων για την αντιμετώπιση καθολικών εγκαυμάτων, με κύτταρα-φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς και κερατινοκύτταρα του δέρματος, αντίστοιχα, θα είναι ίσως από τις πρώτες κλινικές εφαρμογές των iPS κυττάρων (*Galach M & Utikal J 2011, Itoh και συν. 2011*).

1.1.3. Ενήλικα στελεχειαία κύτταρα

Σε αντίθεση με τα εμβρυονικά ΣΚ των οποίων η καταγωγή είναι απόλυτα προσδιορισμένη (έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης), για τα ενήλικα ΣΚ η προέλευση δεν είναι γνωστή. Είναι γνωστό όμως, ότι τέτοια κύτταρα υπάρχουν σε πολλούς ιστούς του σώματος και είναι υπεύθυνα για την αναγέννησή τους.

Τα ενήλικα ΣΚ εκπληρούν και τα τρία κριτήρια των ΣΚ που προαναφέρθηκαν. Παρόλα αυτά, η ικανότητά τους για αυτοανανέωση και διαφοροποίηση είναι περιορισμένη σε σχέση με τα εμβρυονικά ΣΚ (*Ulloa-Montoya et al, 2005*). Χαρακτηρίζονται ως multipotent που σημαίνει ότι είναι ικανά να δώσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους από τους οποίους αποτελείται ο ιστός στον οποίο εδράζουν. Οι μέχρι σήμερα δημοσιευμένες επιστημονικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι τέτοια κύτταρα υπάρχουν στο μυελό των οστών (*Till et al, 1961; Becker et al, 1963; Friedenstein et al, 1966; Friedenstein et al, 1970; Owen, 1988*), στο περιφερικό αίμα (*Kuznetsov et al, 2001*), στον εγκέφαλο (*McKay, 1997; Momma et al, 2000; Uchida et al, 2000*), στο πάγκρεας (*Bonner-Weir et al, 2000; Zulewski et al, 2001*), στο ήπαρ (*Sirica et al, 1990; Thorgeirsson, 1993; Dabeva et al, 1993; Lazaro et al, 1998*), στους σκελετικούς μύες (*Gussoni et al, 1999; Seale et al, 2000*), στο δέρμα (*Zhu et al, 1999; Slack, 2000; Taylor et al, 2000*) κ.ά.

Η συχνότητα με την οποία ανευρίσκονται στους διάφορους ιστούς είναι πολύ μικρή. Για παράδειγμα, έχει υπολογιστεί ότι μόλις 1 στα 10.000-15.000 κύτταρα του μυελού των οστών είναι ΑΣΚ (*Weissman et al, 2000*).

Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι τα ενήλικα ΣΚ μπορούν, όταν βρεθούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες, να διαφοροποιηθούν σε ώριμα κύτταρα όχι μόνο του ιστού από τον οποίο προέρχονται, αλλά και άλλων ιστών του ίδιου ή άλλου βλαστικού δέρματος. Για παράδειγμα, τα ΣΚ του αιμοποιητικού ιστού – ο οποίος προέρχεται από το μεσόδερμα – είναι ικανά να δημιουργήσουν σκελετικούς μυς, που επίσης προέρχονται από το μεσόδερμα (Ferrari et al, 1998; Corbel et al, 2003), αλλά και νευρικά κύτταρα, που προέρχονται από το εξώδερμα (Brazelton et al, 2000; Mezey et al, 2000; Krause et al, 2001) καθώς επίσης και κύτταρα του παγκρέατος (Krause et al, 2001) ή κύτταρα του ήπατος (Petersen et al, 1999; Lagasse et al, 2000) που είναι ενδοδερμικής προέλευσης. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται στη βιβλιογραφία με τους όρους πλαστικότητα (plasticity), ανορθόδοξη διαφοροποίηση (unorthodox differentiation) ή μεταδιαφοροποίηση (transdifferentiation) και ανατρέπει ένα βασικό νόμο της αναπτυξιακής βιολογίας σύμφωνα με τον οποίο, κάθε κύτταρο που έχει δεσμευτεί προς συγκεκριμένη κατεύθυνση διαφοροποίησης δεν έχει τη δυνατότητα να επαναπρογραμματιστεί και να αλλάξει την αναπτυξιακή του πορεία.

Περισσότερα δεδομένα αλλά και αντικρουόμενες απόψεις για την πλαστικότητα των ενήλικων ΣΚ αναφέρονται στην παράγραφο 1.2.7.

Όπως τα εμβρυονικά ΣΚ, έτσι και τα ενήλικα, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στην ιατροβιολογική έρευνα αλλά και στην κλινική πράξη. Το καθένα έχει τα δικά του πλεονεκτήματα αλλά και τους δικούς του περιορισμούς (Πίνακας 1.1.3.).

Πίνακας 1.1.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ανθρώπινων εμβρυονικών και ενήλικων ΣΚ

Εμβρυονικά ΣΚ	Ενήλικα ΣΚ
Αυξημένο δυναμικό αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης (pluripotent)	Μικρότερο δυναμικό αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης (multipotent)
Νεαρά και υγιή	Επιβαρημένα από την ηλικία, τις τοξίνες και τις ασθένειες
Αδιαφοροποίητα. Η διαφοροποίησή τους σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο απαιτεί πολλά ενδιάμεσα στάδια και είναι δύσκολο να ελεγχθεί.	Μερικώς διαφοροποιημένα. Επιτυγχάνεται ευκολότερα η διαφοροποίησή τους προς την κατεύθυνση που έχουν δεσμευτεί.
Δημιουργούν τερατώματα	Μη ογκογόνα
Αλλογενής χρήση-Κίνδυνος απόρριψης	Αυτόλογη χρήση-Δεν υπάρχει κίνδυνος απόρριψης
Ηθικοί προβληματισμοί λόγω της προέλευσής τους	Δεν δημιουργούνται ηθικά διλήμματα

1.2. ΣΚ του μυελού των οστών

Το μυελικό όργανο θα μπορούσε κανείς να το φανταστεί σαν ένα τρισδιάστατο πλέγμα από ινίδια, αγγεία και κύτταρα που συγκρατούνται μεταξύ τους με μια άμορφη πρωτεϊνούχο ουσία (extracellular matrix) και σχηματίζουν βροχίδες. Τα στοιχεία που απαρτίζουν το τρισδιάστατο πλέγμα και σχηματίζουν τις βροχίδες συνιστούν το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον (hemopoietic microenvironment). Μέσα στις βροχίδες είναι εγκατεστημένες, πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και ωριμάζουν οι προβαθμίδες των αιματικών κυττάρων.

Τα κύτταρα που συμμετέχουν στη δομή του τρισδιάστατου πλέγματος είναι κυρίως ινοβλάστες, λιποκύτταρα, οστικά κύτταρα, κύτταρα του δικτύου και μακροφάγα. Όλα μαζί αποτελούν τα λεγόμενα στρωματικά κύτταρα (stromal cells) και ο ρόλος τους είναι η υποστήριξη και η ρύθμιση της αιμοποίησης με την παραγωγή κυτοκινών και άλλων παραγόντων (Κυριακού, 1996).

Επομένως, στο μυελό των οστών διακρίνονται δύο διαφορετικά κυτταρικά συστήματα, το αιμοποιητικό και το σύστημα των κυττάρων του στρώματος τα οποία όχι μόνο συνυπάρχουν αλλά και συνεργάζονται με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης της αιμοποίησης. Η απώλεια κυττάρων που δημιουργείται συνεχώς από τη γήρανση, καταστροφή και απόπτωση αναπληρώνεται από δύο διαφορετικά είδη ΣΚ, ένα για το κάθε κυτταρικό σύστημα: τα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα (ΑΣΚ) και τα στρωματικά στελεχιαία κύτταρα (ΣΣΚ). Τα πρώτα δίνουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αίματος (ερυθρά, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια) και είναι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα περισσότερο μελετημένα και χαρακτηρισμένα ενήλικα ΣΚ. Τα δεύτερα έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία δέκα χρόνια. Όμως, παρά το μεγάλο αριθμό πληροφοριών που έχουν συσσωρευτεί, δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί ούτε η ταυτότητα αλλά ούτε και οι δυνατότητές τους. Εν τούτοις, μπορούμε να πούμε ότι δύο είναι τα κύρια χαρακτηριστικά τους: η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται *in vitro* αφού πρώτα προσκολληθούν στην επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου και η δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης όπως οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και λιποκύτταρα (Γουσέτης, 2002).

1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Η παρουσία ΣΚ ικανών να διαφοροποιούνται σε μη αιμοποιητικά κύτταρα στο μυελό των οστών, υποστηρίχτηκε για πρώτη φορά από το Γερμανό παθολόγο

Cohnheim 140 χρόνια πριν. Ο Cohnheim μελέτησε την επούλωση τραυμάτων εγχύοντας μια αδιάλυτη χρωστική στις φλέβες ζώων και παρατηρώντας την εμφάνιση κεχωσμένων κυττάρων στην περιοχή των τραυμάτων. Συμπεράνε ότι τα περισσότερα, αν όχι όλα, τα κύτταρα στα τραύματα προέρχονταν από την κυκλοφορία του αίματος και από το μυελό των οστών. Τα κεχωσμένα κύτταρα περιλάμβαναν όχι μόνο φλεγμονώδη κύτταρα αλλά και κύτταρα ινοβλαστικής μορφολογίας που συνδέονταν μεταξύ τους με λεπτά ινίδια (*Cohnheim et al, 1867*). Έτσι, η μελέτη του Cohnheim οδήγησε στην υπόθεση ότι ο μυελός των οστών ίσως αποτελεί πηγή ινοβλαστών που αποθέτουν ίνες κολλαγόνου κατά τη διαδικασία επούλωσης των τραυμάτων (*Prockop, 1997*).

Η οριστική απόδειξη ότι ο μυελός των οστών περιέχει κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ινοβλάστες καθώς και σε άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα, προήλθε από τον **Friedenstein** και τους συνεργάτες του, οι οποίοι πραγματοποίησαν μια σειρά από πρωτοποριακά πειράματα τη δεκαετία του 1960 και 1970. Ο Friedenstein τοποθέτησε δείγματα ολικού μυελού σε πλαστικά καλλιεργητικά τρυβλία και μετά από 4 ώρες περίπου απομάκρυνε τα μη προσκολλημένα κύτταρα, δηλαδή τα περισσότερα αιμοποιητικά κύτταρα. Παρατήρησε ότι ο μικρός αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων ήταν ετερογενής, αλλά τα πιο στενά προσκολλημένα κύτταρα είχαν ατρακτοειδές σχήμα και σχημάτιζαν εστίες 2- 4 κυττάρων. Τα κύτταρα στις εστίες παρέμεναν αδρανή 2-4 ημέρες και έπειτα άρχιζαν να πολλαπλασιάζονται ταχύτατα. Μετά από αρκετές ανακαλλιέργειες, τα προσκολλημένα κύτταρα αποκτούσαν πιο ομοιογενή ατρακτοειδή εμφάνιση, ενώ δεν παρουσίαζαν φαγοκυτταρική ικανότητα. Όμως, το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό τους, ήταν η ικανότητά τους να σχηματίζουν αποικίες που έμοιαζαν με μικρές αποθέσεις οστού ή χόνδρου. Η μεταμόσχευση τέτοιων κυττάρων κάτω από τη νεφρική κάψα πειραματόζωων οδηγούσε στη δημιουργία οξιδίων που αποτελούνταν από χονδρικό, οστίτη και λιπώδη ιστό (*Friedenstein et al, 1966; Friedenstein et al, 1968; Friedenstein et al, 1970; Friedenstein et al, 1974; Friedenstein et al, 1976*).

Οι αρχικές παρατηρήσεις του Friedenstein συμπληρώθηκαν από ένα μεγάλο αριθμό ερευνητών κατά τη δεκαετία του '80 και '90 (*Piersma et al, 1985; Howlett et al, 1986; Owen and Friedenstein, 1988; Caplan, 1991; Wakitani et al, 1995*). Αυτές και άλλες μελέτες καθιέρωσαν ότι τα κύτταρα που απομονώνονταν, με τη σχετικά ακατέργαστη διαδικασία του Friedenstein, ήταν πολυδύναμα και διαφοροποιούνταν

εύκολα σε οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, λιποκύτταρα και μυοβλάστες. Ακόμα πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα είχαν ο Friedenstein και οι συνεργάτες του όταν έδειξαν ότι, ακόμα και μετά από 20 ή 30 κυτταρικές διαιρέσεις στην καλλιέργεια, τα κύτταρα αυτά διατηρούσαν την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε οστό και χόνδρο, κατά τον εγκλεισμό τους σε κάψουλες πορώδους μεμβράνης και την επακόλουθη εμφύτευσή τους στην περιτοναϊκή κοιλότητα αρουραίων (Friedenstein et al, 1987).

Παράλληλα, κατά τη δεκαετία του '70 ο **Dexter** και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι, όταν δείγματα ολικού μυελού των οστών τοποθετηθούν σε καλλιεργητικά τρυβλία, τα κύτταρα που προσκολλούνται στον πυθμένα του τρυβλίου αποτελούν πολύ σημαντικό μικροπεριβάλλον, που υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ΑΣΚ για πολλές εβδομάδες (Dexter et al, 1977). Τα προσκολλημένα κύτταρα αντιπροσωπεύουν το στρώμα του μυελού των οστών και είναι κυρίως μακροφάγα, ενδοθηλιακά, ινοβλάστες, καθώς και γιγαντιαία λιπώδη κύτταρα. Η καλλιεργητική αυτή μέθοδος, που ανέπτυξαν ο Dexter και οι συνεργάτες του, είναι γνωστή ως καλλιέργεια μακράς διάρκειας (long-term culture) και χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη των προσκολλημένων κυττάρων με τα αιωρούμενα αιμοποιητικά κύτταρα, εν αντιθέσει με τη μέθοδο του Friedenstein ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, απομάκρυνε τα τελευταία.

Τέλος, ο **Majumdar** και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι, τα προσκολλημένα κύτταρα που δρουν ως τροφοδοτικό στρώμα για την ανάπτυξη των ΑΣΚ στις καλλιέργειες τύπου Dexter, τα οποία ονομάζουν MDSCs (marrow-derived stromal cells), παράγουν παρόμοιο σύνολο κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, με αυτά που αναπτύσσονται απουσία των αιμοποιητικών κυττάρων στις καλλιέργειες σαν αυτές του Friedenstein, τα οποία ονομάζουν MSCs (mesenchymal stem cells). Επιπλέον, τα MSCs έχουν τη δυνατότητα να υποστηρίξουν την αιμοποίηση in vitro στις καλλιέργειες μακράς διάρκειας, αν και, σε μικρότερο βαθμό από τα MDSCs (Majumdar et al, 1998; Majumdar et al, 2000). Παρόλα αυτά, δεν είναι αποσαφηνισμένο, εάν οι δύο πληθυσμοί έχουν και τις ίδιες δυνατότητες διαφοροποίησης.

1.2.2. Ονοματολογία

Στα κύτταρα αυτά του μυελού των οστών, που πρώτος περιέγραψε ο Friedenstein, έχουν αποδοθεί ποικίλες ονομασίες. Αρχικά ονομάστηκαν **plastic-adherent cells** ή **colony-forming-units fibroblasts (CFUs)**, επειδή εύκολα

προσκολλούνταν στην επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου και σχημάτιζαν ινοβλαστοειδείς αποικίες (Piersma et al, 1985; Owen and Friedenstien, 1988).

Σταδιακά, οι ονομασίες αυτές εγκαταλείφθηκαν και αντικαταστάθηκαν από όρους όπως, **μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα (mesenchymal stem cells)** (Caplan, 1991) ή **μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα (mesenchymal progenitor cells)** (Conget and Minguell, 1999), επειδή είχαν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε μια ποικιλία ιστών μεσεγχυματικής προέλευσης. Οι χαρακτηρισμοί όμως αυτοί δεν είναι ακριβείς. Και αυτό γιατί, τα αιμοποιητικά όπως και τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι μεσοδερμικής προέλευσης. Έτσι, ο όρος “μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα” θα έπρεπε να αναφέρεται σε στελεχιαία κύτταρα που είναι ικανά να δημιουργήσουν και τους κυτταρικούς τύπους του αίματος. Στην πράξη εν τούτοις, θεωρείται ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από ξεχωριστό πληθυσμό ΣΚ. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε κυτταρικούς τύπους, όχι μόνο μεσοδερμικής προέλευσης, αλλά και των άλλων δύο βλαστικών δερμάτων, γεγονός που καθιστά την ονοματολογία αυτή ακόμα πιο ακατάλληλη.

Ακόμα, αναφέρονται ως **στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (marrow stromal cells)** (Prockop, 1997), επειδή φαίνεται ότι προέρχονται από τις υποστηρικτικές δομές που βρίσκονται στο μυελό, και επίσης, μπορούν να δράσουν σαν τροφοδοτικό στρώμα για την ανάπτυξη των ΑΣΚ στην καλλιέργεια (Majumdar et al, 1998; Majumdar et al, 2000). Όμως, και στην περίπτωση αυτή, ο όρος “στρωματικά κύτταρα” περιγράφει καλύτερα το σύνολο των κυττάρων του μυελού των οστών που συμμετέχουν στη δομή του τρισδιάστατου πλέγματος, υποστηρίζοντας την αιμοποίηση τόσο in vivo όσο και in vitro, όπως ήδη αναφέρθηκε, στις καλλιέργειες τύπου Dexter.

Το 2005, η Παγκόσμια Εταιρεία για την Κυτταρική Θεραπεία (International Society for Cell Therapy) υιοθέτησε τον όρο **Πλειοδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα (multipotent mesenchymal stromal cells)** και πρότεινε τα ακόλουθα κριτήρια, προκειμένου κάποια κύτταρα να μπορούν να χαρακτηριστούν ως τέτοια: α) προσκόλληση στην επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου β) ο φαινότυπός τους, όπως προσδιορίζεται από την κυτταρομετρική ανάλυση, να είναι: CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻, CD14⁻ ή CD11b⁻, CD79a⁻ ή CD19⁻ γ) in vitro διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροβλάστες. Παράλληλα, θεωρεί τα Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα έναν υποπληθυσμό αυτών που πληροί

επαρκέστερα τα κριτήρια των ΣΚ (παράγρ. 1.1.), ενώ το ακρωνύμιο ΜΣΚ (MSC) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στις δύο περιπτώσεις (Horwitz et al, 2005; Dominici et al, 2006).

Στην παρούσα διατριβή υιοθετείται ο όρος **Στρωματικά Στελεχιαία Κύτταρα -ΣΣΚ (stromal stem cells)**, ο οποίος περιλαμβάνει τα σπάνια αυτά κύτταρα που βρίσκονται εντός των κυττάρων του στρώματος στο μυελό των οστών και έχουν αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και μεγάλη δυνατότητα διαφοροποίησης, ιδιότητες χαρακτηριστικές των ΣΚ. Επίσης, θα χρησιμοποιηθεί ο όρος **Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα (ΜΣΚ)** με τον οποίο θα περιγράφονται τα ΣΣΚ αλλά και όλα εκείνα τα ΣΚ που προέρχονται από άλλους ιστούς (παράγραφος 1.2.9.) και δίνουν στην καλλιέργεια κυτταρικούς πληθυσμούς όμοιους με αυτούς των ΣΣΚ.

Ο όρος << **βλαστοκύτταρα**>> που τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται πολύ συχνά, κυρίως από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης στη χώρα μας, δεν είναι διαδεδομένος στη διεθνή βιβλιογραφία. Τις περισσότερες φορές αναφέρεται στα ενήλικα στελεχιαία κύτταρα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και του μυελού των οστών τα οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι multipotent. Τα << βλαστοκύτταρα>> αυτά, δεν θα πρέπει να συγχέονται με τα κύτταρα που προέρχονται από τη βλαστοκύστη, δηλαδή τα εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα, τα οποία έχουν πολύ μεγαλύτερο αναπτυξιακό δυναμικό (pluripotent).

1.2.3. Απομόνωση και πολλαπλασιασμός των ΣΣΚ

Η συχνότητα των ΣΣΚ στο μυελό των οστών είναι πολύ μικρή και γίνεται ακόμα μικρότερη με την ηλικία (Caplan, 1994). Για παράδειγμα, στη βρεφική ηλικία είναι περίπου $1/10^4$ μονοπύρρηνα κύτταρα ενώ, σε άτομα ηλικίας 80 ετών μειώνεται στα $1/2 \times 10^6$ μονοπύρρηνα κύτταρα (Fibbe, 2002).

Εν τούτοις, η απομόνωσή τους πραγματοποιείται σχετικά εύκολα με διαδικασία παρόμοια με αυτήν που χρησιμοποίησε ο Friedenstein. Δείγμα μυελού των οστών λαμβάνεται από την οπίσθια ή πρόσθια λαγόνιο ακρολοφία και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε κλίση πυκνότητας. Έτσι, διαχωρίζεται το σύνολο των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού, τα οποία κατόπιν τοποθετούνται σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός. Στις καλλιέργειες αυτές αναπτύσσονται γρήγορα δύο διακριτά κυτταρικά συστήματα. Το ένα αποτελείται από ετερογενή πληθυσμό κυττάρων που προσκολλούνται στην επιφάνεια του

καλλιεργητικού μέσου και το άλλο συνιστάται από τα αιμοποιητικά κύτταρα που αιωρούνται στην υπερκείμενη φάση του θρεπτικού υλικού. Ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων αντιπροσωπεύει τα ΣΣΚ που είναι όμως επιμολυσμένα με άλλα κύτταρα του στρώματος όπως ενδοθηλιακά, μακροφάγα κ.λ.π. Η καλλιέργεια διατηρείται, ανανεώνοντας το καλλιεργητικό υλικό δύο φορές την εβδομάδα, έως ότου τα προσκολλημένα κύτταρα καλύψουν το 70% περίπου της καλλιεργητικής επιφάνειας. Στο σημείο αυτό αποκολλούνται με την επίδραση θρυψίνης και ανακαλλιεργούνται σε μέσο με μεγαλύτερη καλλιεργητική επιφάνεια. Η συγκεκριμένη διαδικασία έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση, αφενός των μη προσκολλημένων κυττάρων και αφετέρου, των κυττάρων του στρώματος που δε θεωρούνται ΣΣΚ. Έτσι, μετά από 2-3 εβδομάδες, στην καλλιέργεια παρατηρείται ένας σχετικά ομοιογενής πληθυσμός προσκολλημένων κυττάρων ινοβλαστοειδούς μορφολογίας, ο οποίος προέρχεται από τα ΣΣΚ. Με επαναλαμβανόμενες αποκολλήσεις και ανακαλλιέργειες επιτυγχάνεται η περαιτέρω έκπτυξη των ΣΣΚ (Nardi & Meirelles, 2006).

Συνήθως επιτυγχάνονται 8-15 αποκολλήσεις που ισοδυναμούν με 25-40 κυτταρικούς διπλασιασμούς (ΚΔ) (population doublings). Μετά σταματούν να πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να εκφυλίζονται. Η γήρανσή τους μπορεί να γίνει αντιληπτή ακόμα και με τη μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας τους. Τα κύτταρα γίνονται μεγαλύτερα, λιγότερο πυκνά και πολλαπλασιάζονται πολύ αργά. Αλλά και η μοριακή τους ταυτότητα καθώς και τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά καταδεικνύουν τη σταδιακή εκφύλισή τους με τις συνεχείς ανακαλλιέργειες (DiGirolamo et al, 1999; Fehrer et al, 2006; Wagner et al, 2008). Άλλοι ερευνητές διακρίνουν στις καλλιέργειες δύο τύπους κυττάρων. Ο τύπος Ι έχει ατρακτοειδή μορφή και αυξάνεται ταχύτατα ενώ τα κύτταρα τύπου ΙΙ είναι πεπλατυσμένα και αναπτύσσονται πολύ αργά. Τα τελευταία γίνονται όλο και περισσότερα καθώς επαναλαμβάνονται οι αποκολλήσεις και ανακαλλιέργειες, ενώ παρατηρούνται και κύτταρα με ενδιάμεση μορφολογία (Mets & Verdonk, 1981; Satomura et al, 1998).

Η ικανότητα αυτοανανέωσης που επιδεικνύουν τα ΣΣΚ ποικίλλει σημαντικά, γεγονός που οφείλεται κατά πολύ στις διαφορετικές μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιούν τα διάφορα εργαστήρια. Η πυκνότητα με την οποία τοποθετούνται τα κύτταρα στην καλλιέργεια, καθώς και η προσθήκη αυξητικών παραγόντων, φαίνεται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι όταν τα κύτταρα τοποθετηθούν με χαμηλή πυκνότητα (1.5-3 κύτταρα / cm²) πολλαπλασιάζονται 2000

φορές, ενώ, όταν η πυκνότητα τοποθέτησής τους στην καλλιέργεια είναι υψηλή (12 κύτταρα / cm^2) πολλαπλασιάζονται μόνο 60 φορές (Colter et al, 2000). Παρομοίως, με την προσθήκη του παράγοντα FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) στο βασικό καλλιεργητικό υλικό, ο πληθυσμός των κυττάρων μπορεί να διπλασιαστεί περισσότερο από 50 φορές (Bianchi et al, 2003).

Η οπωσδήποτε πάντως περιορισμένη διάρκεια ζωής των ΣΣΚ και η γήρανσή τους στην καλλιέργεια θεωρείται ότι οφείλεται στην έλλειψη δραστηριότητας του ενζύμου της τελομεράσης. Όπως είναι γνωστό η τελομεράση αποτρέπει τη βράχυνση των τελομερών και/ή τη διαφοροποίηση των κυττάρων (Ulloa-Montoya et al, 2005). Με την επανάκτηση της δραστηριότητας της τελομεράσης είναι δυνατόν να ανασταλεί η γήρανση των ΣΣΚ στην καλλιέργεια (Simonsen et al, 2002). Σε αυτήν τη περίπτωση τα ΣΣΚ επιδεικνύουν αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ ταυτόχρονα διατηρούν το διαφοροποιητικό τους δυναμικό.

1.2.4. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ΣΣΚ

Η πλειονότητα των δεδομένων που αφορά στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ΣΣΚ προέρχεται από τη διερεύνηση αυτών μετά τον πολλαπλασιασμό τους στην καλλιέργεια, ενώ λίγες πληροφορίες υπάρχουν για τον ακριβή χαρακτήρα τους αμέσως μετά τη λήψη του μυελού των οστών. Εν αντιθέσει με τα ΑΣΚ, τα καλλιεργημένα ΣΣΚ εκφράζουν μια σειρά από μη ειδικούς επιφανειακούς δείκτες, κανέναν από τους οποίους δεν μπορεί μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλους να συμβάλλει στην απομόνωση πληθυσμού ΣΣΚ υψηλής καθαρότητας.

Γενικά είναι αποδεκτό ότι τα ΣΣΚ δεν εκφράζουν δείκτες όπως οι CD11b, CD14, CD31, CD34, CD45 και VWF οι οποίοι ανευρίσκονται στα αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (Kemp et al, 2005). Ειδικότερα όμως για το δείκτη CD34, αν και δεν εκφράζεται στα καλλιεργημένα ΣΣΚ, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να εκφράζεται στα κύτταρα που αρχικά απομονώνονται από το μυελό αλλά χάνεται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους στην καλλιέργεια (Waller et al, 1995). Αντιθέτως, ανευρίσκονται οι δείκτες CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, Stro-1 κ.ά. που όμως εκφράζονται και σε άλλα κύτταρα (Πίνακας 1.2.4.).

Πίνακας 1.2.4. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ΣΣΚ του μυελού των οστών που προέρχονται από την καλλιέργεια

	Δείκτες		Άλλα κύτταρα στα οποία εκφράζονται οι συγκεκριμένοι δείκτες
Δεν εκφράζουν	CD11b	Υποδοχέας του συμπληρώματος C3bi	Μυελικά κύτταρα, NK και μερικά ενεργοποιημένα Λεμφοκύτταρα
	CD14 ⁺	Υποδοχέας του συμπλόκου LPS	Μονοκύτταρα, Μακροφάγα, Ουδετερόφιλα και μερικά μυελικά Δενδριτικά κύτταρα
	CD31 ⁺	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)	Ωριμα Ενδοθηλιακά κύτταρα, Αιμοπετάλια και μερικά Λευκοκύτταρα
	CD34 ⁺	Class III	Αιμοποιητικά προγονικά και τα περισσότερα Ενδοθηλιακά κύτταρα
	CD45 ⁺	Leucocyte Common Antigen	Αιμοποιητικά κύτταρα εκτός από αυτά της ερυθράς σειράς
	CD235a	Glycophorin A	Ωριμα και προγονικά Ερυθροκύτταρα
	VWF	Παράγοντας πήξης Von Willebrand	Ενδοθηλιακά
Εκφράζουν	CD29 ⁺	β1-integrin	Ενεργοποιημένα και μη Λευκοκύτταρα
	CD44 ⁺	Hyaluronic Cellular Adhesion Molecule (HCAM)	T και B Λεμφοκύτταρα, Μακροφάγα, Ουδετερόφιλα και Ερυθροκύτταρα
	CD73 (SH-3, SH-4)	ecto-5'-nucleotidase	T και B Λεμφοκύτταρα, Ενδοθηλιακά κύτταρα
	CD90 ⁺	Thymus Cell Antigen-1(Thy-1)	Προγονικά Αιμοποιητικά κύτταρα
	CD105 ⁺ (SH-2)	Endoglin. Υποδοχέας του TGF-β1 και TGF-β3	Ενδοθηλιακά, Ερυθροβλάστες, Μονοκύτταρα
	CD106	Vascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1)	Ενδοθηλιακά
	CD166 (SB-10)	Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)	Ενεργοποιημένα T και B Λεμφοκύτταρα, Μονοκύτταρα
	CD271	Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (LNGFR)	Κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, Λευκοκύτταρα
	STRO-1	Stromal-derived factor-1	Ερυθροβλάστες, B Λεμφοκύτταρα, Μακροφάγα, Δενδριτικά κύτταρα

1.2.5. Πληθυσμοί των ΣΣΚ

Ο κυτταρικός πληθυσμός που απομονώνεται με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, αν και είναι σχετικά ομοιογενής μορφολογικά, στην πραγματικότητα χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια.

Προκειμένου να επιτευχθεί η απομόνωση πιο “καθαρού” και ομοιογενούς πληθυσμού αναπτύχθηκαν και άλλες τεχνικές. Έτσι, πέρα από τη φυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας, έχουν χρησιμοποιηθεί και το φιλτράρισμα του μυελού των οστών με φίλτρο 3-μm (*Hung et al, 2002*), καθώς και οι αλλαγές στην πυκνότητα με την οποία τοποθετούνται τα κύτταρα στην καλλιέργεια (*Colter et al, 2000*). Οι πιο αποτελεσματικές όμως προσπάθειες αποδείχθηκαν αυτές που βασίζονται στη χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων (ΜΑ) έναντι αντιγόνων που εκφράζουν ή δεν εκφράζουν τα ΣΣΚ, μιλώντας έτσι για θετική ή αρνητική επιλογή αντίστοιχα. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι η απομόνωση πληθυσμών εμπλουτισμένων σε ΣΣΚ και όχι απόλυτα “καθαρών”. Στον πίνακα 1.2.5. αναφέρονται κάποιες από τις πιο χαρακτηριστικές μεθόδους απομόνωσης ΣΣΚ, οι όροι που υιοθέτησαν οι ερευνητές για να περιγράψουν τους πληθυσμούς που απομόνωσαν, το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό με βάση τον αριθμό των ΚΔ που επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές.

Οι πληθυσμοί που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα, αν και έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά, δεν είναι ταυτόσημοι. Οι διαφορές τους οφείλονται και στο διαφορετικό τρόπο απομόνωσης του αρχικού πληθυσμού από το δείγμα του μυελού των οστών, αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Εάν οι συνθήκες αυτές, ευνοούν επιλεκτικά την έκπτυξη διαφορετικών πληθυσμών των ΣΣΚ ή έχουν σαν αποτέλεσμα παρόμοιοι κυτταρικοί πληθυσμοί να αποκτούν διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, δεν είναι αποσαφηνισμένο (*Nardi & Meirelles, 2006*). Μερικές μελέτες προτείνουν ότι η δεύτερη εκδοχή είναι πιο ρεαλιστική (*Lodie et al, 2002*). Στην περίπτωση αυτή οι κυτταρικοί πληθυσμοί πιθανόν να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές βαθμίδες της ιεραρχίας των ΣΣΚ (*Caplan, 1994*), χωρίς όμως και πάλι να έχει γίνει δυνατή η διαλεύκανση της ιεραρχίας αυτής.

Πίνακας 1.2.5. Πληθυσμοί των ΣΣΚ

Πληθυσμός	Μέθοδος απομόνωσης	ΚΔ	Αναφορές
CFU-F (Colony Forming Units- Fibroblasts)	Φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας (1.070g/ml)		Gastro- Malaspina et al, 1980
MPCs (Mesenchymal Progenitor Cells)	Φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας (1.030g/ml)	13	Lazarus et al, 1995
MSC (Mesenchymal Stem Cells ή Marrow Stromal Cells)	Φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας (1.077g/ml)		Conget & Minguell, 1999
MSCs (Mesenchymal Stem Cells)	Φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας (1.073g/ml)	19-21	Pittenger et al, 1999
SS cells (Size-Sieved)	Φιλτράρισμα του μυελού με φίλτρο 3-μm		Hung et al, 2002
RS-1, RS-2, mMSCs (RS: Recycling Stem cell, m: mature)	Τοποθέτηση των MNC στην καλλιέργεια με χαμηλή πυκνότητα και επιλογή αυτών που επιδεικνύουν τη μεγαλύτερη κλωνογενή ικανότητα	50	Colter et al, 2000
STRO-1 ⁺	Χρησιμοποίηση του MA STRO-1 για τη θετική επιλογή των STRO-1 ⁺ κυττάρων	40	Simmons & Torok-Storb, 1991
CD105 ⁺	Χρησιμοποίηση του MA CD105 για τη θετική επιλογή των CD105 ⁺ κυττάρων		Majumdar et al, 2000
MAPCs (Multipotent Adult Progenitor Cells)	Χρησιμοποίηση των MA CD45 και GlyA για την αρνητική επιλογή των CD45 ⁻ GlyA ⁻	70	Reyes et al, 2001
CD271 ⁺	Χρησιμοποίηση του MA CD271 για τη θετική επιλογή των CD271 ⁺ κυττάρων		Quirici et al, 2002
MIAMI (Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible)	Τοποθέτηση του συνόλου των κυττάρων του μυελού σε υποξικό περιβάλλον και επιλογή αυτών που επιδεικνύουν τη μεγαλύτερη κλωνογενή ικανότητα	50	D'Ippolito et al, 2004
hBMSCs (human Bone marrow – derived Multipotent Stem Cells)	Τοποθέτηση του συνόλου των κυττάρων του μυελού στην καλλιέργεια και επιλογή αυτών που επιδεικνύουν τη μεγαλύτερη κλωνογενή ικανότητα	140	Yoon et al, 2005

1.2.6. Διαφοροποίηση των ΣΣΚ

Με την προσθήκη στην καλλιέργεια κατάλληλων παραγόντων τα ΣΣΚ μπορούν εύκολα να διαφοροποιηθούν –στο επίπεδο του ενός κυττάρου- σε κυτταρικούς τύπους μεσεγχυματικής προέλευσης όπως ινοβλάστες, οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, λιποκύτταρα και σκελετικούς μύες (*Friedenstein, 1982; Prockop, 1997; Pittenger et al, 1999*). Όταν μεταμοσχεύονται σε ακτινοβολημένα πειραματόζωα τα ΣΣΚ εγκαθίστανται στα οστά και στο χόνδρο και παράγουν ινοβλάστες και ινοβλαστοειδή κύτταρα τα οποία μπορούν να απομονωθούν και πάλι από τους πνεύμονες, τα μακριά οστά, την ουρά και το δέρμα (*Pereira et al, 1998*).

Εκτός όμως από τη διαφοροποίησή τους σε κύτταρα κοινής εμβρυολογικής καταγωγής, την τελευταία δεκαετία πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι τα ΣΣΚ διαθέτουν διαφοροποιητικό δυναμικό που απάδει της καταγωγής αυτής. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι τα ΣΣΚ μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε νευρικά (*Woodbury et al, 2000*), καθώς και σε ηπατικά κύτταρα (*Lee et al, 2004*), που είναι εξωδερμικής και ενδοδερμικής προέλευσης αντίστοιχα. Ο όρος πλαστικότητα χρησιμοποιείται περισσότερο για να περιγράψει τη δυνατότητα αυτή που φαίνεται να διαθέτουν και άλλα ενήλικα ΣΚ.

Από τους πληθυσμούς των ΣΣΚ που αναφέρονται στον πίνακα 1.2.5. αξιόλογο βαθμό πλαστικότητας επιδεικνύουν τα MIAMI, τα hBMSCs και τα MAPCs κύτταρα. Οι πληθυσμοί αυτοί παρουσιάζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα εμβρυονικά ΣΚ και για αυτό τους αποδίδεται και ο όρος της πολυδυναμίας (pluripotency) (*Ulloa-Montoya et al, 2005; Serafini et al, 2006*). Τα MIAMI μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κυτταρικούς τύπους μεσεγχυματικής προέλευσης, καθώς και σε νευρικά και κύτταρα του παγκρέατος. Επιπλέον, διαθέτουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (50ΚΔ) και ενεργότητα τελομεράσης, ενώ εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct-4 και Rex-1, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας των εμβρυονικών κυττάρων (*D'Ippolito et al, 2004*). Τα hBMSCs δεν εκφράζουν τον παράγοντα Oct-4, έχουν όμως ακόμα μεγαλύτερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό (140ΚΔ) και ενεργότητα τελομεράσης. Όπως και τα MIAMI είναι ικανά να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα και των τριών βλαστικών δερμάτων, ενώ έχειδειχθεί και η *in vivo* δυνατότητά τους να δημιουργήσουν καρδιομυοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και ενδοθήλιο (*Yoon et al, 2005*). Τέλος, οι παράγοντες Oct-4 και Rex-1 έχουν ανευρεθεί στα MAPCs του ποντικού, όχι όμως και στα ανθρώπινα. Τα τελευταία μπορούν να πραγματοποιήσουν περισσότερες από 50ΚΔ χωρίς βράχυνση

των τελομερών και απώλεια του διαφοροποιητικού τους δυναμικού. Το δυναμικό αυτό έχει δείχθει τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στην καλλιέργεια τα MAPCs διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, λιποκύτταρα, σκελετικά μυοκύτταρα, αλλά και σε ενδοθηλιακά, ηπατοκύτταρα και νευρικά κύτταρα (Jiang *et al*, 2002; Reyes *et al*, 2002; Schwartz *et al*, 2002; Jiang *et al*, 2003). Επιπλέον, όταν ένα γενετικά σημασμένο MAPC εισάγεται σε μία βλαστοκύστη, οι περισσότεροι -αν όχι όλοι- οι ιστοί του νεογέννητου ποντικού είναι χμαιοειδείς (Jiang *et al*, 2002; Keene *et al*, 2003), ενώ, όταν μεταμοσχεύεται σε ένα ακτινοβολημένο πειραματόζωο συμβάλλει -αν και σε μικρό βαθμό- στην αναγέννηση του αιμοποιητικού συστήματος και του επιθηλίου του εντέρου, του πνεύμονα και του ήπατος.

1.2.7. Πλαστικότητα και πιθανοί μηχανισμοί πλαστικότητας

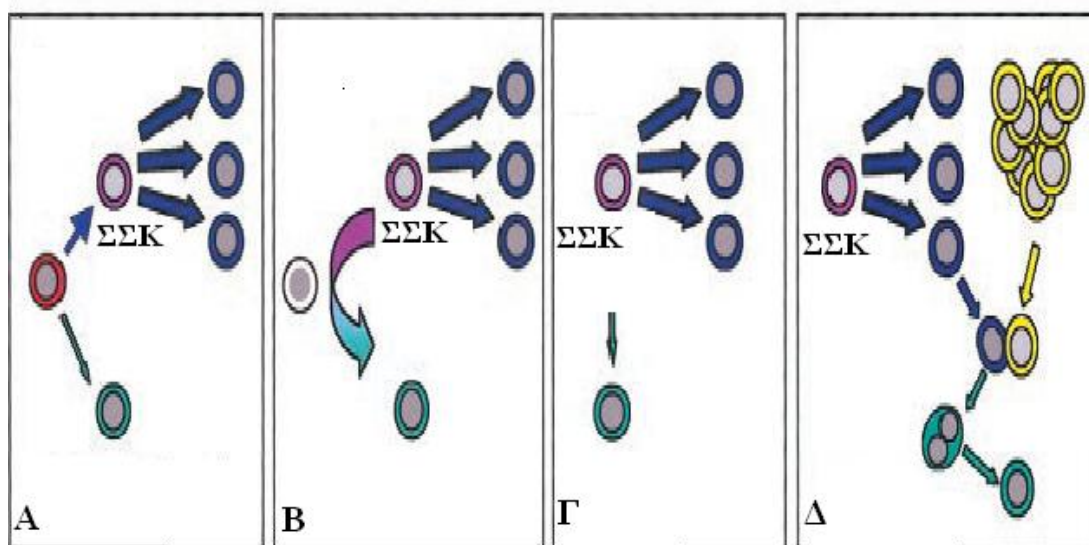
Ο όρος πλαστικότητα έχει χρησιμοποιηθεί -όπως προαναφέρθηκε- για να περιγράψει την ικανότητα των ενηλίκων ΣΚ να δίνουν γένεση σε κύτταρα διαφορετικής εμβρυικής προέλευσης, από αυτήν της δικιάς τους καταγωγής. Ποικίλοι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό που επιδεικνύουν τα ΣΣΚ, τα ΑΣΚ αλλά και άλλες κατηγορίες ενηλίκων ΣΚ, και η τυχόν απόδειξη ενός από αυτούς δε σημαίνει απαραίτητα και τον αποκλεισμό των άλλων.

Μία πιθανή εξήγηση είναι η ύπαρξη ενός πληθυσμού πολυδύναμων ΣΚ στο μυελό των οστών, τα οποία δεν έχουν δεσμευτεί προς καμιά αναπτυξιακή κατεύθυνση, διατηρώντας έτσι το δυναμικό διαφοροποίησης που χαρακτηρίζει και τα εμβρυονικά ΣΚ (Εικόνα 1.2.7. Α).

Εναλλακτικά, δεσμευμένα ΣΣΚ μπορούν να μεταδιαφοροποιηθούν (Εικόνα 1.2.7. Β-Γ). Στην περίπτωση αυτή τα ΣΣΚ, αν και έχουν δεσμευτεί σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό μονοπάτι μέσω αλλαγών του DNA, μπορούν να αλλάξουν το προφίλ της γονιδιακής τους έκφρασης και να ακολουθήσουν διαφορετική αναπτυξιακή κατεύθυνση. Αυτό μπορεί να γίνει έμμεσα (*indirect transdifferentiation*) (Εικόνα 1.2.7. Β) ή άμεσα (*direct transdifferentiation*) (Εικόνα 1.2.7. Γ). Στην πρώτη περίπτωση απαιτείται αρχικά αποδιαφοροποίηση (*dedifferentiation*) και στη συνέχεια επαναδιαφοροποίηση (*redifferentiation*) προς καινούργια κατεύθυνση, ενώ στη δεύτερη πραγματοποιείται άμεση μετάβαση από τη μια κατεύθυνση στην άλλη.

Τέλος, ορισμένοι ερευνητές πιθανολογούν ότι η πλαστικότητα των ενηλίκων ΣΚ είναι αποτέλεσμα σύντηξης (*fusion*) δύο διαφορετικών κυτταρικών τύπων (Εικόνα 1.2.7. Δ). Το ετεροκάρυο (*heterokaryon*) που δημιουργείται μπορεί να

διαθέτει φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ενός ή/και του άλλου κυττάρου (Terada *et al*, 2002; Ying *et al*, 2002), ενώ οι δύο πυρήνες δεν είναι απαραίτητο να συντηχθούν. Πολλές μελέτες αντικρούουν την άποψη αυτή, δείχνοντας με χρωμοσωμική ανάλυση ότι τα κύτταρα που επιδεικνύουν πλαστικότητα είναι 2N και όχι 4N (LaBarge & Blau, 2002; Masuya *et al*, 2003). Ακόμα βέβαια, και αν η κυτταρική σύντηξη αποδειχθεί υπεύθυνη για τον *in vivo* επαναπρογραμματισμό των κυττάρων, εξακολουθούμε να μιλάμε για πλαστικότητα χωρίς όμως τα κύτταρα που συντήκονται να είναι απαραίτητα ΣΚ (Herzog *et al*, 2003).



Εικόνα 1.2.7. Πιθανοί μηχανισμοί πλαστικότητας Α) Διαφοροποίηση πολυδύναμων ΣΚ Β) Έμμεση μεταδιαφοροποίηση Γ) Άμεση μεταδιαφοροποίηση Δ) Σύντηξη

Αντιθέτως, η ύπαρξη ενός πληθυσμού πολυδύναμων ΣΚ στο μυελό των οστών, όπως σχηματικά απεικονίζεται στην εικόνα 1.2.7. Α, ουσιαστικά καταργεί την έννοια της πλαστικότητας σε κυτταρικό επίπεδο. Στην περίπτωση αυτή θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε τον όρο με ακρίβεια αναφερόμενοι όμως στην πλαστικότητα κυτταρικού πληθυσμού και όχι μεμονωμένων κυττάρων. Ένας υποψήφιος τέτοιος πληθυσμός είναι τα MAPC, αφού όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.2.6., συμβάλλουν στη δημιουργία των περισσότερων κυτταρικών τύπων όταν εισάγονται στη βλαστοκύστη (Grove *et al*, 2004; Kemp *et al*, 2005).

Οποσδήποτε, το φαινόμενο της πλαστικότητας χρήζει περισσότερης διερεύνησης, αφού δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν η πολυδυναμία που επιδεικνύουν τα MAPC και άλλοι πληθυσμοί των ΣΣΚ είναι μια ιδιότητα που τα χαρακτηρίζει και *in vivo* ή είναι αποτέλεσμα γενετικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν κατά την

παραμονή τους στην καλλιέργεια κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (*Jiang et al, 2002*).

Για μεγάλο χρονικό διάστημα η πλαστικότητα των ενήλικων ΣΚ είχε τοποθετηθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας, αποδίδοντας σε αυτήν τα ευεργετικά αποτελέσματα που είχαν παρατηρηθεί, όσον αφορά στην αναγέννηση ιστών που είχαν υποστεί βλάβη μετά τη χορήγηση τέτοιων κυττάρων. Η προοπτική, τα ενήλικα ΣΚ να μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση αφενός ποικίλων νοσημάτων και αφετέρου της γήρανσης, χάρι στη δυνατότητά τους αυτή να προσομοιάζουν με τα εμβρυονικά ΣΚ, είχε εγείρει υπέρμετρο ενθουσιασμό και ελπίδες. Αργότερα η άποψη αυτή αναθεωρήθηκε αφού η όποια θεραπευτική δράση των χορηγούμενων ενήλικων ΣΚ φάνηκε να σχετίζεται περισσότερο με αποτελέσματα παρακρινών μηχανισμών, παρά με τη διαφοροποίησή τους σε κυτταρικούς τύπους του ιστού που παρουσιάζει τη βλάβη (παράγραφος 1.2.13.).

Όμως, παρά την υπαναχώρηση στο θέμα της πλαστικότητας των ενήλικων ΣΚ, θεωρούμε σκόπιμο στο σημείο αυτό να υπενθυμίσουμε ότι η αναπαραγωγική κλωνοποίηση που έχει επιτευχθεί στα θηλαστικά, είναι απόδειξη της δυνατότητας για επαναπρογραμματισμό του σωματικού κυττάρου, αρκεί αυτό να βρεθεί στο κατάλληλο περιβάλλον. Στην ιδέα αυτή εξάλλου στηρίζονται και οι προσπάθειες των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια για την ανάπτυξη των iPS.

1.2.8. Ετερογένεια των ΣΣΚ

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ΣΣΚ δεν αποτελούν ομοιογενή πληθυσμό αλλά ένα ετερογενές σύνολο, από λιγότερο ή περισσότερο δεσμευμένα κλωνογενή κύτταρα, με ποικίλες δυνατότητες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Αυτό προκύπτει από την εξέταση μεμονωμένων αποικιών η κάθε μία από τις οποίες προέρχεται από ένα μόνο ΣΣΚ. Οι αποικίες αυτές εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα που αφορά το μέγεθός τους, τη μορφολογία των κυττάρων, τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά αλλά και το δυναμικό διαφοροποίησής τους.

Για παράδειγμα, ο Pittenger και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι μόνο το ένα τρίτο από τα αρχικά κλωνογενή κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και λιποκύτταρα (*Pittenger et al, 1999*). Παρομοίως, ο Muraglia και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το 30% των αποικιών που

παράγονται *in vitro* είναι τρι-δύναμες (οστεο/χονδρο/λιπο), ενώ οι υπόλοιπες είναι δι-δύναμες (οστεο/χονδρο) ή μονο-δύναμες (οστεο) (Muraglia *et al*, 2000).

Τα δεδομένα αυτά μπορούν να εξηγηθούν με την παρατήρηση ότι ο πληθυσμός των ΣΣΚ εμπεριέχει πολλούς υποπληθυσμούς, ο καθένας από τους οποίους αντιπροσωπεύει διαφορετικό στάδιο διαφοροποίησης. Στο μοντέλο αυτό, που είναι παρόμοιο με εκείνο των ΑΣΚ, τα περισσότερα αρχέγονα και πολυδύναμα κύτταρα απαντώνται με τη μικρότερη συχνότητα, ενώ οι πιο δεσμευμένοι κυτταρικοί τύποι συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού.

1.2.9. Πηγές των ΜΣΚ

Εκτός από το μυελό των οστών, κύτταρα που η συμπεριφορά και τα χαρακτηριστικά τους στην καλλιέργεια προσομοιάζουν με αυτά των ΣΣΚ, έχουν απομονωθεί από μια σειρά ιστών όπως: το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (Erices *et al*, 2000), το λιπώδη ιστό (Zuk *et al*, 2002), το χόνδρινο ιστό (Hiraoka *et al*, 2006), το μυϊκό ιστό (Nesti *et al*, 2008), το θύμο (Rzhaninova *et al*, 2005), το δέρμα (Shih *et al*, 2005), τον οδοντικό πολφό (Perry *et al*, 2008), τους πνεύμονες (Sabatini *et al*, 2005), κ.ά. Ιστούς δηλαδή, που αντιπροσωπεύουν και τα τρία βλαστικά δέρματα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.2., στην παρούσα εργασία, το σύνολο των ΣΣΚ του μυελού των οστών αλλά και όλων εκείνων των ΣΚ που προέρχονται από άλλους ιστούς και δίνουν γένεση στην καλλιέργεια, κυτταρικών πληθυσμών όμοιων με αυτούς των ΣΣΚ, θα περιγράφονται με τον όρο Μεσεγχυματικά Στελεχιαία Κύτταρα (ΜΣΚ).

1.2.10. Θέσεις (niches) των ΜΣΚ *in vivo*

Ο χαρακτηρισμός των ΜΣΚ βασίζεται αποκλειστικά στην ανάλυση των *in vitro* εκπυσσόμενων κυτταρικών πληθυσμών και παρά την εντατική έρευνα των τελευταίων χρόνων, η ακριβής θέση αλλά και ο ρόλος των αυτοχθόνων ΜΣΚ, στους ιστούς από τους οποίους προέρχονται, δεν είναι γνωστά. Η απομάκρυνση από το φυσικό τους περιβάλλον και η χρησιμοποίηση διαφόρων χημικών αλλά και φυσικών συνθηκών ανάπτυξης, είναι πολύ πιθανόν να τροποποιεί τόσο τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους, όσο και τις λειτουργικές τους δυνατότητες.

Με δεδομένο ότι οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που δημιουργούνται στην καλλιέργεια από τα ΜΣΚ (οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα), βρίσκονται σε όλο τον οργανισμό, οι θέσεις των στελεχιαίων αυτών κυττάρων *in*

νίνο, θα πρέπει να είναι τέτοιες, που να επιτρέπουν στους απογόνους τους να φθάνουν σε όλους σχεδόν τους ιστούς και τα όργανα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι υπάρχουν τρεις πιθανότητες:

α) τα ΜΣΚ να βρίσκονται σε έναν μόνο ιστό ή όργανο απ' όπου εξέρχονται και μεταναστεύουν σε άλλα σημεία με σκοπό να αναπληρώσουν κυτταρικούς πληθυσμούς που έχουν καταστραφεί, είτε λόγω απόπτωσης, είτε λόγω οργανικής βλάβης.

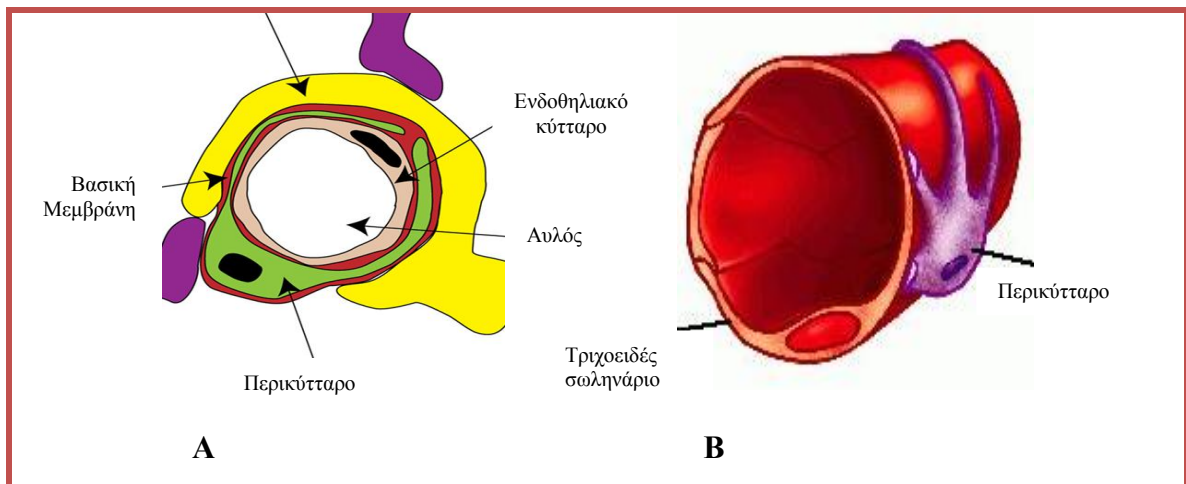
β) ΣΚ διαφορετικών ιστών ή οργάνων να επιδεικνύουν όμοια χαρακτηριστικά και ιδιότητες στην καλλιέργεια

γ) η τρίτη υπόθεση συσχετίζει τα ΜΣΚ με τα περιαγγειακά κύτταρα (perivascular cells) ή περικύτταρα (pericytes) και είναι αυτή που υποστηρίζεται περισσότερο από τα έως τώρα πειραματικά δεδομένα, προσφέροντας ταυτόχρονα και επαρκή εξήγηση για την απομόνωση των κυττάρων αυτών από πληθώρα ιστών (*Meirelles et al, 2008*).

1.2.11. Τα Περικύτταρα

Τα περικύτταρα αναφέρονται και ως περιενδοθηλιακά κύτταρα ή κύτταρα Rouget ή τοιχωματικά κύτταρα (mural cells). Αποτελούν μέρος του συνδετικού ιστού και είναι ενσωματωμένα στη βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδικών αλλά και μεγαλύτερων αγγείων (Εικόνα 1.2.11.). Πρόκειται για σχετικά αδιαφοροποίητα κύτταρα που υποστηρίζουν τα αγγεία, αλλά μπορούν και να διαφοροποιηθούν σε ινοβλάστες, λεία μυϊκά κύτταρα, καθώς και μακροφάγα αν χρειαστεί.

Η καλλιέργεια κυττάρων που προέρχονται από τα τοιχώματα των τριχοειδικών σωληναρίων έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυτταρικών πληθυσμών όμοιων με αυτούς που δημιουργούνται από τα ΜΣΚ (*Abidin et al, 2004*), ικανοί να υποστηρίξουν την αιμοποίηση και να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα (*Doherty et al, 1998; Farrington-Rock et al, 2004*). Ο Crisan και οι συνεργάτες του έδειξαν επιπλέον ότι περιαγγειακά, μη καλλιεργημένα κύτταρα εκφράζουν δείκτες των ΜΣΚ (*Crisan et al, 2008*). Τέλος, η έμφυτη τάση των ΜΣΚ να αποκτούν χαρακτηριστικά των ιστών από τους οποίους προέρχονται, όταν καλλιεργούνται παρουσία ώριμων κυτταρικών τύπων από τους ίδιους ιστούς, συνάδει με την ικανότητα των περιαγγειακών ΣΚ να διαφοροποιούνται *in vivo* σε κύτταρα ειδικά των αντιστοίχων ιστών (*Lange et al, 2005; Choi et al, 2005; Wang et al, 2007*).



Εικόνα 1.2.11. Α. Εγκάρσια διατομή τριχοειδούς σωληναρίου
Β. Τρισδιάστατη εικόνα τριχοειδούς σωληναρίου

Τα ευρήματα των μελετών που αναφέρθηκαν αλλά και πολλών άλλων οδήγησαν ορισμένους ερευνητές να υποστηρίξουν την άποψη ότι οι όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί που χαρακτηρίζονται ως ΜΣΚ στην καλλιέργεια είναι *in vitro* απόγονοι των περικυττάρων, χωρίς όμως από αυτό να συνεπάγεται και το αντίστροφο, ότι δηλαδή και όλα τα περικύτταρα είναι ΜΣΚ (Meirelles *et al*, 2008; Caplan, 2008). Αντιθέτως, τα μικρά αλλά και μεγάλα αγγεία περιβάλλονται πέραν των ΜΣΚ, από περιαγγειακά κύτταρα περισσότερο διαφοροποιημένα, όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα, που δε διαθέτουν την πλαστικότητα των ΜΣΚ, αλλά και από άλλα ΣΚ που αποτελούν προγονικά κύτταρα ιστών ενδοδερμικής ή εξωδερμικής προέλευσης. Για παράδειγμα, περικύτταρα στον εγκέφαλο φαίνεται να φέρουν το δυναμικό των νευρικών στελεχιαίων κυττάρων (Dore-Duffy *et al*, 2006), ενώ περικύτταρα στο ήπαρ, επιδεικνύουν ιδιότητες των προγονικών ηπατικών κυττάρων (Kordes *et al*, 2007). Επομένως, τα περικύτταρα αποτελούν ένα σύνολο διαφοροποιημένων και στελεχιαίων κυττάρων, υποσύνολο του οποίου ενδεχομένως συνιστούν τα ΜΣΚ.

1.2.12. Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των ΜΣΚ

Αν και αρχικά το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη μελέτη των ΜΣΚ ώθησαν η πλαστικότητα και η αναγεννητική τους ιδιότητα, τα τελευταία χρόνια ο ρόλος που φαίνεται να κατέχουν στην τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης είναι περισσότερο ελκυστικός. Τα ΜΣΚ δεν εκφράζουν τα MHC class II αντιγόνα και τα περισσότερα από τα μόρια συνδιέγερσης όπως τα CD40, CD80 και CD86 με αποτέλεσμα να μην μπορούν να δράσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να

διαφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Caplan, 2009; Salem et al, 2010).

Σε πολυάριθμες *in vitro* μελέτες έχει καταδειχτεί ότι είναι ικανά να καταστείλουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων, όταν αυτά εκτεθούν σε αλλοαντιγόνα ή μη ειδικούς μιτογόνους παράγοντες. Η κατασταλτική τους δράση σχετίζεται περισσότερο με την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, συγκρατώντας τα εν λόγω κύτταρα στη G_0 / G_1 φάση του κυτταρικού κύκλου, παρά με την επαγωγή της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στα T-βοηθητικά κύτταρα (T-helper cells, Th) τα ΜΣΚ καταστέλλουν κυρίως τα Th-1, με αποτέλεσμα να μειώνεται η έκκριση της INF- γ , ενώ παράλληλα, ωθούν τα Th-2 να αυξήσουν την παραγωγή της IL-4 (Sato et al, 2010). Επίσης, ευοδώνουν τον πληθυσμό των ρυθμιστικών $CD4^+ CD25^+$ T-κυττάρων, που ως γνωστόν έχουν κατασταλτική δραστηριότητα (Meirelles et al, 2008). Τέλος, διαφεύγουν από τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα καταστέλλοντας ταυτόχρονα την κυτταροτοξική τους δράση (Ghannam et al, 2010).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα ΜΣΚ τροποποιούν την ανοσολογική συμπεριφορά των T-κυττάρων δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις, ότι οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και ακόμα περισσότερο, ποικίλοι διαλυτοί παράγοντες συμμετέχουν σε αυτούς.

Ο Di Nicola και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο TGF- β (Transforming Growth Factor- β) και ο HGF (Hepatocyte Growth Factor) παίζουν σημαντικό ρόλο, αφού αντισώματα έναντι αυτών αποκαθιστούν την απάντηση των T- λεμφοκυττάρων στη μεικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια (Di Nicola et al, 2002). Άλλο υποψήφιο μόριο αποτελεί η PGE₂ (Prostaglandin E₂). Η PGE₂ είναι ένα προϊόν μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και αφενός αναστέλλει τη μιτωτική διαίρεση των T- κυττάρων και την παραγωγή της IL-2, αφετέρου, αποτελεί συμπαράγοντα στη δραστηριότητα των Th-2 βοηθητικών κυττάρων. Η παραγωγή της PGE₂ από τα ΜΣΚ επαυξάνεται μετά τη διέγερσή τους από τον TNF- α και την INF- γ , ενώ η παρεμπόδιση της δραστηριότητάς της με ειδικούς αναστολείς αποκαθιστά τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων (Aggarwall et al, 2005). Τελευταία έχει προταθεί να παίζει σημαντικό ρόλο και το ένζυμο IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase). Τα ΜΣΚ κατόπιν διέγερσης με INF- γ επιδεικνύουν IDO δραστικότητα, μεταβολίζοντας την τρυπτοφάνη σε κυνουρενίνη. Αποτέλεσμα της μεταβολικής αυτής διαδικασίας είναι η συσσώρευση

τοξικών παραπροϊόντων, τα οποία και θεωρούνται υπεύθυνα για την επαγωγή της απόπτωσης των T-κυττάρων (*Nauta et al, 2007*) (Εικόνα 1.2.12.).

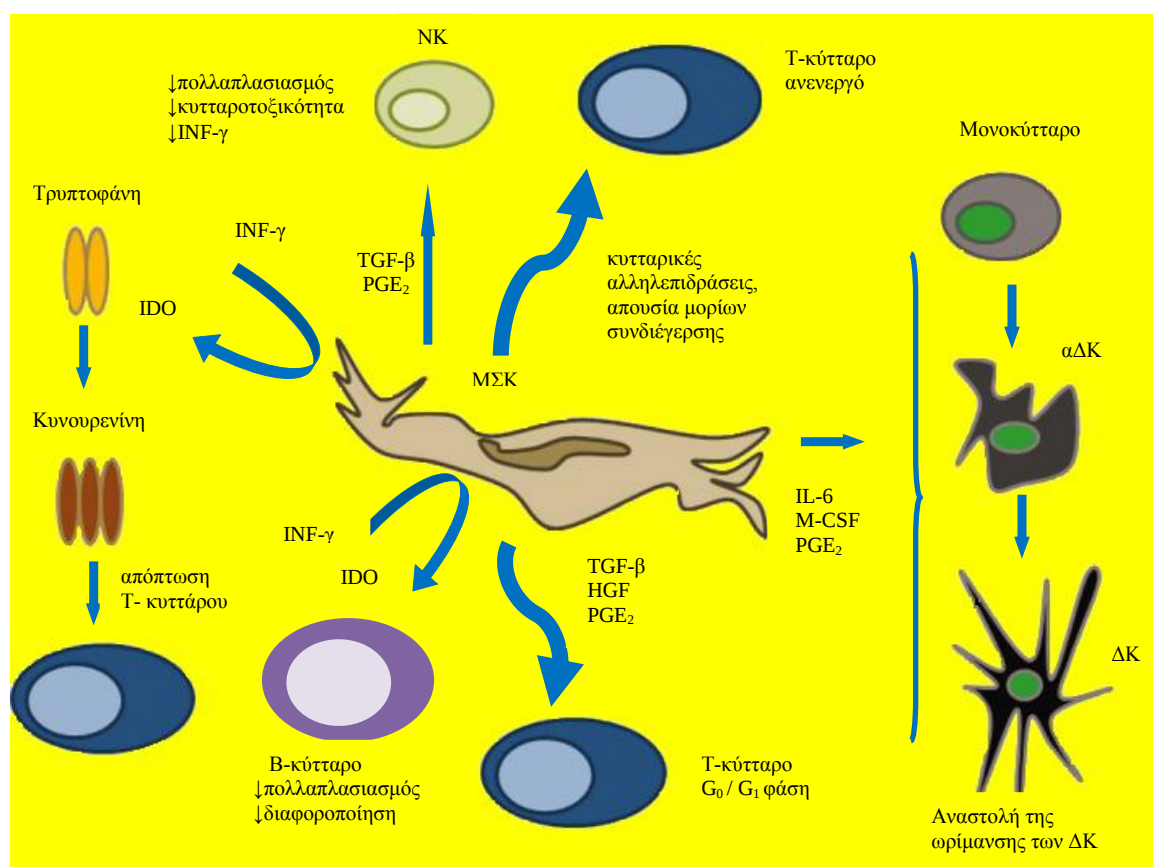
Πέραν της αναστολής του πολλαπλασιασμού και της επαγωγής της απόπτωσης, έναν ακόμα πιθανό μηχανισμό, με τον οποίο τα ΜΣΚ επιτυγχάνουν την καταστολή των T-κυττάρων, αποτελεί η κατάλυση της ενεργότητάς τους. Οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και η απουσία των μορίων συνδιέγερσης, όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται να σχετίζονται με αυτό το μονοπάτι (*Nauta et al, 2007*) (Εικόνα 1.2.12.), το οποίο πιθανόν να οδηγεί στην ανοσοανοχή. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η ανενεργότητα αυτή των T-κυττάρων είναι παροδική και αποκαθίσταται μετά την απομάκρυνση των ΜΣΚ (*Di Nicola et al, 2002; Krampera et al, 2003*), ενώ άλλες στο ποντίκι, έχουν δείξει ότι επέρχεται ανοχή (*Zappia et al, 2005*).

Τα ΜΣΚ αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων που έχουν ενεργοποιηθεί με αντι-Ig αντισώματα, διαλυτά CD40 μόρια ή κυτοκίνες. Επίσης, επηρεάζουν τη διαφοροποίησή τους, την παραγωγή αντισωμάτων και τη χημειοτακτική συμπεριφορά τους. Για την κατασταλτική αυτή δραστηριότητα των ΜΣΚ απαιτείται η παρουσία εξωγενούς INF- γ . Η INF- γ διεγείρει την παραγωγή του ενζύμου IDO από τα ΜΣΚ και αυτό με τη σειρά του καταστέλλει τα B-κύτταρα, μέσω της μεταβολικής οδού της τρυπτοφάνης (*Krampera et al, 2006*). Εκτός από το IDO, η απελευθέρωση διαφόρων διαλυτών παραγόντων, σε συνδυασμό με παρακρινικούς διαβιβαστές από τα B-κύτταρα, είναι επίσης ικανή να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό των τελευταίων (*Corcione et al, 2006*).

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (natural killer, NK) επιδεικνύουν κυτταρολυτική δραστηριότητα, που στοχεύει κυρίως κύτταρα που δεν εκφράζουν τα HLA τάξης I μόρια. Έχει προταθεί ότι τα ΜΣΚ καταστέλλουν τον επαγόμενο από την IL-2 ή IL-15 πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων, την παραγωγή της INF- γ και την κυτταροτοξικότητα εναντίον κυττάρων που εκφράζουν τα HLA τάξης I μόρια. Μερικά από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να εξαρτώνται από κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και άλλα από την απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων του TGF- β και της PGE₂ (*Ghannam et al, 2010*) (Εικόνα 1.2.12.).

Τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ) επιδεικνύουν σημαντική αντιγονοπαρουσιαστική ιδιότητα και κατέχουν ουσιώδη ρόλο στην επαγωγή της ανοσίας και της ανοχής. Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσής τους, τα ανώριμα ΔΚ (αΔΚ) αρχίζουν να

εκφράζουν τα μόρια συνδιέγερσης, ενώ αυξάνεται και η έκφραση των αντιγόνων MHC τάξης I και τάξης II. Τα ΜΣΚ έχει δειχθεί ότι παρεμβαίνουν στη



Εικόνα 1.2.12. Ανοσοτροποποιητικές δράσεις των ΜΣΚ

διαφοροποίηση, ωρίμανση και λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, *in vitro* αναστέλλουν την ωρίμανση των μονοκυττάρων και $CD34^+$ αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων σε ΔΚ, μειώνοντας την έκφραση των παραπάνω μορίων, καθώς και την παραγωγή της IL-12, INF- γ και του TNF α . Αντιθέτως, αυξάνονται τα επίπεδα της IL-10. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ανώριμων μορφών ΔΚ που έχουν κατασταλτικές ή ανασταλτικές ιδιότητες. Η παραγωγή της IL-6, του M-CSF και της PGE_2 από τα ΜΣΚ θεωρείται να παίζει ρόλο στην παραπάνω δράση (Ghannam *et al*, 2010) (Εικόνα 1.2.12.).

Τα όσα υποστηρίζουν οι παραπάνω μελέτες, αλλά και πολλές άλλες, δεν είναι επαρκώς αποδεδειγμένα, αφού τα δεδομένα άλλων ερευνητών δεν τα επιβεβαιώνουν ή ακόμα και τα αντικρούουν. Τα αντιγόνα MHC class I, διάφορα μόρια προσκόλλησης όπως τα VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule), LFA-3 (Lymphocyte Functional Antigen-3) και ορισμένες ιντεγκρίνες

μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους αντίστοιχους υποδοχείς των T- κυττάρων, καθιστώντας τις ιδιότητες των ΜΣΚ και την επίδρασή τους στην ανοσολογική απάντηση πολύ πιο περίπλοκη απ' ό,τι αρχικά μπορεί να θεωρήθηκε (*Salem et al, 2010*). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα ΜΣΚ ασκούν τη δράση τους στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι πλειοτροπικοί και απέχουμε πολύ από την κατανόησή τους.

1.2.13. Ο ρόλος των ΣΣΚ στην ανάπλαση των ιστών

Η ανάπλαση των ιστών επιτυγχάνεται από μια περίπλοκη ακολουθία γεγονότων. Αμέσως μετά τον τραυματισμό ενός ιστού, σχηματίζεται ένας θρόμβος αίματος. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν ποικίλους αυξητικούς παράγοντες. Φλεγμονώδης διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσα σε λίγες ώρες μετά τον τραυματισμό, ανοίγοντας το δρόμο για τη μεταγενέστερη ανοσολογική απάντηση. Κατά τη διάρκεια των επόμενων ημερών, διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι μεταναστεύουν στο σημείο της κάκωσης, τοπικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, ινοβλάστες εναποθέτουν εξωκυτταρικές ουσίες και η διαδικασία της ανάπλασης ξεκινά.

Στην παραπάνω διεργασία φαίνεται να εμπλέκονται και τα περικύτταρα, τα οποία έχει δείχθει ότι ανευρίσκονται σε μεγάλο αριθμό σε δείγματα ιστού από ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση ή εκτεταμένες βλάβες (*Sundberg et al, 1996*).

Με βάση τις έως τώρα μελέτες, τα περικύτταρα και ως εκ τούτου τα ΜΣΚ, φαίνεται να πολλαπλασιάζονται τοπικά αμέσως μετά τον τραυματισμό ενός ιστού και να ενεργοποιούνται, εκκρίνοντας σημαντικές ποσότητες αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Οι διαλυτοί αυτοί παράγοντες, με παρακρινείς κυρίως μηχανισμούς, επιτυγχάνουν αποτελέσματα, όπως: α) αναστολή της απόπτωσης και περιορισμό της περιοχής της βλάβης, β) αναστολή της ίνωσης, γ) υποβοήθηση της λειτουργικής αποκατάστασης των τραυματισμένων κυττάρων, δ) ενεργοποίηση της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα την επιπλέον διοχέτευση αίματος, και ε) ενεργοποίηση της μίτωσης των τοπικών στελεχιαίων κυττάρων. Η συμβολή τους επομένως στην ανάπλαση των ιστών σχετίζεται περισσότερο με την αντιφλεγμονώδη δράση τους παρά με τη διαφοροποίησή τους σε κυτταρικούς τύπους του ιστού που παρουσιάζει τη βλάβη, όπως αρχικά θεωρήθηκε (*Caplan, 2009*).

Οι παραπάνω δράσεις των πολλαπλασιαζόμενων Περ. / ΜΣΚ φαίνεται να ενισχύονται με την έγχυση, τοπική ή συστηματική, απομονωμένων ΣΣΚ,

καλλιεργημένων ή μη. Ο Chapel και οι συνεργάτες του, σε ένα μοντέλο πολλαπλής οργανικής ανεπάρκειας έδειξαν ότι, ΣΣΚ σημασμένα με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), ανιχνεύονται σε πολλούς ιστούς και σε βαθμό ανάλογο με τη σοβαρότητα και την έκταση της βλάβης (Chapel et al, 2003). Πολυάριθμες μελέτες επιβεβαιώνουν τα παραπάνω ευρήματα, ενισχύοντας την άποψη, ότι τα ΣΣΚ όταν εγχέονται ενδοφλεβίως, έχουν τη δυνατότητα να μεταναστεύουν στις περιοχές που φλεγμαίνουν και ισχαιμούν (Augello et al, 2010). Λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς με τους οποίους αυτό επιτυγχάνεται. Ωστόσο, η απελευθέρωση κυτοκινών, χυμοκινών και άλλων χημειοτακτικών παραγόντων από το σημείο της φλεγμονής και η αλληλεπίδρασή τους με ιντεγκρίνες και σελεκτίνες που εκφράζονται στην επιφάνεια των ΣΣΚ, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο (Bernardo et al, 2011).

Η ποικιλοότητα που παρατηρείται όσον αφορά την ικανότητα αυτή των ΣΣΚ να προσελκύονται στην περιοχή της βλάβης, πιθανόν να οφείλεται, στις διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης και εξωσωματικού πολλαπλασιασμού που χρησιμοποιούνται. Οι συνεχόμενες ανακαλλιέργειες έχουν συσχετισθεί με μείωση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης, απώλεια υποδοχέων των χυμοκινών και ως εκ τούτου μειωμένη χημειοτακτική απάντηση (Salem et al, 2010).

Γενικά, η εγκατάσταση των ΣΣΚ στις πάσχουσες περιοχές, με βάση τις έως τώρα μελέτες, τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο, είναι παροδική και περιορίζεται σε πολύ μικρό ποσοστό 0.1-2.7%. Ωστόσο, είναι ενθαρρυντικό το γεγονός, ότι αυτό αρκεί για να επιφέρει ένα κλινικά σημαντικό αποτέλεσμα (Bernardo et al, 2011).

1.3. Κλινικές εφαρμογές των ΣΣΚ

1.3.1. ΣΣΚ και μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων

Πολυάριθμες μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν καταδείξει ότι στην περίπτωση της μεταμόσχευσης, τα ΣΣΚ ευνοούν την εγκατάσταση των αιμοποιητικών μοσχευμάτων, κυρίως, όταν η δόση των μεταμοσχευόμενων ΑΣΚ είναι πολύ μικρή. Το γεγονός αυτό οδήγησε γρήγορα τους ερευνητές στην προσπάθεια αξιοποίησής τους στην κλινική πράξη με την προσδοκία, ότι θα μπορούσαν να διευκολύνουν την αιμοποιητική αποκατάσταση και να αποτρέψουν την απόρριψη μοσχευμάτων.

Η πρώτη κλινική μελέτη αφορούσε 28 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, στις οποίες παρατηρήθηκε γρήγορη αιμοποιητική αποκατάσταση μετά τη συν-χορήγηση αυτόλογων περιφερικών αιμοποιητικών προγονικών κύτταρων και αυτόλογων

καλλιεργημένων ΣΣΚ (Koc et al, 2000). Ακολούθησαν πολυκεντρικές μελέτες, φάσης I/II, που αφορούσαν ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, οι οποίοι είχαν μεταμοσχευθεί με αλλογενή αιμοποιητικά κύτταρα συγγενούς, με ή χωρίς αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων. Όλες έδειξαν ότι, η χορήγηση ΣΣΚ προερχομένων από το δότη και εκπυγμένων στην καλλιέργεια ήταν εφικτή, ασφαλής και σε ορισμένες περιπτώσεις συντελούσε στη γρηγορότερη αποκατάσταση της αιμοποίησης και σε μικρότερο ποσοστό απόρριψης σε σχέση με τους μάρτυρες (Lazarus et al, 2005; Ball et al, 2007).

Στη συνέχεια, η χρησιμοποίηση καλλιεργημένων ΣΣΚ υιοθετήθηκε σε μεταμοσχεύσεις με ομφαλοπλακουντιακό αίμα (ΟΠΑ), που ως γνωστόν αποτελεί εναλλακτική πηγή ΑΣΚ. Οι πρώτες κλινικές μελέτες αφορούσαν παιδιατρικούς ασθενείς που είχαν λάβει μη συγγενές ΟΠΑ και ΣΣΚ τρίτου ατόμου. Η χορήγηση των ΣΣΚ αποδείχτηκε ασφαλής, αλλά σε αντίθεση με τα δεδομένα από προκλινικές μελέτες και την εμπειρία από τις απλοταυτόσημες μεταμοσχεύσεις, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την επίτευξη της αιμοποιητικής αποκατάστασης, ούτε και στα ποσοστά εγκατάστασης, σε σχέση με τους μάρτυρες (MacMillan et al, 2008; Bernardo et al, 2011).

Τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν την ασφάλεια χορήγησης ΣΣΚ μαζί με το αιμοποιητικό μόσχευμα, ωστόσο δεν αποδεικνύουν ότι επιταχύνουν την αιματολογική αποκατάσταση ή προωθούν την εγκατάστασή του. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως όταν έχει πραγματοποιηθεί αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων από απλοταυτόσημο μόσχευμα, τα ΣΣΚ πιθανόν να ρυθμίζουν την αλλοαντιδραστικότητα του λήπτη, προωθώντας έτσι την εγκατάσταση και μειώνοντας τις πιθανότητες απόρριψης του μοσχεύματος.

Δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι τα ΣΣΚ ευνοούν την εγκατάσταση των αιμοποιητικών κυττάρων και με άλλους τρόπους, πλην των ανοσορυθμιστικών μηχανισμών, όπως με την προώθηση της λειτουργικής αποκατάστασης του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, μέσω της έκκρισης παρακρινών μεσολαβητών. Ακόμη όμως, πρέπει να συζητηθεί περαιτέρω, το αν η επίδραση τους στην επιτάχυνση της αιμοποιητικής αποκατάστασης και η θεραπευτική τους δράση εξαρτάται και από τον ίδιο τον τύπο της μεταμόσχευσης (Bernardo et al, 2011).

Η διεξαγωγή μεγάλων, πολυκεντρικών και τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών, ειδικά σχεδιασμένων για τη διερεύνηση του ρόλου των ΣΣΚ στην επιτάχυνση της αιμοποιητικής αποκατάστασης και στην αποφυγή της απόρριψης του μοσχεύματος,

σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους θεραπείας, είναι απαραίτητη προκειμένου να διαλευκανθεί η πραγματική αξία αυτής της προσέγγισης.

1.3.2. ΣΣΚ και Νόσος Μοσχεύματος κατά Ξενιστή

Οι *in vitro* ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες των ΣΣΚ (παράγραφος 1.2.12.), εξετάστηκαν στη συνέχεια σε μια ποικιλία ζωικών μοντέλων. Μια από τις πρώτες *in vivo* μελέτες κατέδειξε ότι η συστηματική χορήγηση αλλογενών ΣΣΚ, προερχομένων από το μυελό των οστών των μπαμπούνων, παρέτεινε την επιβίωση αλλογενετικού δερματικού μοσχεύματος σε 11 ημέρες έναντι 7 που είχε παρατηρηθεί στους μάρτυρες (*Bartholomew et al, 2002*). Παρομοίως, η έγχυση ΣΣΚ προέλευσης δότη παρέτεινε την επιβίωση καρδιακού μοσχεύματος στα ποντίκια (*Casiraghi et al, 2008*).

Η πληθώρα των ευρημάτων που υποστήριζαν τη μείωση της αλλοαντιδραστικότητας μετά την έγχυση καλλιεργημένων ΣΣΚ, ώθησε τους επιστήμονες στη χρησιμοποίησή τους για την αντιμετώπιση της νόσου από την αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (Graft Versus Host Disease, GVHD). Η GVHD αποτελεί τη σημαντικότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας μετά από αλλογενή μεταμόσχευση ΑΣΚ. Διακρίνεται στο οξύ (*acute-aGVHD*) και χρόνιο (*chronic-cGVHD*). Το *aGVHD* εμφανίζεται 2 εβδομάδες έως 2 μήνες μετά τη μεταμόσχευση και προσβάλλει κυρίως το δέρμα, το ήπαρ, το γαστρεντερικό σωλήνα και το λεμφικό ιστό. Ο διάμεσος χρόνος εμφάνισης του *cGVHD* είναι 6 μήνες μετά τη μεταμόσχευση, ενώ, η κλινική του εικόνα μοιάζει με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα και νόσους του δέρματος. Υπεύθυνα για τη δημιουργία του GVHD θεωρούνται τα T-λεμφοκύτταρα του μοσχεύματος, τα οποία πολλαπλασιάζονται μετά την ενεργοποίησή τους από τα αντιγόνα class I και II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας, καθώς επίσης και αντιγονικά πεπτίδια του ελάσσονος συστήματος του ασθενούς.

Η πρώτη περίπτωση ανθεκτικού στη συμβατική θεραπεία *aGVHD*, που αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με καλλιεργημένα ΣΣΚ, αφορούσε ένα αγόρι 9 χρονών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ), που είχε υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση ΑΣΚ, από συμβατό μη συγγενή δότη μετά την τρίτη ύφεση. Ο ασθενής ανέπτυξε *aGVHD* στο ήπαρ και στο έντερο, το οποίο εξαφανίστηκε μετά τη χορήγηση ΣΣΚ, που προέρχονταν από το μυελό των οστών της απλοταυτόσημης μητέρας του (*Le Blanc et al, 2004*). Η παρατήρηση αυτή υποστηρίχθηκε από μια πολυκεντρική, μη τυχαιοποιημένη, φάσης II μελέτη, που αφορούσε την έγχυση ΣΣΚ

σε 55 ασθενείς με ανθεκτικό GVHD. Τα ΣΣΚ προέρχονταν, είτε από τους δότες των ΑΣΚ, HLA-συμβατούς αδελφούς ή απλοταυτούσημους δότες, είτε από τρίτους, HLA-μη συμβατούς δότες. 30 ασθενείς παρουσίασαν πλήρη ανταπόκριση και εννέα βελτίωση, δείχνοντας ότι, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους τα ΣΣΚ μπορεί να αποδειχτούν αποτελεσματική θεραπεία για ασθενείς που πάσχουν από ανθεκτικό GVHD (*Le Blanc et al, 2008*).

Επιπροσθέτως, σε εξέλιξη βρίσκεται μια τυχαιοποιημένη, πολυκεντρική, φάσης ΙΙΙ μελέτη, που αφορά τη χορήγηση ΣΣΚ τρίτου ατόμου σε 163 ασθενείς και placebo σε 81, για την αντιμετώπιση του aGVHD. Τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν να υπάρχει στατιστική υπεροχή των ΣΣΚ έναντι του placebo, στους ασθενείς που παρουσίαζαν GVHD στο ήπαρ και στο έντερο (*Martin, 2010*).

Συνοπτικά, από τις λίγες δημοσιευμένες μελέτες μέχρι σήμερα, που περιλαμβάνουν περιορισμένο αριθμό ασθενών, προκύπτει ότι, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών ανταποκρίνονται στη θεραπεία με ΣΣΚ, με καλύτερους απαντητές τα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες και σημαντικότερη βελτίωση στο ήπαρ και στο έντερο, σε σχέση με το δέρμα (*Wernicke et al, 2011*).

Αν και από τα έως τώρα δεδομένα, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, φαίνεται όμως, ότι τα πρώτα αποτελέσματα δικαιολογούν την περαιτέρω διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των ΣΣΚ, στην πρόληψη και θεραπεία της GVHD, με τυχαιοποιημένες και πολυκεντρικές κλινικές μελέτες. Η δημιουργία ενός κοινού πρωτοκόλλου, όσον αφορά στην πηγή των ΣΣΚ, την ηλικία των δοτών, τις μεθόδους απομόνωσης και καλλιέργειάς τους, τον αριθμό των περασμάτων στην καλλιέργεια κ.λ.κ., είναι απαραίτητη, προκειμένου να εξασφαλιστεί η κατά το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιογένειά τους, ώστε και τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών να είναι συγκρίσιμα.

1.3.3. ΣΣΚ και Αναγεννητική Ιατρική

Η εύκολη απομόνωση των ΣΣΚ από το μυελό των οστών και κυρίως η δυνατότητα εξωσωματικού πολλαπλασιασμού τους, σε συνδυασμό με την εγγενή τους ικανότητα να προσελκύονται στις πάσχουσες περιοχές, άνοιξαν νέους ελπιδοφόρους ορίζοντες στον τομέα της κυτταρικής θεραπείας νοσημάτων που συνδέονται με κυτταρική απώλεια και αδυναμία φυσιολογικής αναπλήρωσής της.

Η εξ' ορισμού, *in vitro* δυνατότητα διαφοροποίησής τους σε κύτταρα μεσεγχειματικής προέλευσης, οστεοβλάστες και χονδροβλάστες, οδήγησε πολύ

γρήγορα στην πραγματοποίηση προκλινικών μελετών σε ποικίλα ζωικά μοντέλα, τα αποτελέσματα των οποίων έπεισαν για τη μεταφορά τους στον άνθρωπο. Έτσι, από το 2001, χρησιμοποιήθηκαν εξωσωματικά εκπτυγμένα ΣΣΚ για την αντιμετώπιση προβλημάτων του μυοσκελετικού συστήματος. Μεγάλα οστικά ελλείμματα, ψευδοαρθρώσεις και περιοχές οστικής νέκρωσης, παρουσίασαν βελτίωση έως και αποκατάσταση, σε γρήγορο χρονικό διάστημα και χωρίς επιπλοκές, μετά τη χορήγηση αυτόλογων ΣΣΚ, ενώ, σε ασθενείς με ατελή οστεογένεση, οι εγχύσεις ΣΣΚ που προέρχονταν από το δότη, ενίσχυσαν το αποτέλεσμα της αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών που είχε προηγηθεί, ως θεραπεία επιλογής. Ενθαρρυντικά, αν και λιγότερο εντυπωσιακά, είναι τα δεδομένα που αφορούν την επιδιόρθωση ελλειμμάτων του χόνδρου και οπωσδήποτε, η διεξαγωγή μελετών που θα συγκρίνουν τα αποτελέσματα αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης με εκείνα των άλλων χειρουργικών μεθόδων, είναι απαραίτητη (Shenaq et al, 2010).

Πέραν του μυοσκελετικού συστήματος, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εγχειρήματα ερευνητών να αποκαταστήσουν τη μυοκαρδιακή νέκρωση μετά από έμφραγμα, με ενδοφλέβια ή ενδοστεφανιαία χορήγηση αυτόλογων ή αλλογενών, καλλιεργημένων ΣΣΚ. Ο Hare και οι συνεργάτες του, υποστήριξαν τη συνολική βελτίωση της υγείας των ασθενών που έλαβαν ΣΣΚ, καθώς και αύξηση του όγκου εξώθησης της αριστερής κοιλίας σε σχέση με τους μάρτυρες, 1 χρόνο μετά τη θεραπεία (Hare et al, 2009). Όμως, προηγηθείσα μελέτη δεν είχε καταδείξει ανάλογα αποτελέσματα (Meyer et al, 2006). Η ετερογένεια στον τρόπο και στο χρόνο χορήγησης μετά το έμφραγμα, αλλά και στον αριθμό των χορηγουμένων κυττάρων, δεν επιτρέπει τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπευτικής στρατηγικής. Επιπλέον, ιδιαίτερης προσοχής χρήζουν οι παρενέργειες που παρατηρήθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις όπως, η δημιουργία αρρυθμογενών εστιών, με αποτέλεσμα πολλοί ασθενείς να καταλήξουν εξαιτίας ανθεκτικών αρρυθμιών, αλλά ακόμα, και ο σχηματισμός οστού που παρουσιάστηκε στην καρδιά ζωικών μοντέλων (Breitbach et al, 2007).

Ένας άλλος ιστός, με αδυναμία αυτοανανέωσης, που αποτελεί στόχο της κυτταρικής θεραπείας είναι ο νευρικός. Οι περισσότερες μελέτες φάσης I, αφορούν ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας, και έχουν καταδείξει ότι η ενδορραχιαία ή ενδοφλέβια έγχυση αυτόλογων ΣΣΚ, μπορεί να πραγματοποιηθεί με ασφάλεια και οδηγεί στην αύξηση της αναλογίας των $CD4^+$ $CD25^+$ ρυθμιστικών T-κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών (Mohyeddin et al, 2007). Παρομοίως, η έγχυση

αυτόλογων ΣΣΚ σε ασθενείς με αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση ήταν καλά ανεκτή (Karussis *et al*, 2010). Σε άλλες πιλοτικές μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο ή βλάβες του νωτιαίου μυελού, η έγχυση αυτόλογων ΣΣΚ φαίνεται να επιφέρει λειτουργική βελτίωση των κατεστραμμένων κυττάρων (Lee *et al*, 2010; Pal *et al*, 2009). Τέλος, ασφαλής ήταν και η χορήγηση αλλογενών ΣΣΚ σε ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Hurler ή μεταχρωματική λευκοδυστροφία. Στις περιπτώσεις αυτές, αν και δε σημειώθηκε ουσιαστική βελτίωση της υγείας των ασθενών, παρατηρήθηκε όμως βελτίωση στην ταχύτητα αγωγιμότητας των νεύρων (Koc *et al*, 2002).

Ένας άλλος τομέας που φαίνεται να βρίσκουν εφαρμογή οι αναγεννητικές ιδιότητες των ΣΣΚ, είναι η θεραπεία νόσων του ήπατος. Σε μελέτες με πειραματόζωα βρέθηκε ότι οι παράγοντες που εκκρίνονται από τα ΣΣΚ, είναι αποτελεσματικοί στο να αναστρέψουν την οξεία ηπατική ανεπάρκεια (van Poll *et al*, 2008), και μικρές κλινικές μελέτες φάσης I-II αναφέρουν ότι η έγχυση αυτόλογων ΣΣΚ, σε περιστατικά με τελικού σταδίου ηπατικές κίρρωσεις, βελτιώνει σημαντικά την κλινική κατάσταση των ασθενών (Kharaziha *et al*, 2009).

Η χρησιμοποίηση των ΣΣΚ φαίνεται να κατέχει ρόλο και στην αντιμετώπιση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου. Σε κλινικές μελέτες φάσης I/II έχειδειχτεί ότι η έγχυση αυτόλογων ΣΣΚ σε ασθενείς με νόσο του Crohn είναι εφικτή και ασφαλής. Επιπλέον, ασκεί αποτελεσματική αντιφλεγμονώδη δράση και προωθεί τη λειτουργική αποκατάσταση των κυττάρων του βλεννογόνου, σε ορισμένες περιπτώσεις που η συμβατική θεραπεία δεν είχε επιφέρει κλινική βελτίωση (Duijvenstein *et al*, 2010; Ciccocioppo *et al*, 2011).

Τέλος, τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από πειράματα σε ζωικά μοντέλα έχουν οδηγήσει στο σχεδιασμό πρωτοκόλλων για κλινικές μελέτες που αφορούν αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I, η συστηματική σκλήρυνση, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η οξεία νεφρική βλάβη, νοσήματα του πνεύμονα καθώς και νοσήματα του γαστρεντερικού συστήματος (Bernardo *et al*, 2011).

Όμως, θα πρέπει να επισημανθεί και πάλι, ότι παρά τις όποιες θετικές ενδείξεις έχουν υπάρξει μέχρι σήμερα για τη χρησιμότητα των ΣΣΚ, η διεξαγωγή καλά σχεδιασμένων, πολυκεντρικών και τυχαιοποιημένων μελετών είναι απαραίτητη, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος που μπορεί να έχουν σε σχέση και με τις συμβατικές θεραπείες στην αντιμετώπιση των διαφόρων νοσημάτων.

1.4. Σκοπός

Αφορμή για την παρούσα μελέτη ήταν πρωτίστως η επιθυμία μας για εξοικείωση με το κυτταρικό αυτό σύστημα του ΜΟ – το σύστημα των κυττάρων του στρώματος- που πολύ πρόσφατα είχε προσελκύσει το ενδιαφέρον του επιστημονικού κόσμου και φαινόταν να υπόσχεται πολλά όσον αφορά στην αντιμετώπιση ποικίλων κλινικών καταστάσεων αιματολογικών και μη. **Πρωταρχικό λοιπόν στόχο μας αποτέλεσε η ανάγκη να αποκτήσουμε τη τεχνογνωσία αυτή που είναι απαραίτητη προκειμένου να είμαστε σε θέση να απομονώνουμε από το ΜΟ και να καλλιεργούμε στο εργαστήριο ΣΣΚ ώστε να λαμβάνουμε τελικά έναν αριθμό από αυτά επαρκή για κλινική χρήση.** Οι δυνητικές κλινικές εφαρμογές στις οποίες θα θέλαμε να ανταποκριθούμε ήταν δύο: α) η αντιμετώπιση της GVHD, μια σοβαρότατη επιπλοκή που παρουσιάζουν πολλοί ασθενείς που υποβάλλονται σε αλλογενή μεταμόσχευση ΜΟ και β) η αντιμετώπιση ασθενών με χρόνια και μη αναστρέψιμη ισχαιμική καρδιομυοπάθεια.

1.5. Σχεδιασμός Μελέτης

Όσον αφορά στην αντιμετώπιση της GVHD οι κλινικές μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί αφορούσαν στην έγχυση καλλιεργημένων ΣΣΚ σε ασθενείς με ανθεκτική στη συμβατική θεραπεία νόσο. Όμως, καλλιεργημένα ΣΣΚ, επιμολυσμένα ακόμα και με χαμηλό ποσοστό $CD45^+$ κυττάρων ή καλλιεργημένα ΣΣΚ πολλών περασμάτων δεν είχαν δείξει σημαντική αντί-GVHD δράση (*Polchert et al, 2008*). **Υπήρχε επομένως η ανάγκη για ένα σύστημα καλλιέργειας που θα εξασφάλιζε α) επαρκή αριθμό ΣΣΚ για κλινική χρήση β) ο χρόνος παραμονής τους στην καλλιέργεια να μην ξεπερνούσε τις 3 εβδομάδες, χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί σε 3-5 περάσματα και γ) απόλυτη καθαρότητα των παραγομένων ΣΣΚ, απαλλαγμένων τελείως από την παρουσία αιμοποιητικών κυττάρων.**

Από την έως τότε εμπειρία μας γνωρίζαμε ότι σε ένα σύστημα καλλιέργειας σαν αυτό που περιέγραψε ο Friedenstein (παράγρ. 1.2.1.), στο οποίο το σύνολο των μονοπυρήνων κυττάρων του ΜΟ τοποθετούνται στο κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό, τα ΣΣΚ αναπτύσσονται ικανοποιητικά, δύσκολα όμως απαλλάσσονται τελείως από τα αιμοποιητικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό αποφασίσαμε να μελετήσουμε *in vitro* δύο πληθυσμούς, τα $CD105^+$ και τα $CD271^+$ κύτταρα (Πίν. 1.2.4 και 1.2.5.), που ήταν γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι είναι εμπλουτισμένοι σε ΣΣΚ, και υπήρχε εμπορικά διαθέσιμο σύστημα για την απομόνωσή τους προκειμένου να διαπιστώσουμε ποιος ήταν ο καταλληλότερος για κλινική χρήση.

Για τους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια τα λιγοστά ως τότε βιβλιογραφικά δεδομένα ήταν πολύ ετερογενή. Μερικοί ερευνητές είχαν χρησιμοποιήσει ολικό μυελό ή το κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων (Strauer *et al*, 2002; Assmus *et al*, 2002; Wollert *et al*, 2004), ενώ άλλοι επέλεξαν κεκαθαρμένους πληθυσμούς είτε, ανοσοεπιλεγμένων αυτόλογων ΑΣΚ (CD34⁺, CD133⁺) (Kocher *et al*, 2001; Kawamoto *et al*, 2006; Agbulut *et al*, 2004; Ma *et al*, 2006) είτε, εξωσωματικά εκπτυγμένων ΣΣΚ αυτόλογων ή αλλογενών Psaltis *et al*, 2008), προτείνοντας ταυτόχρονα διάφορους πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων επιτυγχανόταν η όποια ανάκτηση της καρδιακής λειτουργίας. Ωστόσο, επειδή η τοπική έγχυση στους ασθενείς, του ολικού μυελού ή ακόμα και του συνόλου των μονοπυρήνων κυττάρων, ενέχει κινδύνους λόγω αυξημένου όγκου και κυτταρικότητας, **στόχο μας αποτέλεσε ο εντοπισμός ενός κατά το δυνατόν κεκαθαρμένου και ομοιογενούς πληθυσμού που να εμπεριέχει τα περισσότερα ΣΚ του ΜΟ, ενώ ταυτόχρονα η χορήγησή του να μπορεί να πραγματοποιηθεί με ασφάλεια.** Έτσι το ερώτημα αρχικά εντοπίστηκε στο εξής: ΑΣΚ ή ΣΣΚ?

Από τη βιβλιογραφία αλλά και από προηγούμενες δικές μας μελέτες (Goussetis *et al*, 2000; Goussetis *et al*, 2003), γνωρίζαμε ότι ο πληθυσμός των CD133⁺ κυττάρων αποτελεί πηγή προγονικών αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων κατέχοντας υψηλή θέση στην ιεραρχία των ΣΚ του ΜΟ. Επιπροσθέτως, είχε αρχίσει να διαφαίνεται ότι πιθανόν να χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτο βαθμό πλαστικότητας αφού έδινε γένεση και σε κυτταρικούς τύπους διαφορετικής εμβρυικής προέλευσης (Handgretinger *et al*, 2003; Kuci *et al*, 2003). Θεωρήσαμε λοιπόν σκόπιμο να ελέγξουμε το ενδεχόμενο να εμπεριέχει και ΣΣΚ αφού κάτι τέτοιο θα τον καθιστούσε τον καταλληλότερο για τη διάσωση των εμφραγματικών περιοχών. Η εξέλιξη των πειραμάτων μας οδήγησε και στη διερεύνηση των CD34⁺ κυττάρων, αφού υπήρξαν ενδείξεις ότι και αυτός ο πληθυσμός αποτελεί πηγή ΣΣΚ παρά το ότι τα μέχρι τότε βιβλιογραφικά δεδομένα υποστήριζαν το αντίθετο (Huss, 2000).

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η συλλογή του μυελού των οστών για *in vitro* χρήση πραγματοποιήθηκε από την περιοχή της οπίσθιας λαγόνιας ακρολοφίας φυσιολογικών δοτών, υπό ολική αναισθησία, κατά την έναρξη λήψης μοσχεύματος που προορίζονταν για αλλογενή μεταμόσχευση και μετά τη λήψη ενυπόγραφης συγκατάθεσης αυτών.

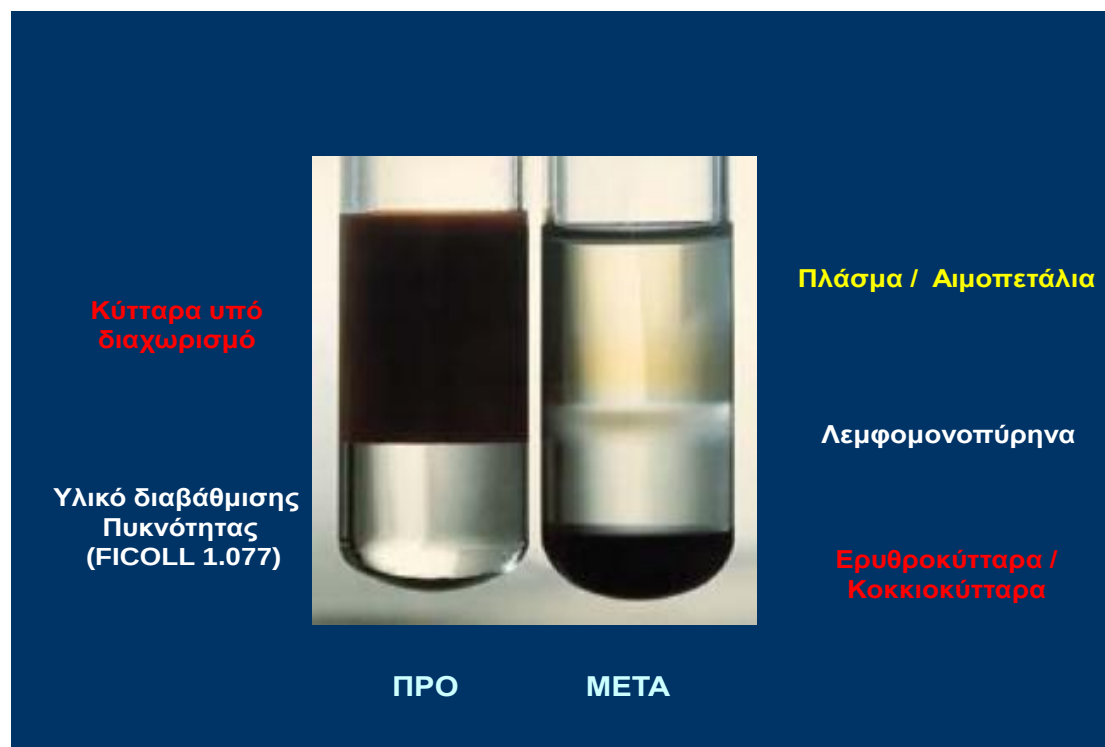
2.1. Απομόνωση των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών

Αντιδραστήρια- Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS; pH 7.2) (Gibco, BRL).
2. Hypaque-Ficoll (Lymphoprep d=1.077g/ml; Nycomed, Birmingham UK)

Πειραματική πορεία

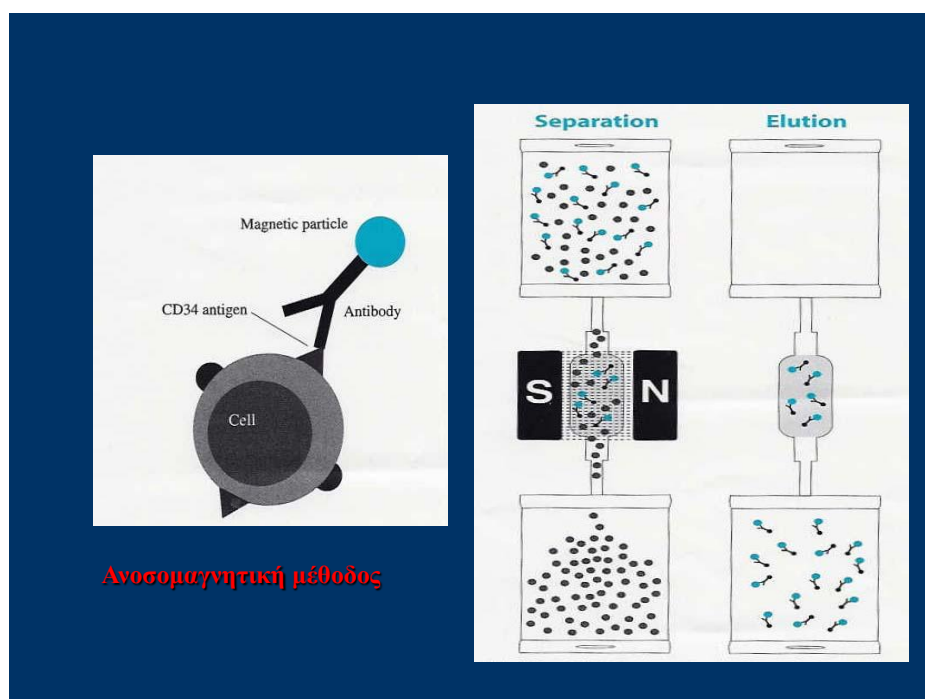
Ο μυελός συλλέγεται σε σωληνάρια που περιέχουν την κατάλληλη ποσότητα αντιπηκτικού. Στη συνέχεια αραιώνεται με διπλάσιο όγκο PBS και το εναιώρημα επιστοιβάζεται σε ίσο όγκο φυκόλης. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας του δείγματος (1500 rpm, 30 min) οπότε και διαχωρίζονται σε στοιβάδες τα ερυθροκύτταρα, τα λεμφομονοπύρηνια και το πλάσμα. Η στοιβάδα των λεμφομονοπύρηνων συλλέγεται σε ξεχωριστό σωληνάριο φυγοκέντρου και εκπλένεται δύο φορές με PBS (φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 10 min). Τέλος, αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων χρησιμοποιείται αμέσως.



Εικ. 2.1. Απομόνωση λεμφομονοπυρήνων κυττάρων

2.2. Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός

Η απομόνωση των επιμέρους πληθυσμών CD34⁺, CD133⁺, CD105⁺ και CD271⁺ κυττάρων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας την ανοσομαγνητική μέθοδο. Η μέθοδος αυτή αξιοποιεί την έκφραση συγκεκριμένου κάθε φορά αντιγόνου στην επιφάνεια των κυττάρων και τη δυνατότητα δημιουργίας δεσμού αντιγόνου-αντισώματος. Ο εκάστοτε επιθυμητός πληθυσμός απομονώνεται με τη χρήση παραμαγνητικών μικροσφαιριδίων συνδεδεμένων με το αντίστοιχο μονοκλωνικό αντίσωμα. Τα κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο κατακρατούνται από στήλη που έχει προσαρμοσθεί σε μαγνήτη ενώ τα υπόλοιπα διέρχονται από αυτή. Η συλλογή των επιλεγμένων κυττάρων επιτυγχάνεται με την απομάκρυνση της στήλης από το μαγνητικό πεδίο (Εικόνα 2.2.).



Εικ. 2.2. Αρχή της ανοσομαγνητικής μεθόδου

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία των MACS (magnetic activated cell sorting). Το σύστημα αυτό διαχωρισμού περιλαμβάνει βιοδιασπώμενα παραμαγνητικά σφαιρίδια πολύ μικρού μεγέθους - διάμετρος 50nm – όσο περίπου το μέγεθος μακρομορίων όπως οι γλυκοπρωτεΐνες. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών δεν επηρεάζονται οι ιδιότητες των κυττάρων π.χ. εξαιτίας στερεοχημικής παρεμπόδισης και δεν χρειάζεται να αποκολληθούν από τα κύτταρα, προκειμένου

αυτά να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής, να καλλιεργηθούν ή ακόμα και να χορηγηθούν σε ασθενή. Η όλη διαδικασία εξασφαλίζει μεγάλη καθαρότητα (>90%) και υψηλή απόδοση (~75%) των διαχωρισθέντων πληθυσμών. Το είδος της στήλης και του μαγνητικού διαχωριστή που κάθε φορά χρησιμοποιούνται εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων που είναι διαθέσιμος (Πίνακας 2.2.)

Πίνακας 2.2.

MACS Διαχωριστής	Στήλη	Μέγιστος αριθμός επισημασμένων κυττάρων	Μέγιστος αριθμός εμπυρήνων κυττάρων
Mini MACS	MS	10^7	20×10^7
MidiMACS	LS	10^8	20×10^8
CliniMACS	Normal Tubing Set	6×10^8	6×10^{10}

2.2.1. Επιλογή των CD34⁺ κυττάρων

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. Μαγνητικός διαχωριστής MiniMACS ή MidiMACS (Miltenyi Biotec).
2. Στήλες θετικής επιλογής MS ή LS (Miltenyi Biotec).
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7.2 (Gibco, BRL), εμπλουτισμένο με 0.5% αλβουμίνη ανθρωπίνου ορού και 0.6% ACD-A.
4. CD34 isolation kit (Miltenyi Biotec), το οποίο περιλαμβάνει:
 - α) CD34 microbeads
 - β) FcR Blocking Reagent

Πειραματική πορεία

1. Απομόνωση των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων από το μυελό των οστών με φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.
2. Προσδιορισμός του αριθμού αυτών με τη βοήθεια αιματολογικού αναλυτή.
3. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1500rpm για 10min και επανααιώριση του ιζήματος σε 300μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10^8 κύτταρα.
4. Προσθήκη 100μl FcR Blocking Reagent και 100μl CD34 MicroBeads ανά 10^8 κύτταρα.
5. Ανακίνηση και επώαση για 30min στους 4-8 °C .
6. Προσθήκη 10-20πλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος, από το συνολικό όγκο επώασης, και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 10min.
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επανααιώριση του ιζήματος των κυττάρων σε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10^8 κύτταρα.
8. Τοποθέτηση της κατάλληλης στήλης στο μαγνήτη ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που είναι διαθέσιμος.
9. Έκπλυση της στήλης με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη LS.
10. Τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη.
11. Έκπλυση της στήλης εις τριπλούν με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη LS.
12. Απομάκρυνση της στήλης από το μαγνήτη και τοποθέτησή της σε κατάλληλο σωληνάριο φυγοκέντρου.
13. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη MS ή 5ml ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη LS.
14. Έκλυση των $CD34^+$ κυττάρων με τη βοήθεια εμβόλου.
15. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1500rpm για 10min και επανάληψη των σταδίων 7-14 χρησιμοποιώντας δεύτερη στήλη, για μεγαλύτερη καθαρότητα του επιλεγμένου πληθυσμού.

2.2.2. Επιλογή των $CD133^+$ κυττάρων

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. Μαγνητικός διαχωριστής MiniMACS ή MidiMACS (Miltenyi Biotec).
2. Στήλες θετικής επιλογής MS ή LS (Miltenyi Biotec).

3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7.2 (Gibco, BRL),
εμπλουτισμένο με 0.5% αλβουμίνη ανθρώπινου ορού και 0.6% ACD-A.
4. CD133 isolation kit (Miltenyi Biotec), το οποίο περιλαμβάνει:
 - α) CD133 microbeads
 - β) FcR Blocking Reagent

Πειραματική πορεία

1. Απομόνωση των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων από το μυελό των οστών με φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.
2. Προσδιορισμός του αριθμού αυτών με τη βοήθεια αιματολογικού αναλυτή.
3. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1500rpm για 10min και επανααιώριση του ιζήματος σε 300μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10^8 κύτταρα.
4. Προσθήκη 100μl FcR Blocking Reagent και 100μl CD133 MicroBeads ανά 10^8 κύτταρα.
5. Ανακίνηση και επώαση για 30min στους 4-8 °C .
6. Προσθήκη 10-20πλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος, από το συνολικό όγκο επώασης, και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 10min.
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επανααιώριση του ιζήματος των κυττάρων σε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10^8 κύτταρα.
8. Τοποθέτηση της κατάλληλης στήλης στο μαγνήτη ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που είναι διαθέσιμος.
9. Έκπλυση της στήλης με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
10. Τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη.
11. Έκπλυση της στήλης εις τριπλούν με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
12. Απομάκρυνση της στήλης από το μαγνήτη και τοποθέτησή της σε κατάλληλο σωληνάριο φυγοκέντρου.
13. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη MS ή 5ml ρυθμιστικού διαλύματος εάν πρόκειται για στήλη LS.
14. Έκλυση των CD133⁺ κυττάρων με τη βοήθεια εμβόλου.

15. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1500rpm για 10min και επανάληψη των σταδίων 7-14 χρησιμοποιώντας δεύτερη στήλη, για μεγαλύτερη καθαρότητα του επιλεγμένου πληθυσμού.

2.2.3. Επιλογή των CD105⁺ κυττάρων

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. Μαγνητικός διαχωριστής MiniMACS ή MidiMACS (Miltenyi Biotec).
2. Στήλες θετικής επιλογής MS ή LS (Miltenyi Biotec).
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7.2 (Gibco, BRL), εμπλουτισμένο με 0.5% αλβουμίνη ανθρώπινου ορού και 0.6% ACD-A.
4. CD105 Microbeads (Miltenyi Biotec).

Πειραματική πορεία

1. Απομόνωση των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων από το μυελό των οστών με φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.
2. Προσδιορισμός του αριθμού αυτών με τη βοήθεια αιματολογικού αναλυτή.
3. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1500rpm για 10min και επανααιώριση του ιζήματος σε 80μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10⁷ κύτταρα.
4. Προσθήκη 20μl CD105 Microbeads ανά 10⁷ κύτταρα.
5. Ανακίνηση και επώαση για 15min στους 6-12 °C .
6. Προσθήκη 10-20πλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος, από το συνολικό όγκο επώασης, και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 10min.
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επανααιώριση του ιζήματος των κυττάρων σε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10⁸ κύτταρα.
8. Τοποθέτηση της κατάλληλης στήλης στο μαγνήτη ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που είναι διαθέσιμος.
9. Έκπλυση της στήλης με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
10. Τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη.
11. Έκπλυση της στήλης εις τριπλούν με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
12. Απομάκρυνση της στήλης από το μαγνήτη και τοποθέτησή της σε κατάλληλο σωληνάριο φυγοκέντρου.

13. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή 5ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
14. Έκλουση των CD105⁺ κυττάρων με τη βοήθεια εμβόλου.
15. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1500rpm για 10min και επανάληψη των σταδίων 7-14 χρησιμοποιώντας δεύτερη στήλη, για μεγαλύτερη καθαρότητα του επιλεγμένου πληθυσμού.

2.2.4. Επιλογή των CD271⁺ κυττάρων

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. Μαγνητικός διαχωριστής MiniMACS ή MidiMACS (Miltenyi Biotec).
2. Στήλες θετικής επιλογής MS ή LS (Miltenyi Biotec).
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7.2 (Gibco, BRL), εμπλουτισμένο με 0.5% αλβουμίνη ανθρώπινου ορού και 0.6% ACD-A.
4. CD271 isolation kit (Miltenyi Biotec), το οποίο περιλαμβάνει:
 - α) CD271 (LNGFR)-APC αντι-ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα
 - β) Αντι-APC Microbeads
 - γ) FcR Blocking Reagent

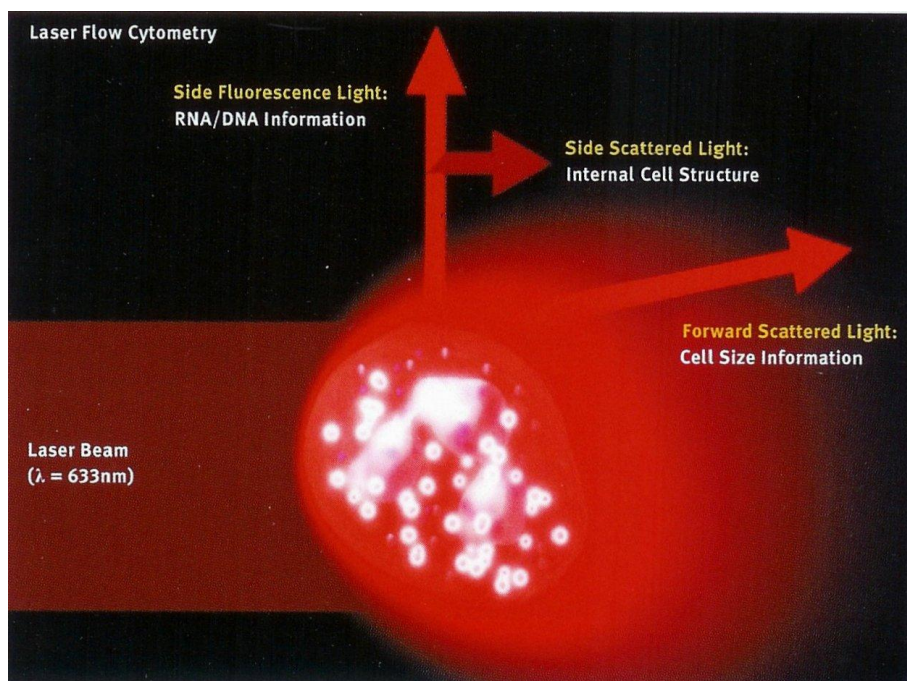
Πειραματική πορεία

1. Απομόνωση των λευκομονοπύρηνων κυττάρων από το μυελό των οστών με φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.
2. Προσδιορισμός του αριθμού αυτών με τη βοήθεια αιματολογικού αναλυτή.
3. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1500rpm για 10min και επανααιώριση του ιζήματος σε 80μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10⁷ κύτταρα.
4. Προσθήκη 10μl FcR Blocking Reagent και 10μl CD271 (LNGFR)-APC ανά 10⁷ κύτταρα.
5. Ανακίνηση και επώαση για 10min στους 2-8°C .
6. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10⁷ κύτταρα και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 10min.
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επανααιώριση του ιζήματος των κυττάρων σε 70μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10⁷ κύτταρα.
8. Προσθήκη 10μl FcR Blocking Reagent και 20μl Αντι-APC Microbeads.
9. Ανακίνηση και επώαση για 15min στους 2-8°C .

10. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10^7 κύτταρα και φυγοκέντρωση στις 1500rpm για 10min.
11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επανααιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος ανά 10^7 κύτταρα.
12. Τοποθέτηση της κατάλληλης στήλης στο μαγνήτη ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που είναι διαθέσιμος.
13. Έκπλυση της στήλης με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
14. Τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη.
15. Έκπλυση της στήλης εις τριπλούν με 500μl ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή με 3ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
16. Απομάκρυνση της στήλης από το μαγνήτη και τοποθέτησή της σε κατάλληλο σωληνάριο φυγοκέντρου.
17. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη MS ή 5ml ρυθμιστικού διαλύματος, εάν πρόκειται για στήλη LS.
18. Έκλυση των $CD271^+$ κυττάρων με τη βοήθεια εμβόλου.
19. Φυγοκέντρωση του δείγματος στις 1500rpm για 10min και επανάληψη των σταδίων 7-18 χρησιμοποιώντας δεύτερη στήλη, για μεγαλύτερη καθαρότητα του επιλεγμένου πληθυσμού.

2.3. Κυτταρομετρία ροής

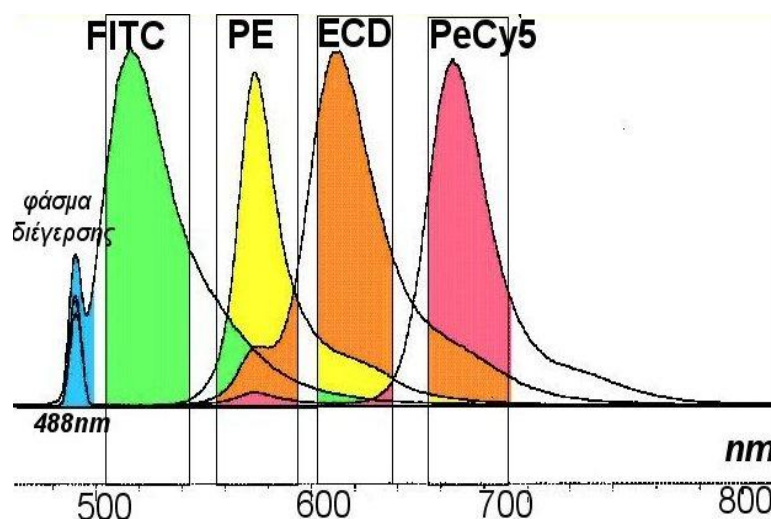
Η κυτταρομετρία ροής εκμεταλλεύεται δύο διαφορετικά φυσικά φαινόμενα που παρατηρούνται όταν μία δέσμη φωτός πέσει πάνω στα κύτταρα. Το πρώτο φαινόμενο λέγεται σκεδασμός (scatter) και οφείλεται στη διασπορά των φωτονίων σε όλες τις κατευθύνσεις του χώρου. Τα φωτόνια που σκεδάζονται έχουν το ίδιο μήκος κύματος με αυτά που προσπίπτουν πάνω στα κύτταρα, αλλά η έντασή τους διαφέρει και εξαρτάται από τη γωνία σκέδασης. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι δυνατόν να μετρηθεί με ειδικούς ανιχνευτές που λέγονται φωτοδιόδοι ή φωτοπολλαπλασιαστές. Όταν το σήμα σκεδασμού ανιχνεύεται σε πολύ μικρή γωνία ονομάζεται πρόσθιος σκεδασμός (forward scatter, FW-SC, FSC) ενώ, όταν ανιχνεύεται σε γωνία 90° λέγεται ορθογώνιος ή πλάγιος σκεδασμός (right scatter, side scatter, RT-SC, SSC). Ο πρόσθιος σκεδασμός είναι συνάρτηση του μεγέθους του κυττάρου και ο κάθετος της σύστασης του κυτταροπλάσματος (Εικόνα 2.3.Α.).



Εικόνα 2.3.Α. Η κυτταρομετρία ροής στηρίζεται στη μέτρηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός σε μικρή (forward scatter) και μεγάλη γωνία (side scatter), καθώς, και στη μέτρηση του φθορισμού χρωστικών που έχουν κοινό φάσμα διέγερσης αλλά, διαφορετικά φάσματα εκπομπής.

Το δεύτερο φαινόμενο λέγεται φθορισμός (fluorescence) και απαιτεί τη σύνδεση στην επιφάνεια ή το εσωτερικό του κυττάρου κάποιας φθορίζουσας χρωστικής, σε αντίθεση με το σκεδασμό που εξαρτάται μόνο από τα φυσικά

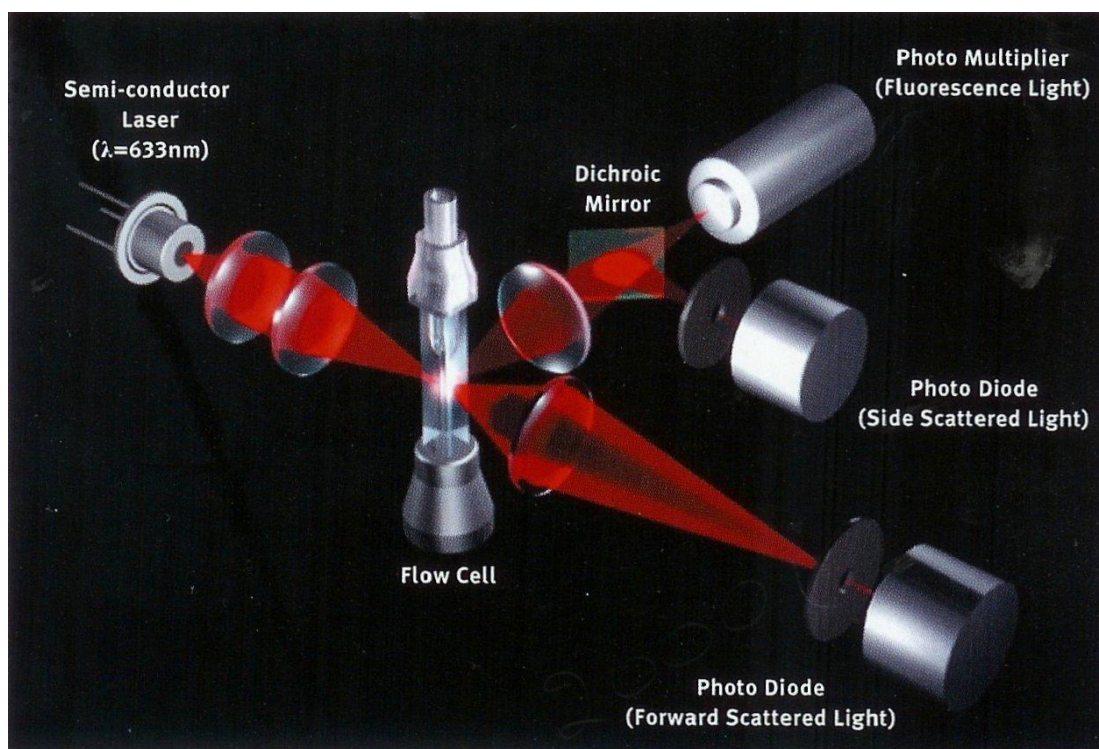
χαρακτηριστικά των κυττάρων (μέγεθος, σύσταση). Ο φθορισμός αποτελεί χαρακτηριστικό ειδικών χημικών ενώσεων που λέγονται φθορίζουσες χρωστικές (fluorescent probes), οι οποίες, όταν διεγείρονται από φωτεινή δέσμη συγκεκριμένου μήκους κύματος, εκπέμπουν φωτόνια μεγαλύτερου μήκους κύματος και χαμηλότερης ενέργειας. Τέσσερις διαφορετικές χρωστικές μπορεί να διεγερθούν από μία και μόνο δέσμη φωτός (δηλαδή, μπορεί να έχουν κοινό φάσμα διέγερσης), ενώ, την ίδια στιγμή κάθε μία από αυτές εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος (δηλαδή, έχουν τέσσερα διαφορετικά φάσματα εκπομπής). Για παράδειγμα, οι χρωστικές φλουορεσκεΐνη (FITC), φυκοερυθρίνη (PE), ερυθρό του Τέξας (ECD) και φυκοερυθρίνη-κυκλίνη 5 (PeCy5), μπορεί να διεγερθούν όλες από μια φωτεινή πηγή laser Αργού μήκους κύματος 488nm (Εικόνα 2.3.B.). Τα φάσματα εκπομπής τους όμως διαφέρουν και είναι αντίστοιχα 525nm (πράσινο), 576nm (κίτρινο), 620nm (πορτοκαλί) και 670nm (κόκκινο). Επωάζοντας λοιπόν τα κύτταρα με τέσσερα διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα, που είναι συνδεδεμένα με τέσσερις διαφορετικές χρωστικές, είναι δυνατόν να αναλυθούν μέχρι και τέσσερα αντιγόνα συγχρόνως πάνω σε κάθε κυτταρικό πληθυσμό, αρκεί, τα φάσματα εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται να μη συμπίπτουν σε μεγάλη έκταση.



Εικόνα 2.3.B. Σχηματική απεικόνιση των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής τεσσάρων φθορίζουσών χρωστικών (FITC, PE, ECD και PeCy5), οι οποίες διεγείρονται από μια φωτεινή πηγή laser Αργού 488nm και εκπέμπουν σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Κατά τη λειτουργία ενός κυτταρομετρητή ροής (Εικόνα 2.3.Γ.) το υπό μελέτη δείγμα τοποθετείται σε μία κυψελίδα ροής (flow cell), η οποία εξασφαλίζει την

ευθύγραμμη και ομαλή ροή των κυττάρων, έτσι ώστε, αυτά να έλθουν σε επαφή με τη διεγείρουσα οπτική δέσμη, ένα-ένα και όχι όλα μαζί. Τα οπτικά μέρη του συστήματος (φωτοδίοδοι, φωτοπολλαπλασιαστές και διχρωικά κάτοπτρα) συλλέγουν και διαχωρίζουν τα φωτόνια διαφορετικού μήκους κύματος. Ένα ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει τα οπτικά σήματα σε ηλεκτρονικά, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή που διαθέτει το κατάλληλο λογισμικό (software).

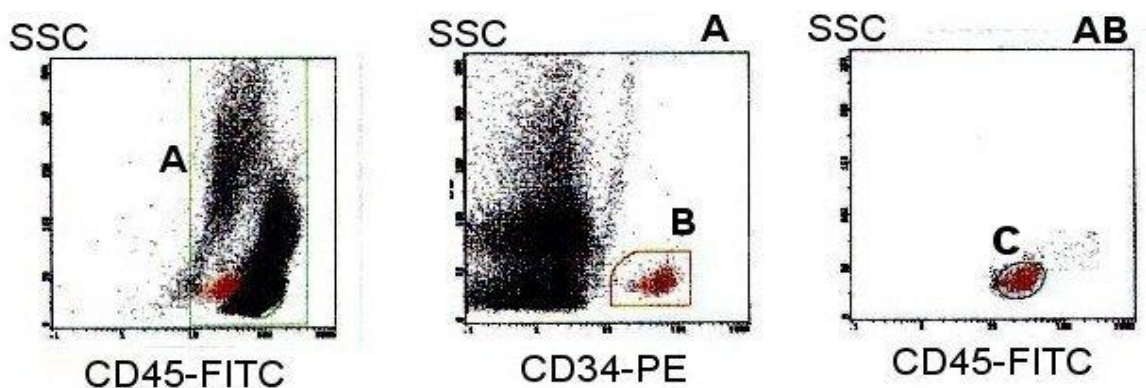


Εικόνα 2.3.Γ. Σχηματική απεικόνιση των οπτικών διατάξεων ενός κυτταρομετρητή ο οποίος διαθέτει φωτεινή πηγή $\lambda=633\text{nm}$. Ο πρόσθιος σκεδασμός μετριέται από μια φωτοδίοδο η οποία βρίσκεται στην ίδια ευθεία γραμμή με την ακτίνα laser, ενώ, ο ορθογώνιος σκεδασμός και οι φθορισμοί μετριοούνται σε γωνία 90° , αφού διαχωριστούν μεταξύ τους με τα κατάλληλα οπτικά μέσα (διχρωικά κάτοπτρα και φίλτρα).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή ιστογραμμάτων (histograms) ή στικτογραμμάτων (dot plots) και αναλύονται χρησιμοποιώντας μία «παραθυρική» στρατηγική (gating strategy). Στην εικόνα 2.3.Δ. φαίνεται ο τρόπος μέτρησης των CD34^+ κυττάρων, σε ένα δείγμα κυτταρικής συλλογής που προορίζεται για μεταμόσχευση.

Στο στικτόγραμμα CD45-FITC/SSC ορίζεται το παράθυρο Α το οποίο περικλείει τα λευκοκύτταρα (CD45^+) και τα μεταφέρει στο παρακείμενο στικτόγραμμα CD34-PE/SSC . Εκεί με το παράθυρο Β «περιφράζεται» το σύνολο των

CD34⁺ κυττάρων και μεταφέρεται στο τρίτο στικτόγραμμα CD45-FITC/SSC. Το παράθυρο C περικλείει τελικά τα σήματα τα οποία αξιολογούνται ως CD34⁺ κύτταρα.



Εικόνα 2.3.Α. Η «παραθυρική» στρατηγική A+B+C οδηγεί στην απομόνωση και μέτρηση των σημάτων των πραγματικών CD34⁺ κυττάρων που αντιπροσωπεύουν τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.

Αντιδραστήρια- Διαλύματα

1. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco, BRL).
2. Διάλυμα NH₄Cl 1X (Ortholyse, Ortho Diagnostics)
3. Διάλυμα φθοροσφαιριδίων (Stem-Count ή FLOW-Count)
4. Μονοκλωνικά αντισώματα (Πίνακας 2.3.)
5. Κυτταρομετρητής ροής Coulter Epics XL-MCL (Beckman)

Πειραματική πορεία*

1. Συλλογή του δείγματος μυελού ή του κυτταρικού εναιωρήματος. Στην περίπτωση του μυελού η συλλογή πραγματοποιείται σε φιαλίδια με EDTA.
2. Αραίωση του δείγματος με ισορροπημένο αλατούχο διάλυμα του Hank ή άλλο ανάλογο έτσι ώστε η συγκέντρωση των λευκών αιμοσφαιρίων να μη ξεπερνά τα 15x10⁶ κύτταρα / ml.
3. Τοποθέτηση 20μl του αντιδραστηρίου CD45-FITC / CD34-PE σε κατάλληλο σωληνάριο.
4. Τοποθέτηση 20μl του αντιδραστηρίου CD45-FITC / IsoClonic Control-PE σε άλλο σωληνάριο.
5. Προσθήκη 100μl του δείγματος στο ίδιο σωληνάριο.

6. Επώαση των σωληναρίων σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 20min, μακριά από εστίες φωτός.
7. Μετά την επώαση, προσθήκη 2ml διαλύματος NH₄Cl 1X και ανακίνηση με vortex για 5sec.
8. Επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από εστίες φωτός.
9. Προσθήκη 100μl φθοροσφαιριδίων Stem-Count ή FLOW-Count και στα δύο σωληνάρια.
10. Ανακίνηση με Vortex για 5sec.
11. Ανάλυση των δειγμάτων εντός μίας ώρας.

*Αναφέρεται ενδεικτικά η διαδικασία που ακολουθείται για τη μέτρηση των CD34⁺ κυττάρων. Ανάλογη είναι και στις περιπτώσεις των υπολοίπων πληθυσμών.

Πίνακας 2.3. Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (IgG1 Ποντικού)

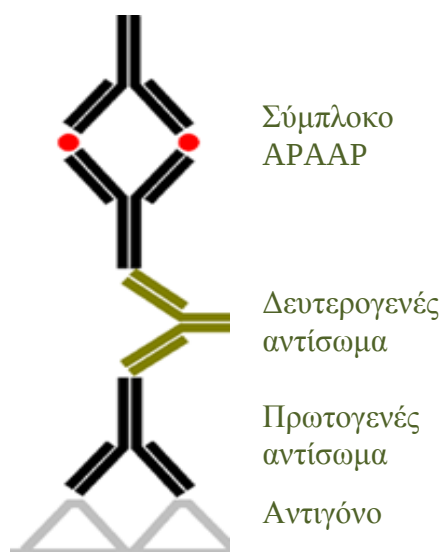
CD	Κλώνος	Φθοριόχρωμα	Πηγή
CD29	K20	FITC	Beckman
CD90		PE	
CD44	DF1485	FITC	DAKO
CD13	WM-47	PE	DAKO
CD105	SN6	FITC	Serotec
CD14	TUK4	PE	DAKO
CD19		FITC	
Class i-HLA		PE	
HLA-DR	AB3	FITC	DAKO
CD31	5.6E	PE	Beckman
CD45	J.33	FITC	Beckman
CD34	BIRMA-K3	PE	DAKO
Control	IsoClonic	FITC	DAKO
Control	IsoClonic	PE	DAKO

2.4. Ανοσοκυτταροχημεία

Οι ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές επιτρέπουν την ανίχνευση διαφόρων κυτταρικών συστατικών (ενζύμων, κυτταρικών υποδοχέων, τμημάτων του DNA και RNA, κ.λ.π.) με ανοσοαντιδράσεις. Βασική σημασία έχει η χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των ουσιών που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, οι οποίες παίζουν το ρόλο του αντιγόνου. Η αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος γίνεται εμφανής με την προσθήκη μιας ουσίας ικανής να παράγει χρώμα ή φθορισμό και να γίνεται έτσι ορατή στο μικροσκόπιο. Οι ουσίες αυτές καλούνται χρωμογόνα και αρχικά είναι άχρωμες. Για τη μετατροπή των άχρωμων χρωμογόνων σε έγχρωμα τελικά προϊόντα χρησιμοποιούνται ενζυμικά υποστρώματα. Όταν το ειδικό αντίσωμα συνδέεται απευθείας με το ένζυμο και το χρωμογόνο, τότε γίνεται λόγος για άμεση κυτταροχημική μέθοδο. Η ευαισθησία όμως της μεθόδου αυξάνεται με τη χρησιμοποίηση ενδιάμεσων αντισωμάτων. Τότε το ένζυμο συνδέεται με ένα δεύτερο ή και τρίτο αντίσωμα, οπότε γίνεται λόγος για έμμεση μέθοδο ή μέθοδο γέφυρας. Τα ενζυμικά συστήματα που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην έμμεση μέθοδο είναι:

- της υπεροξειδάσης / αντι-υπεροξειδάσης (PAP)
- της αλκαλικής φωσφατάσης / αντι-φωσφατάσης (APAAP)
- της βιοτίνης / στρεπταβιδίνης (BS)

Για τα επιχρίσματα περιφερικού αίματος, μυελού καθώς και των επιλεγμένων κυτταρικών πληθυσμών που προέρχονται από αυτά, η προτεινόμενη μέθοδος είναι η APAAP (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4. Στη μέθοδο APAAP το αντιγόνο συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα (mouse anti-human) και αυτό στη συνέχεια με ένα δεύτερο αντίσωμα (rabbit anti-mouse) που χρησιμεύει ως γέφυρα μεταξύ του πρώτου και του τρίτου αντισώματος. Το τελευταίο (mouse anti-phosphatase) αποτελεί μέρος ενός προσχηματισμένου συμπλόκου ενζυμικών μορίων (αλκαλικής φωσφατάσης) και αντισωμάτων

Αντιδραστήρια – Διαλύματα

1. Μονοκλωνικά αντισώματα

- α) Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4 (DakoCytomation, Denmark)
- β) Mouse Anti-Human CD31, Clone JC70A (DakoCytomation, Denmark)
- γ) Mouse Anti-Human vWF, CloneF8/86 (DakoCytomation, Denmark)
- δ) Mouse APAAP (DakoCytomation, Denmark)

2. Πολυκλωνικό αντίσωμα, Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin (DakoCytomation, Denmark)

3. Χρωμογόνο υπόστρωμα, Fast Red Substrate System (DakoCytomation, Denmark)

4. Naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich)

5. N,N-dimethylformamide (Sigma-Aldrich)

6. Tris Buffer Saline, pH 8,2 (Sigma-Aldrich)

7. Levamisole (Sigma-Aldrich)

8. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS, pH 7.2) (Gibco, BRL)

9. Triton-X-100 (Sigma-Aldrich)

10. Αλβουμίνη Βόειου Ορού (BSA), (Gibco, BRL)

11. Ακετόνη (Sigma-Aldrich)

12. Μεθανόλη (Sigma-Aldrich)

13. Φορμαλίνη (Sigma-Aldrich)

14. Hematoxyline Mayer's (Sigma-Aldrich)

Πειραματική πορεία

1. Μονιμοποίηση των ξηρανθέντων επιχρισμάτων με εμβάπτιση των πλακιδίων σε μίγμα ακετόνης / μεθανόλης / φορμαλίνης σε αναλογία 19/19/2 για 20sec.
2. Έκπλυση των μονιμοποιημένων κυττάρων με διάλυμα PBS.
3. Επώαση με διάλυμα PBT (PBS και 0,1% Triton-X-100) εμπλουτισμένο με 1% BSA για 1h. Έτσι επιτυγχάνεται η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης του αντισώματος.
4. Επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρωτογενούς μονοκλωνικού αντισώματος (mouse anti-human) σε αραιώση 1:1000 για 1h στους 4° C.

5. Έκπλυση εις τριπλούν με διάλυμα PBT για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος.
6. Επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος (rabbit anti-mouse) σε αραίωση 1:250 για 30min στους 4° C.
7. Έκπλυση εις τριπλούν με διάλυμα PBT για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος.
8. Επώαση με το ενζυμικό σύμπλοκο APAAP για 30min.
9. Τοποθέτηση των πλακιδίων στο μπανάκι χρώσεως και πλήρωσή του με το διήθημα του χρωμογόνου το οποίο αποτελείται από:
 - Napthol AS-MX phosphate 20mg
 - N,N-dimethylformamide 2ml
 - 0,1M Tris Buffer pH 8,2 98ml
 - 1M Levamisole 100ml
 - Fast Red TR salt 100mg
10. Επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Πλύσιμο με απεσταγμένο H₂O.
12. Αντίχρωση με Hematoxyline Mayer's για 5min.
13. Πλύσιμο με TBS για 10min.

2.5. Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των ανοσοεπιλεγμένων κυττάρων

2.5.1. Πολλαπλασιασμός των ΣΣΚ

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. D-MEM medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)
2. Εμβρυϊκός ορός βοός (FBS) (Gibco, BRL)
3. Basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF) (R&D, UK)
4. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS; pH 7.2) (Gibco, BRL)
5. Διάλυμα θρυψίνης-EDTA, 0.25% (Gibco, BRL)
6. Φλάσκες καλλιέργειας 25-cm² (Corning, NY)

Πειραματική πορεία

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης τα διαχωρισθέντα κύτταρα φυγοκεντρούνται (1500 rpm, 10 min) και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5ml θρεπτικού υλικού, D-MEM εμπλουτισμένου με 10% FBS και 50ng/ml b-FGF. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε φλάσκες επιφάνειας 25-cm² και σε επωαστικό κλίβανο με απόλυτη υγρασία, 5% CO₂ και 37°C. Η ανάπτυξή τους παρακολουθείται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο και ανά 2-3 ημέρες ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό. Με την απομάκρυνση του παλαιού κάθε φορά θρεπτικού υλικού, απομακρύνονται και όλα τα κύτταρα που εναιωρούνται σε αυτό. Αντιθέτως, παραμένουν αυτά που προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας. Όταν τα τελευταία καλύψουν περίπου το 75% της καλλιεργητικής επιφάνειας (confluence) πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια αυτών ως εξής: απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με PBS, απομακρύνεται το PBS και προστίθενται 2-3ml διαλύματος θρυψίνης – EDTA, ώστε να καλυφθεί όλη η καλλιεργητική επιφάνεια. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο για 3-5min, μέχρι να φανεί στο μικροσκόπιο ότι έχουν αποκολληθεί από τον πυθμένα της φλάσκας. Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέγεται σε σωλήνα φυγοκέντρου και η καλλιεργητική φλάσκα εκπλένεται δύο φορές με PBS που περιέχει 10% FBS ώστε να συλλεχθούν όλα τα κύτταρα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση (1500 rpm, 10 min), απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα εκπλένονται μία ακόμα φορά με θρεπτικό υλικό. Τέλος, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 10ml φρέσκου θρεπτικού υλικού και τοποθετείται σε 2 νέες καλλιεργητικές φλάσκες. Η

ανακαλλιέργεια μπορεί να συνεχιστεί κατά τον ίδιο τρόπο πολλές φορές ώσπου να εξαντληθεί το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων.

2.5.2. Διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα – οστεοκύτταρα – χονδροκύτταρα

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. MesenCult® MSC Basal Medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)
2. MesenCult® Adipogenic Stimulatory Supplements (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)
3. MesenCult® Osteogenic Stimulatory Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) το οποίο αποτελείται από:
 - α) MesenCult® MSC Basal Medium
 - β) Osteogenic Stimulatory Supplement
 - γ) β-Glycerophosphate
 - δ) Dexamethasone
 - ε) Ascorbic Acid
4. StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, BRL) το οποίο αποτελείται από:
 - α) StemPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium
 - β) StemPro® Chondrogenesis Supplement
5. Φλάσκες καλλιέργειας 25-cm² (Corning, NY)
6. Κωνικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου των 15ml (Corning, NY)

Πειραματική πορεία

Μετά από 2 και 6 συνεχόμενα περάσματα με θρυψίνη (passages) – όπως αυτά περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.5.1. τα ΣΣΚ τοποθετούνται σε καλλιέργειες που ευοδώνουν τη διαφοροποίησή τους σε:

α) λιποκύτταρα, MSC Basal Medium εμπλουτισμένο με 10% Adipogenic Stimulatory Supplements. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε φλάσκες καλλιέργειας 25-cm² σε συγκέντρωση 4x10⁴ κύτταρα/cm².

β) οστεοκύτταρα, MSC Basal Medium εμπλουτισμένο με 15% Osteogenic Stimulatory Supplement, 10-mM β-Glycerophosphate, 0.01μM Dexamethasone και 50mg/ml Ascorbic acid. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε φλάσκες καλλιέργειας 25-cm² σε συγκέντρωση 1.5x10⁴ κύτταρα/cm².

γ) χονδροκύτταρα, Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium εμπλουτισμένο με 10% Chondrogenesis Supplement. Μετά και τη δεύτερη έκπλυση των κυττάρων που πραγματοποιείται σε κάθε ανακαλλιέργεια, 2.5×10^5 κύτταρα φυγοκεντρούνται σε κωνικά σωληνάρια των 15ml (1500 rpm, 10 min), ώστε να σχηματίσουν ίζημα (pellet). Στη συνέχεια αφαιρείται όλο το υπερκείμενο υλικό και προστίθεται στο pellet –χωρίς αυτό να επαναδιαλυθεί- το υλικό για τη διαφοροποίηση σε χονδροκύτταρα.

Οι καλλιέργειες διαφοροποίησης τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο που προαναφέρθηκε με απόλυτη υγρασία, 5% CO₂ και 37°C. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται δύο φορές εβδομαδιαίως και η διαφοροποίηση των ΣΣΚ σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, και χονδροκύτταρα, ολοκληρώνεται σε 5, 7 και 3 εβδομάδες αντίστοιχα.

2.5.3. Διαφοροποίηση σε ενδοθηλιακά κύτταρα

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. EndoCult® Liquid Medium Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) το οποίο αποτελείται από:
 - α) EndoCult® Basal Medium
 - β) EndoCult® Supplements
2. 4-well fibronectin-coated plate (BD Biosciences)

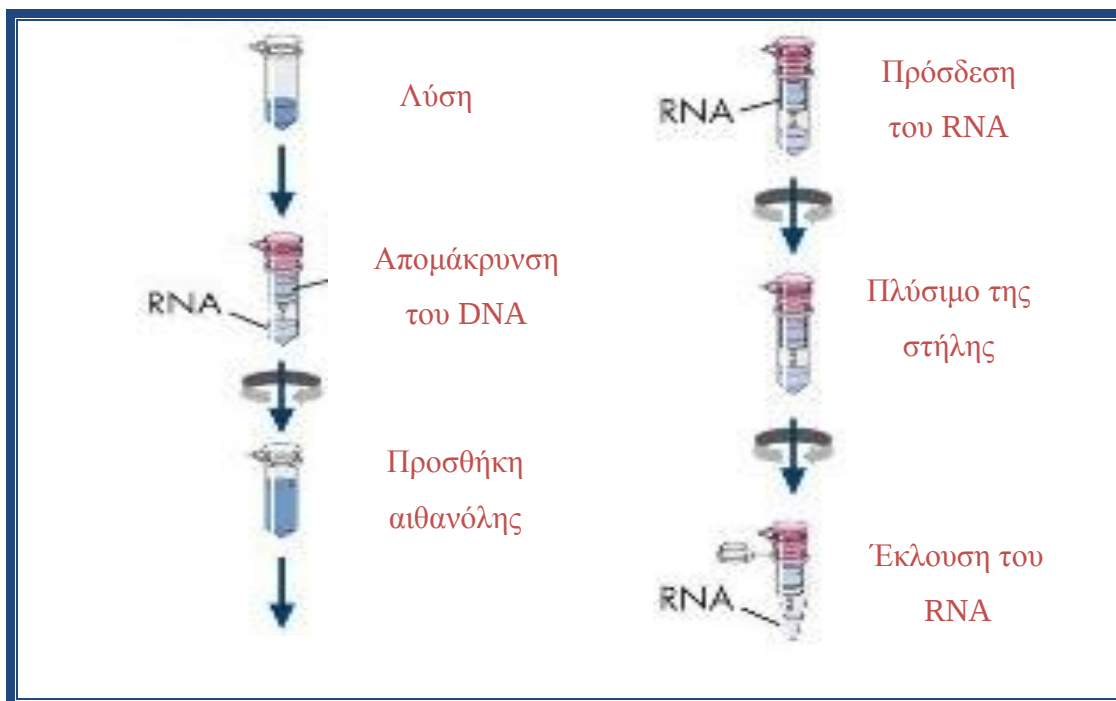
Πειραματική πορεία

Τα κεκαθαρμένα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικά τρυβλία-πλακάκια που είναι επιστρωμένα με φιβρονεκτίνη και σε συγκέντρωση 10^5 κύτταρα/well/ml υλικού. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο με απόλυτη υγρασία, 5% CO₂ και 37°C. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται δύο φορές εβδομαδιαίως και μετά από 3 εβδομάδες καλλιέργειας τα κύτταρα τυποποιούνται in situ, ανοσοϊστοχημικά, για την ανάδειξη των ενδοθηλιακών αντιγόνων von Willebrand factor και CD31.

2.6. Μοριακή ανάλυση των διαφοροποιημένων κυττάρων

2.6.1. Απομόνωση ολικού RNA

Αρχικά, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει ισχυρούς αποδιατακτικούς παράγοντες. Ταυτόχρονα, αδρανοποιούνται και οι RNases, αποφεύγοντας έτσι την καταστροφή του RNA. Στη συνέχεια, το δείγμα περνάει διαμέσου στήλης, η οποία με τη βοήθεια των αλάτων του ρυθμιστικού διαλύματος, απομακρύνει το DNA. Με την προσθήκη αιθανόλης και το πέρασμα του δείγματος από άλλη στήλη, το RNA προσδένεται σε αυτήν, ενώ όλα τα άλλα μόρια απομακρύνονται. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την έκλυση του RNA από τη στήλη (Εικόνα 2.6.1.).



Εικόνα 2.6.1. Αρχή μεθόδου απομόνωσης RNA

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. RNase-free σύριγγα που φέρει βελόνα διαμέτρου 0.9mm.
2. 70% αιθανόλη
3. RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), το οποίο περιέχει:
 - α) gDNA Eliminator mini spin στήλη
 - β) RNeasy mini spin στήλη
 - γ) Σωληνάρια συλλογής των 1.5ml και 2ml

δ) Ρυθμιστικά διαλύματα RLT Plus, RW1, RPE

ε) RNase-free H₂O

Πειραματική πορεία

1. Αποκόλληση των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί σε μονοστοιβάδα, σε καλλιεργητική φλάσκα (λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα), με την επίδραση θρυψίνης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.1. Επίδραση θρυψίνης υφίστανται και αυτά που έχουν σχηματίσει συμπαγές συσσωμάτωμα (χονδροκύτταρα) σε κωνικά σωληνάρια, προκειμένου να διαχωριστούν μεταξύ τους. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο φυγοκέντρου που περιέχει PBS με 10% FBS, ώστε να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη, και φυγοκεντρείται στις (1500 rpm, 10 min). Μετά τη φυγοκέντρωση, απορρίπτεται όλο το υπερκείμενο και το ίζημα επανααιωρείται σε 3ml PBS. Η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται, αφού ληφθεί δείγμα 200μl, για μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τον αιματολογικό αναλυτή. Τέλος, απορρίπτεται και πάλι όλο το υπερκείμενο.
2. Διάσπαση του κυτταρικού ιζήματος, κτυπώντας ελαφρά το σωληνάριο φυγοκέντρου, και στη συνέχεια πρόσθεση σε αυτό Buffer RLT Plus (350μl, αν ο αριθμός των κυττάρων είναι μικρότερος από 5×10^6 ή 600μl, αν ο αριθμός των κυττάρων είναι από 5×10^6 έως 1×10^7).
3. Ομογενοποίηση του λύματος περνώντας το, τουλάχιστον 5 φορές, από RNase-free σύριγγα που φέρει βελόνα διαμέτρου 0.9mm.
4. Μεταφορά του λύματος σε μία gDNA Eliminator spin στήλη, η οποία τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30sec σε 8000g, με αποτέλεσμα το δείγμα να περνάει στο σωληνάριο συλλογής. Η στήλη απορρίπτεται.
5. Πρόσθεση ενός όγκου (350μl ή 600μl) 70% αιθανόλης και ανακίνηση καλά με πιπέττα.
6. Μεταφορά έως 700μl από το δείγμα σε μία RNeasy spin στήλη που τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής 2ml. Φυγοκέντρωση για 15sec σε 8000g. Το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής απορρίπτεται.
7. Πρόσθεση 700μl Buffer RW1 στην RNeasy spin στήλη. Φυγοκέντρωση για 15sec σε 8000g, ώστε να εκπλυθεί η μεμβράνη της στήλης. Το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής απορρίπτεται.

8. Πρόσθεση 500μl Buffer RPE στην RNeasy spin στήλη. Φυγοκέντρωση για 15sec σε 8000g, ώστε να εκπλυθεί η μεμβράνη της στήλης. Το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής απορρίπτεται.
9. Πρόσθεση 500μl Buffer RPE στην RNeasy spin στήλη. Φυγοκέντρωση για 15sec σε 8000g, ώστε να εκπλυθεί η μεμβράνη της στήλης.
10. Τοποθέτηση της RNeasy spin στήλης σε καινούργιο σωληνάριο συλλογής 2ml και απόρριψη του παλιού με το περιεχόμενό του. Φυγοκέντρωση σε 8000g τουλάχιστον, για 1min.
11. Τοποθέτηση της RNeasy spin στήλης σε καινούργιο σωληνάριο συλλογής 1.5ml. Πρόσθεση 30-50μl RNase-free νερού κατευθείαν στη μεμβράνη της στήλης. Φυγοκέντρωση σε 8000g για 1min, ώστε να επιτευχθεί η έκλυση του RNA.

2.6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του RNA

Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται μετρώντας σε φασματοφωτόμετρο την απορρόφηση στα 260nm (A260). Απορρόφηση μιας μονάδας, στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, αντιστοιχεί σε 40μg RNA / ml. Ο υπολογισμός γίνεται με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$A_{260} \times 40 \times \Pi A = \Sigma_{RNA} (\mu g / ml)$$

όπου, **A260**: η απορρόφηση στα 260nm

40: η συγκέντρωση του RNA σε μg / ml, όταν η απορρόφηση στα 260nm είναι ίση με 1.

ΠΑ: ο παράγοντας αραίωσης του διαλύματος του RNA, προκειμένου αυτό να μετρηθεί.

Σ: η συγκέντρωση του RNA σε μg / ml

Η καθαρότητα του δείγματος ελέγχεται με τον προσδιορισμό του λόγου των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260nm και 280nm. Καθαρό RNA έχει λόγο A260/A280=1.9-2.1

2.6.3. PCR-Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR)

Η RT-PCR αποτελεί μια παραλλαγή της PCR και επιτυγχάνει την ενίσχυση μικρής ποσότητας ριβονουκλεϊνικού οξέος (RNA). Ως αρχικό δείγμα επομένως χρησιμοποιείται RNA και όχι DNA. Επειδή όμως, η DNA πολυμεράση μπορεί να δράσει χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μόνο DNA αλυσίδα, το RNA μετατρέπεται αρχικά στο συμπληρωματικό του DNA (complementary DNA, cDNA) με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται εκκινητές που μπορεί να είναι ειδικοί, συμπληρωματικοί δηλαδή ως προς την αλληλουχία στόχο, τυχαίοι, ή ολιγο-dTs όταν πρόκειται για mRNA. Αυτό το cDNA χρησιμοποιείται στη συνέχεια ως εκμαγείο από τη DNA πολυμεράση στη τεχνική της PCR.

Ένα τυπικό πρωτόκολλο RT-PCR για mRNA περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια (Εικόνα 2.6.3.):

α) αποδιάταξη: Με θέρμανση στους 65°C, καταστρέφεται η δευτεροταγής δομή του mRNA, και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο από την αντίστροφη μεταγραφάση.

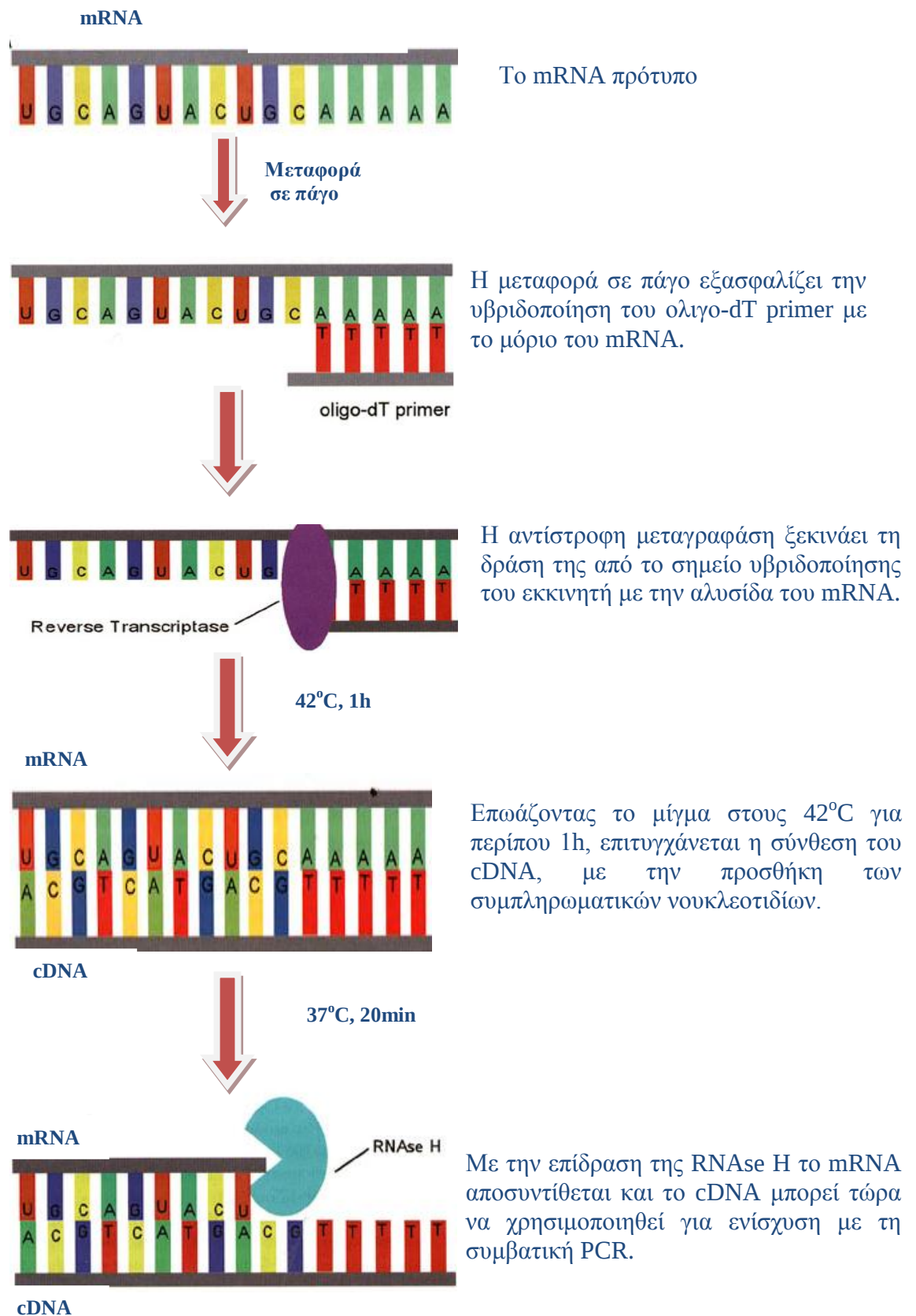
β) υβριδίσωση: Με μεταφορά του μίγματος στον πάγο επιτυγχάνεται η υβριδίσωση του ολιγο-dT primer με το μόριο του mRNA.

γ) προέκταση: Στο επόμενο βήμα η θερμοκρασία αυξάνεται στους 42°C, περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για την αντίστροφη μεταγραφάση, ώστε να πραγματοποιήσει τη σύνθεση της αλυσίδας του cDNA.

δ) απενεργοποίηση: Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 70°C, ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και να σταματήσει η αντίδραση.

ε) πέψη: Μερικές φορές, προκειμένου να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η PCR, είναι απαραίτητη η πέψη του mRNA, η οποία επιτυγχάνεται με το ένζυμο RNase H. Η RNase H ενεργοποιείται στους 37°C. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται όταν η αλληλουχία του cDNA που πρόκειται να ενισχυθεί είναι μεγαλύτερη από 1kb.

Η σύνθεση του cDNA και η αντίδραση της PCR μπορούν να πραγματοποιηθούν, είτε σε δύο ξεχωριστά σωληνάρια (two step RT-PCR), ή σε ένα σωληνάριο και ένα επομένως στάδιο (one step RT-PCR), τοποθετώντας όλα τα απαιτούμενα συστατικά από την αρχή.



Εικόνα 2.6.3 Τα διαδοχικά στάδια σύνθεσης του cDNA

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. DNase I, Amplification Grade Kit (Invitrogen), το οποίο περιέχει:
 - DNase I, Amp Grade
 - 10X DNase I Reaction Buffer
 - 25mM EDTA (pH 8.0)
2. DEPC-treated water (Invitrogen)
3. Oligo(dT)₁₂₋₁₈-primer (Invitrogen)
4. dNTPs mix (Promega)
5. SuperScript Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen), το οποίο περιλαμβάνει:
 - 5X First-Strand Buffer
 - DDT (100mM)
 - SuperScript II RT

Πειραματική πορεία

Πριν την έναρξη της σύνθεσης του cDNA προηγείται καθαρισμός του απομονωμένου RNA ως εξής:

1. Σε μικρού μεγέθους και RNase-free σωληνάρια (0.5ml), που είναι τοποθετημένα σε πάγο, προσθέτονται τα ακόλουθα συστατικά:

• Δείγμα RNA	1μg
• 10X DNase I Reaction Buffer	1μl
• DNase I, Amp Grade, 1U/μl	1μl
• DEPC-treated water	έως 10μl

2. Επώαση των δειγμάτων για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 1μl διαλύματος EDTA 25mM για αδρανοποίηση της DNase I.
4. Θέρμανση για 10min στους 65°C.

Μετά και την παραπάνω διαδικασία το RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση του cDNA.

5. Σε μικρού μεγέθους σωληνάρια (0.2ml) κατάλληλα για PCR τοποθετούνται τα ακόλουθα συστατικά:

• DEPC-treated water	έως 12μl
• Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ - primer (0.5μg/μl)	1μl
• dNTPs mix (10mM each)	1μl
• RNA	500 ng

6. Το μίγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5min και γρήγορα μεταφέρεται σε πάγο. Το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλέγεται με σύντομη φυγοκέντρωση και στη συνέχεια προστίθενται τα εξής:

- 5X First-Strand Buffer 4μl
- DDT (0.1M) 2μl
- SuperScript II RT (200units/μl) 1μl

7. Το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 42°C για 50min.

8. Η SuperScript II RT απενεργοποιείται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 70°C για 15min.

Το cDNA που έχει δημιουργηθεί μπορεί τώρα να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για ενίσχυση με τη τεχνική της PCR.

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. Ultra pure, distilled, DNase-RNase free H₂O (Gibco, BRL).
2. dNTPs mix (Promega)
3. Primers (Operon) (Πίνακας 2.6.3. B)
4. Taq DNA polymerase (Invitrogen), συνοδευόμενη από MgCl₂ (50mM) και 10X -PCR Buffer

Πειραματική πορεία

1. Σε μικρού μεγέθους σωληνάκια (0.2ml) κατάλληλα για PCR τοποθετούνται τα ακόλουθα συστατικά:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
10X -PCR Buffer	5
MgCl ₂ (50mM)	1.5
dNTPs mix (10mM each)	1
Forward primer (10μM)	1
Reverse primer (10μM)	1
Taq DNA polymerase (5units/μl)	0.4
cDNA (5ng/μl)	2
Ultra pure H ₂ O	έως 50
Συνολικός όγκος	50

2. Το μίγμα αναμιγνύεται και τα σωληνάρια τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται με βάση τα ακόλουθα βήματα (Πίνακας 2.6.3. Α).

Πίνακας 2.6.3. Α Συνθήκες PCR

Στάδιο της PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
<i>Αρχική αποδιάταξη του DNA</i>	94°C	2 min	
Αποδιάταξη του DNA	94°C	30 sec	* Κύκλοι
Υβριδίαση των εκκινητών	*	30 sec	
Προέκταση	72°C	1 min	
<i>Τελική προέκταση</i>	72°C	10 min	

*Οι θερμοκρασίες υβριδίασης των εκκινητών και οι κύκλοι για κάθε PCR αντίδραση φαίνονται στον πίνακα 2.6.3. Β (Nesti et al, 2008).

Πίνακας 2.6.3. Β

Γονίδιο*	Αλληλουχία εκκινητών(5'-3')	Θερμοκρασία υβριδίασης	Αριθμός κύκλων	Μέγεθος προϊόντος(bp)
GAPDH				
Forward	CAAGGCTGAGAACGGGAAGC	58°C	26	194
Reverse	AGGGGGCAGAGATGATGACC			
LPL				
Forward	GAGATTTCTCTGTATGGCACC	52°C	26	276
Reverse	CTGCAAATGAGACACTTTCTC			
COL2A1				
Forward	GGAAACTTTGCTGCCCAGATG	58°C	34	167
Reverse	TCACCAGGTTTACCAGGATTGC			
ALP				
Forward	TCAGAAGCTCAACACCAACG	55°C	26	199
Reverse	GTCAGGGACCTGGGCATT			

❖ GAPDH=Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Γονίδιο αναφοράς).
LPL=Lipoprotein lipase. COL2A1=Collagen 2A1. ALP=Alkaline phosphatase

2.6.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία τεχνική απλή και γρήγορη, που επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι τα μόρια του DNA, λόγω του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών του ομάδων, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μετακινούνται προς το θετικό πόλο.

Οι κυριότεροι παράγοντες, από τους οποίους εξαρτάται ο ρυθμός μετανάστευσης του DNA, είναι οι εξής:

α) Μοριακό βάρος του DNA. Δίκλωνα μόρια DNA μετακινούνται και διανύουν απόσταση που είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου ($\log_{10}$) του μοριακού τους βάρους ή του αριθμού των βάσεων τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα, και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μήκους.

β) Συγκέντρωση της αγαρόζης. Ένα γραμμικό μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους, μεταναστεύει με διαφορετικό ρυθμό σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό, χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων, μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα ευρύ φάσμα μεγεθών DNA (Πίνακας 2.6.4.).

γ) Στερεοδιαμόρφωση του DNA. Μόρια DNA ίδιου μοριακού βάρους, αλλά με διαφορετική στερεοδιαμόρφωση (υπερελικωμένα κυκλικά, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα), κινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική μηχανική παρεμπόδιση της μετακίνησης, κατά μήκος του πηκτώματος, ανάλογα με την αναδίπλωση του μορίου DNA στο χώρο.

δ) Εφαρμοζόμενη τάση. Υπό χαμηλή διαφορά δυναμικού, ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης τάσης. Το εύρος διαχωρισμού σε πηκτώματα αγαρόζης μειώνεται, όσο αυξάνεται η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού.

ε) Τύπος της αγαρόζης (standard ή low-melting)

στ) Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στη διατήρηση της σταθερότητας του pH και παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα ή καθόλου.

Προκειμένου οι ζώνες του DNA να γίνουν ορατές στο πήκτωμα, χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο, λόγω της επίπεδης διαμόρφωσής του, παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων, και δεσμεύεται στο DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία και να φθορίζει στο ορατό φάσμα, με αποτέλεσμα οι ζώνες του DNA να οπτικοποιούνται.

Πίνακας 2.6.4. Εύρος διαχωρισμού τμημάτων DNA σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της αгарόζης στο πήκτωμα

Συγκέντρωση αгарόζης στο πήκτωμα (% w/v)	Εύρος διαχωρισμού τμημάτων DNA (kb)
0.3	5-60
0.6	2-25
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Υλικά-Αντιδραστήρια

1. TBE Buffer, 10X, Molecular Biology Grade (Promega)
2. Agarose, LE, Analytical Grade (Promega)
3. Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου, Molecular Grade (Promega)
4. Διάλυμα χρωστικής, Blue/Orange Loading Dye, 6X (Promega)
5. 50bp DNA Step Ladder (Promega)
6. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (SCIE-PLAS)
7. Τροφοδοτικό συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (SCIE-PLAS)
8. Σύστημα φωτογράφισης και ανάλυσης πηκτώματος GigiGenius PS G10 (SYNGENE)

Πειραματική πορεία

Σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE διαλύεται με βρασμό κατάλληλη ποσότητα αгарόζης, ώστε να σχηματιστεί πήκτωμα 2% (w/v). Στη συνέχεια και λίγο πριν η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει στο σημείο πήξης (~ 37-40°C), προστίθεται

διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε η τελική του συγκέντρωση στο πήκτωμα να είναι 0,5μg/ml. Η πήξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Για να γίνει η ηλεκτροφόρηση, αναμειγνύονται 12μl DNA, από το προϊόν της PCR, με 3μl από το διάλυμα χρωστικής Blue/Orange Loading Dye, 6X. Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος και η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, υπό σταθερή τάση 90V, για περίπου 15min. Παράλληλα ηλεκτροφορείται και μάρτυρας DNA, γνωστών μοριακών μεγεθών, προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται. Τέλος, το πήκτωμα τοποθετείται στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας 312nm, που είναι ενσωματωμένη στο σύστημα GigiGenius PS G10 και φωτογραφίζεται.

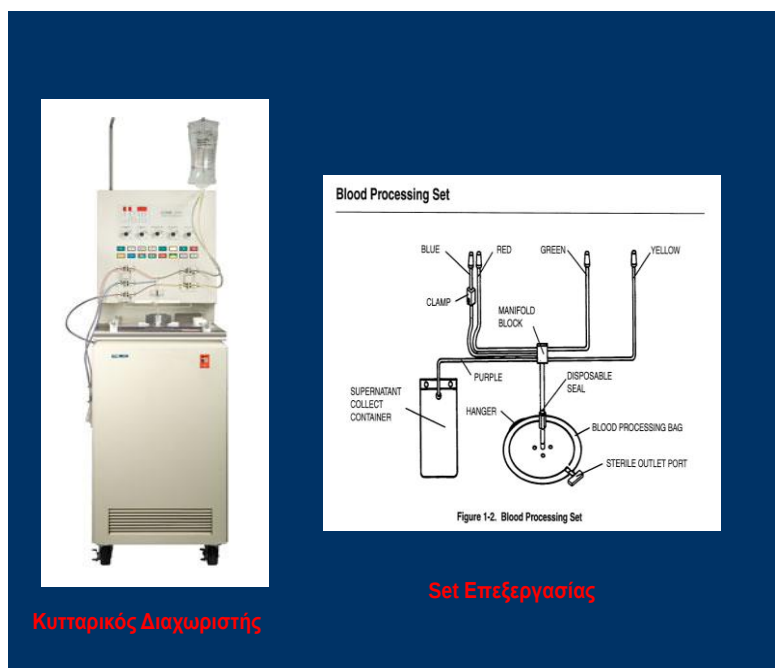
2.7. Επιλογή των CD133⁺ και CD133⁻CD34⁺ κυττάρων για κλινική χρήση

Η συλλογή του μυελού των οστών για κλινική χρήση πραγματοποιήθηκε από την περιοχή της οπίσθιας λαγόνιας ακρολοφίας ασθενών με χρόνια ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, αφού προηγουμένως η περιοχή είχε διηθηθεί με 20ml ξυλοκαΐνης. Το συνολικό πρωτόκολλο για τη διεξαγωγή της κλινικής αυτής μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας του Ωνάσειου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου (ΩΚΚ). Ο κάθε ασθενής έδωσε έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή του στο πρωτόκολλο.

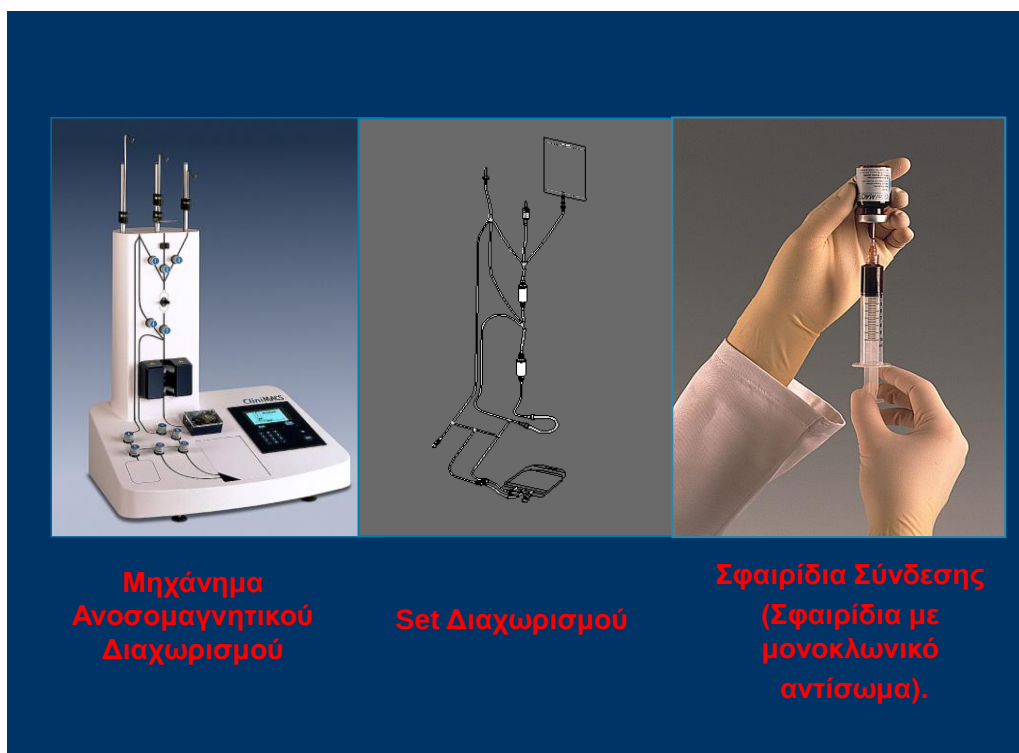
Υλικά-Αντιδραστήρια

1. Ασκός με το μόςχευμα
2. Sampling site couplers
3. Σύριγγες των 2.5, 10 και 60ml
4. Φιαλίδια γενικής αίματος και μικροβιακής καλλιέργειας
5. Ficoll 1.077
6. Αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια των 50ml
7. Filling tubes του 1ml
8. Βελόνες 16G
9. Φυσιολογικός ορός (Φ.Ο.)
10. Ανθρώπινη αλβουμίνη (Α.Α.)
11. Ψυχόμενη φυγόκεντρος με τους κατάλληλους υποδοχείς για σωληνάρια των 50ml
12. Ασκοί των 150, 600 και 1000ml
13. COBE 2991, μηχανήμα διαχωρισμού του μυελού των οστών (Εικόνα 2.7.Α.)
14. Σετ διαχωρισμού του μυελού των οστών, συμβατό με το μηχανήμα διαχωρισμού COBE 2991 (Εικόνα 2.7.Α.)
15. Αναδευτήρας ασκών
16. Ηλεκτρονική ζυγαριά με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου
17. Λαβίδες
18. Processing bag clips
19. Αποστειρωμένα μαχαίριδια μιας χρήσεως
20. Αποστειρωμένα γάντια
21. Ψεκαστήρας με αντισηπτικό διάλυμα

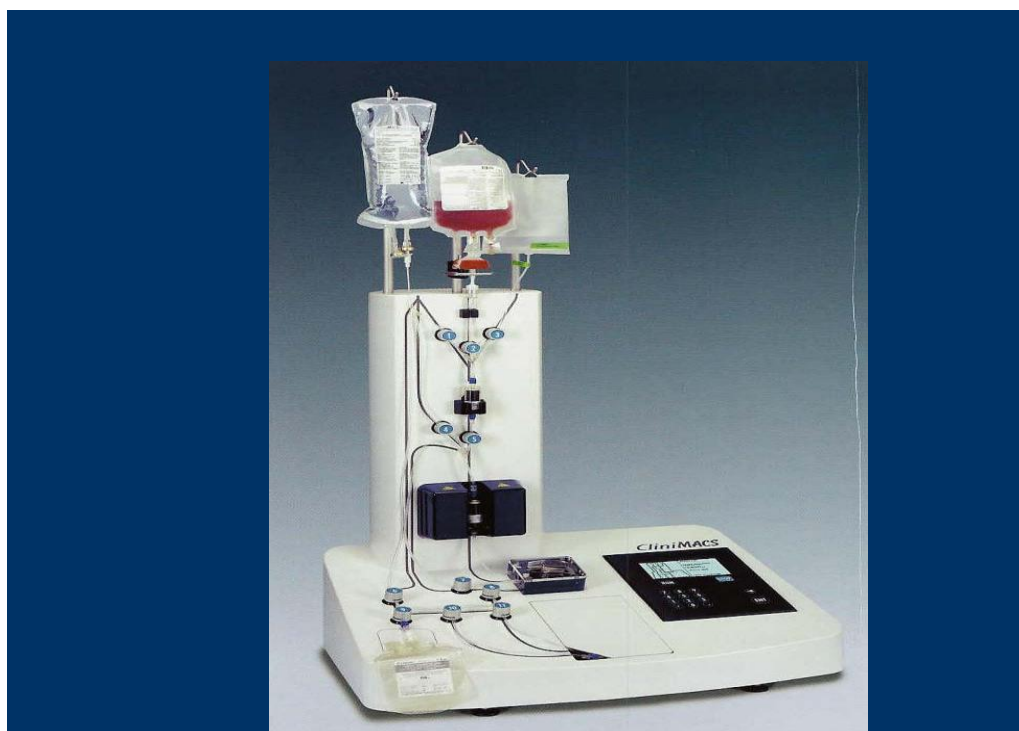
- 22. Αποστειρωμένα τολύπια
- 23. Ανοσομαγνητικός διαχωριστής CliniMacs (Εικόνα 2.7.B.)
- 24. CliniMacs PBS (3x1lt)
- 25. CliniMacs tubing set (Εικόνα 2.7.B.)
- 26. CliniMacs CD133 Reagent (Εικόνα 2.7.B.)
- 27. CliniMacs CD34 Reagent (Εικόνα 2.7.B.)
- 28. Φίλτρο
- 27. Spike Connector



Εικόνα 2.7.A. Ο κυτταρικός διαχωριστής COBE 2991 λειτουργεί ως φυγόκεντρος και αντλία μαζί. Το πλύσιμο των κυττάρων επιτυγχάνεται με φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές για 15min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απομακρύνουμε το υπερκείμενο ελευθερώνοντας την αντίστοιχη έξοδο του set διαχωρισμού.



Εικόνα 2.7.Β.CliniMacs



Εικόνα 2.7.Γ. Το δείγμα, το washing solution και ο ασκός των 150 ml, συνδεδεμένα με το tubing set και εφαρμοσμένα στον ανοσομαγνητικό διαχωριστή, προκειμένου να αρχίσει η επιλογή του επιθυμητού πληθυσμού.

Πειραματική πορεία

Όλα τα παρακάτω πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής με στείρες τεχνικές.

2.7.1. Επιλογή των CD133⁺ κυττάρων

1. Αφαιρούμε 0,5ml περίπου από το μόσχευμα για μέτρηση των εμυρήνων και των CD133⁺ κυττάρων.
2. Τοποθετούμε 25 ml ficoll σε κάθε ένα από 8 κωνικά σωληνάρια και επιστοιβάζουμε ίσο όγκο μυελού.
3. Φυγοκεντρούμε στις 1500 rpm για 30 min.
4. Συλλέγουμε τη στοιβάδα των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων χρησιμοποιώντας σύριγγες των 60ml και filling tubes του 1ml.
5. Εγχύουμε τη στοιβάδα σε ασκό των 1000ml.
6. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2-5 ώστε να διαχωρίσουμε όλη την ποσότητα του μυελού.
7. Προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα ανθρώπινης αλβουμίνης σε 1lt CliniMacs PBS, ώστε η τελική της συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 0,5% (Washing solution).
8. Ανοίγουμε το σετ διαχωρισμού του μυελού των οστών (Εικόνα 2.7.A.) και κλείνουμε όλες τις εξόδους των παραγώγων του μυελού με λαβίδες.
9. Συνδέουμε το άκρο της κόκκινης εξόδου στον ασκό με τη στοιβάδα των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων και το άκρο της πράσινης εξόδου στον ασκό με το Washing solution.
10. Τοποθετούμε το σετ στο μηχάνημα COBE 2991(Εικόνα 2.7.A.).
11. Επιλέγουμε το manual mode του μηχανήματος, ώστε, όλα τα βήματα να ελέγχονται από το χειριστή.
12. Αφαιρούμε τη λαβίδα από την κόκκινη έξοδο ώστε τα κύτταρα να μεταφερθούν στον στρογγυλό ασκό που εφαρμόζεται μέσα στο μηχάνημα.
13. Κλείνουμε την κόκκινη έξοδο και ανοίγουμε την πράσινη ώστε ο στρογγυλός ασκός να πληρωθεί με Washing solution.
14. Κλείνουμε την πράσινη έξοδο και φυγοκεντρούμε στις 3000 στροφές για 15min.
15. Ελευθερώνουμε τη μωβ έξοδο που οδηγεί στον ασκό των αποβλήτων.
16. Ενεργοποιούμε την άντληση και απομακρύνουμε το υπερκείμενο με ελεγχόμενο ρυθμό (100ml/min).

17. Απενεργοποιούμε την άντληση και κλείνουμε τη μωβ έξοδο.
18. Ανοίγουμε την πράσινη ώστε ο στρογγυλός ασκός να πληρωθεί ξανά με Washing solution και πλένουμε τα κύτταρα δεύτερη φορά επαναλαμβάνοντας τα βήματα 14-17.
19. Ο όγκος των MNC κυττάρων, μετά και το τελευταίο πλύσιμο, θα πρέπει να είναι 95 ± 5 ml σύμφωνα με τις οδηγίες που εμπεριέχονται στο manual του CliniMacs.
20. Προσθέτουμε στο εναιώρημα των κυττάρων 7,5ml (ένα φιαλίδιο) CliniMacs CD133 Reagent (Εικόνα 2.7.B.).
21. Τοποθετούμε τον ασκό στον αναδευτήρα και επωάζουμε για 30min στους 18-25°C.
22. Επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο των κυττάρων με το COBE 2991 ακολουθώντας τα βήματα 7-18.
23. Ο όγκος των MNC κυττάρων, μετά και το τελευταίο πλύσιμο, θα πρέπει να είναι 150ml σύμφωνα με τις οδηγίες που εμπεριέχονται στο manual του CliniMacs.
24. Συνδέουμε στο CliniMacs tubing set τα εξής:
 - τον ασκό που περιέχει τα κύτταρα δια μέσου του φίλτρου
 - ένα λίτρο washing solution
 - έναν ασκό 150ml δια μέσου του Spike Connectorκαι τοποθετούμε το set στο CliniMacs (Εικόνα 2.7.Γ.).
25. Επιλέγουμε το πρόγραμμα για τη θετική επιλογή των $CD133^+$ κυττάρων.
26. Μετά την ολοκλήρωση της επιλογής, απομονώνουμε και αποκόπτουμε τον ασκό που περιέχει τα $CD133^+$, καθώς, και αυτόν που περιέχει τα $CD133^-$.
27. Αφαιρούμε 0,5ml περίπου, από τον ασκό των $CD133^+$, για μέτρηση των εμπυρήνων και των $CD133^+$ κυττάρων.

2.7.2. Επιλογή των $CD133^- CD34^+$ κυττάρων

1. Χρησιμοποιώντας 1lt Washing solution πλένουμε το κλάσμα των $CD133^-$ κυττάρων ακολουθώντας τα βήματα 8-19.
2. Προσθέτουμε στο εναιώρημα των κυττάρων 7,5ml (ένα φιαλίδιο) CliniMacs CD34 Reagent (Εικόνα 2.7.B.).
3. Τοποθετούμε τον ασκό στον αναδευτήρα και επωάζουμε για 30min στους 18-25°C.

4. Επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο των κυττάρων με το COBE 2991 ακολουθώντας τα βήματα 7-18.
5. Ο όγκος των MNC κυττάρων μετά και το τελευταίο πλύσιμο θα πρέπει να είναι 150ml σύμφωνα με τις οδηγίες που εμπεριέχονται στο manual του CliniMacs.
6. Συνδέουμε στο CliniMacs tubing set τα εξής:
 - τον ασκό που περιέχει τα κύτταρα δια μέσου του φίλτρου
 - ένα λίτρο washing solution
 - έναν ασκό 150ml δια μέσου του Spike Connectorκαι τοποθετούμε το set στο CliniMacs (Εικόνα 2.7.Γ.).
7. Επιλέγουμε το πρόγραμμα για τη θετική επιλογή των $CD34^+$ κυττάρων.
8. Μετά την ολοκλήρωση της επιλογής, απομονώνουμε και αποκόπτουμε τον ασκό που περιέχει τα $CD133^-CD34^+$, καθώς και αυτόν, που περιέχει τα $CD133^-CD34^-$.
9. Αφαιρούμε 0,5ml περίπου από τον ασκό των $CD133^-CD34^+$, για μέτρηση των εμπυρήνων και των $CD34^+$ κυττάρων.
10. Αφαιρούμε επίσης, 1-3ml από τον ασκό των $CD133^-CD34^-$, για μικροβιακή καλλιέργεια.

Τέλος, τα κλάσματα των $CD133^+$ και $CD133^-CD34^+$ φυγοκεντρώνονται σε κωνικά σωληνάρια (1500rpm για 10min), απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επανααιωρούνται σε 3ml διαλύματος (Φ.Ο.- Α.Α. 5%), προκειμένου να χορηγηθούν στον ασθενή.

2.8 Επιλογή ασθενών-Σχεδιασμός μελέτης*

Στη μελέτη αυτή συμπεριελήφθησαν 8** ασθενείς (8 άνδρες), ηλικίας 42-59 ετών, με παλαιό (9-81 μήνες) πρόσθιο έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς βιωσιμότητα. Πριν την έναρξη της κυτταρικής θεραπείας υποβάλλονταν πέραν των βασικών εργαστηριακών και στις εξής ειδικές εξετάσεις:

- Σπινθηρογράφημα μυοκαρδίου με Tl-201 (Θάλλιο) με επαναχορήγηση για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των μυοκαρδιακών περιοχών.
- Υπερηχοκαρδιογράφημα με χορήγηση ντομπουταμίνης για τον προσδιορισμό του κλάσματος εξώθησης, τον τελοσυστολικό και τον τελοδιαστολικό όγκο της αριστερής κοιλίας με ή χωρίς ντομπουταμίνη,

όπως και για την εκτίμηση της συσταλτικότητας κατά περιοχές μετρώντας το ρυθμό παραμόρφωσης (strain rate).

- Doppler Tissue Imaging για τη μέτρηση της μυοκαρδιακής ταχύτητας και ιστικής ροής στην περιοχή του μυοκαρδίου χωρίς βιωσιμότητα.

Το πρωί της ημέρας 0 πραγματοποιούνταν η συλλογή του μυελού στη μονάδα εμφραγμάτων του ΩΚΚ υπό συνεχή ηλεκτρονική παρακολούθηση των ζωτικών σημείων των ασθενών. Στη συνέχεια ο μυελός μεταφερόταν στο εργαστήριο της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών του ΠΓΝ Παίδων <<Η Αγία Σοφία>>, όπου ελάμβανε χώρα η επιλογή των επιθυμητών πληθυσμών με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε. Τα κεκαθαρμένα κύτταρα μεταφέρονταν και πάλι στο ΩΚΚ όπου αρχικά επωάζονταν με το ραδιοφάρμακο $HM-PAO-99^{m}Tc$. Αμέσως μετά πραγματοποιούνταν η ενδοστεφανιαία έγχυσή τους στον ασθενή, στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του ΩΚΚ, κατά τη διάρκεια συμβατικής στεφανιογραφίας. Μία ώρα αργότερα ο ασθενής μεταφέρονταν στο τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής του ΩΚΚ όπου με σπινθηρογράφημα ελέγχονταν η καθήλωση των κυττάρων στο αγγειακό δίκτυο της περιοχής του μυοκαρδίου. Οι λήψεις επαναλαμβάνονταν 24 ώρες μετά την έγχυση με ολόσωμα σπινθηρογραφήματα. Ο ασθενής επανελέγχονταν 6-12 μήνες αργότερα με τις εξετάσεις που προαναφέρθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί το αποτέλεσμα της κυτταρικής θεραπείας.

Τα αποτελέσματα της ομάδας των ασθενών που έλαβαν τα αυτόλογα κύτταρα συγκρίθηκαν με εκείνα άλλης ομάδας (8 ασθενείς) που είχε επιλεγεί με τα ίδια κριτήρια και αποτέλεσε τους μάρτυρες. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Student's και το χ^2 test. Όλη η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS.

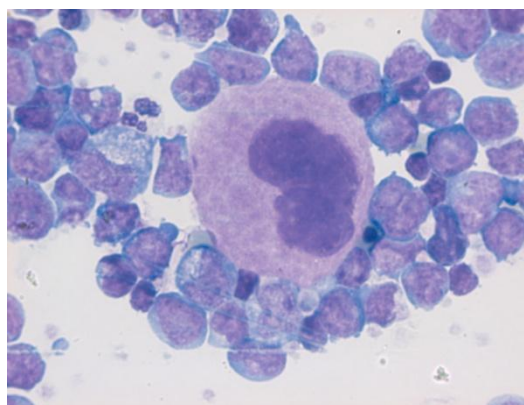
* Η συγγραφή της παραγράφου αυτής έχει ως αποκλειστικό σκοπό τη συνοπτική πληροφόρηση για την κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε.

**Μυελός των οστών συνελέγη, επεξεργάστηκε και χορηγήθηκε συνολικά σε 26 ασθενείς. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να γίνει αναφορά στις περιπτώσεις εκείνες που τα κεκαθαρμένα κύτταρα σημάνθηκαν με ραδιοφάρμακο.

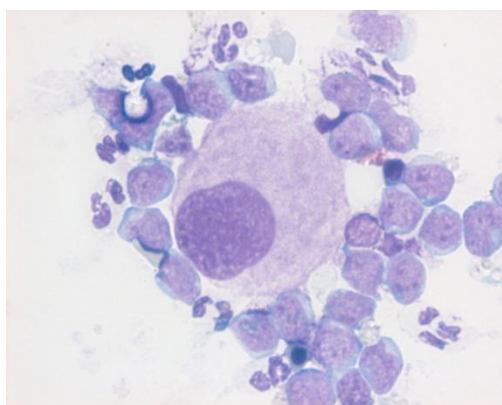
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Συλλογή και επεξεργασία του μυελού των οστών

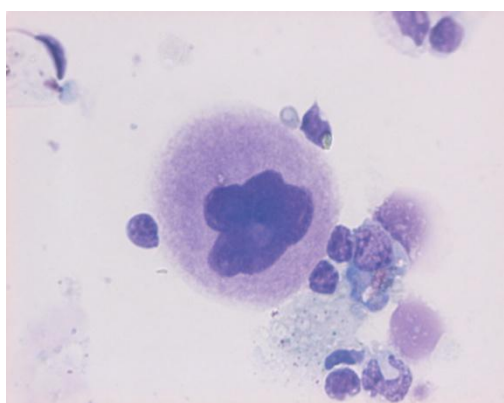
Συνολικά πάρθηκαν 23 δείγματα μυελού των οστών όγκου 10ml το καθένα. Ο μέσος αριθμός εμυρήνων κυττάρων ήταν 2.02×10^8 , ενώ ο αριθμός των λεμφομονοκυττάρων μετά το διαχωρισμό με φυκόλη ήταν 1.15×10^8 . Από τα 23 δείγματα τα 4 χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των $CD34^+$ κυττάρων, τα 5 για την απομόνωση των $CD105^+$, τα 8 για την απομόνωση των $CD133^+$ και τα 6 για την απομόνωση των $CD271^+$. Ο μέσος αριθμός των επιλεγμένων κυττάρων μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού ήταν 2.5×10^6 , 1.6×10^6 , 1.5×10^6 και 1.7×10^6 αντιστοίχως (Εικόνα 3.1, Πίνακας 3.1).



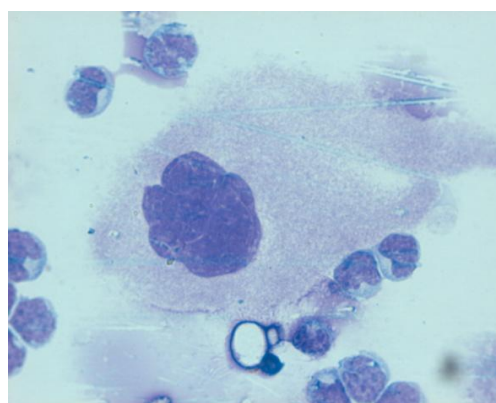
A.



B.



Γ.



Δ.

Εικόνα 3.1 Μικροσκοπική παρατήρηση των επιλεγμένων πληθυσμών μετά από χρώση Giemsa. Α) $CD34^+$, Β) $CD133^+$, Γ) $CD105^+$ και Δ) $CD271^+$ κύτταρα μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν τα ευμεγέθη ΣΣΚ.

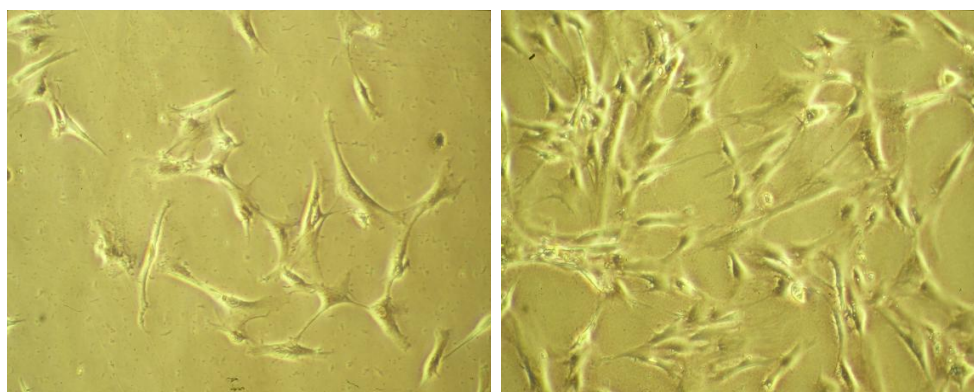
Πίνακας 3.1

	CD34	CD105	CD133	CD271
Αρ. Δειγμάτων	4	5	8	6
Όγκος Μυελού	10ml	10ml	10ml	10ml
Μέσος αρ. εμρυρήνων κυτ.	$2.1 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.95 \pm 0.08 \times 10^8$	$2.0 \pm 0.2 \times 10^8$	$2.03 \pm 0.05 \times 10^8$
Μετά το διαχωρισμό με φυκόλη				
Μέσος αρ. μονοπυρήνων κυτ.	$1.2 \pm 0.1 \times 10^8$	$1 \pm 0.2 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.3 \times 10^8$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^8$
Μετά τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό				
Μέσος αρ. επιλεγμένων κυτ.	$2.5 \pm 0.4 \times 10^6$	$1.6 \pm 0.3 \times 10^6$	$1.5 \pm 0.1 \times 10^6$	$1.7 \pm 0.3 \times 10^6$
Κατά το τέλος της καλλιέργειας				
Μέσος αρ. εκπτυγμένων κυτ.	$98 \pm 12 \times 10^8$	$90 \pm 9 \times 10^8$	$95 \pm 10 \times 10^8$	$89 \pm 7 \times 10^8$

3.2. Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού των ΣΣΚ

Τρεις έως πέντε ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας –ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που αρχικά τοποθετήθηκαν σε αυτήν – εμφανίζονται στον πυθμένα του καλλιεργητικού μέσου προσκολλημένα κύτταρα ινοβλαστικής μορφολογίας (Εικόνα 3.2.A). Κατά την 9^η-12^η ημέρα τα προσκολλημένα κύτταρα καταλαμβάνουν περίπου το 75% της καλλιεργητικής επιφάνειας (Εικόνα 3.2.B). Στο σημείο αυτό επεξεργάζονται με το διάλυμα θρυψίνης-EDTA και ανακαλλιεργούνται. Οι ανακαλλιέργειες επαναλαμβάνονται ανά 3-4 ημέρες, ενώ, το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ΣΣΚ φαίνεται να εξαντλείται, μετά την πάροδο περίπου 5 εβδομάδων και αφού έχουν πραγματοποιηθεί τουλάχιστον 9 συνεχή περάσματα (passages) με θρυψίνη. Στο σημείο αυτό ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώνεται αισθητά, ενώ, μορφολογικά γίνονται μεγαλύτερα, πιο πεπλατυσμένα, με πολλά κοκκία και κενोटόπια.

Ο αριθμός των ανοσοεπιλεγμένων κυττάρων ($CD34^+$, $CD105^+$, $CD133^+$, $CD271^+$), που τοποθετούνταν στην 25cm^2 – καλλιεργητική φλάσκα κατά την έναρξη της καλλιέργειας κυμαίνονταν από 0.5×10^6 έως 0.7×10^6 κύτταρα. Όταν τα προσκολλημένα κύτταρα καλύψουν το 75% περίπου της φλάσκας και επεξεργαστούν με θρυψίνη ο αριθμός τους ανέρχεται στα $0.8 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$, ενώ, μετά από 9 περάσματα φθάνει τα $93 \times 10^8 \pm 15 \times 10^8$ κύτταρα. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των ΣΣΚ και ο συνολικός αριθμός τους κατά το τέλος της καλλιέργειας δε φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων ανοσοεπιλεγμένων πληθυσμών (Πίνακας 3.1).

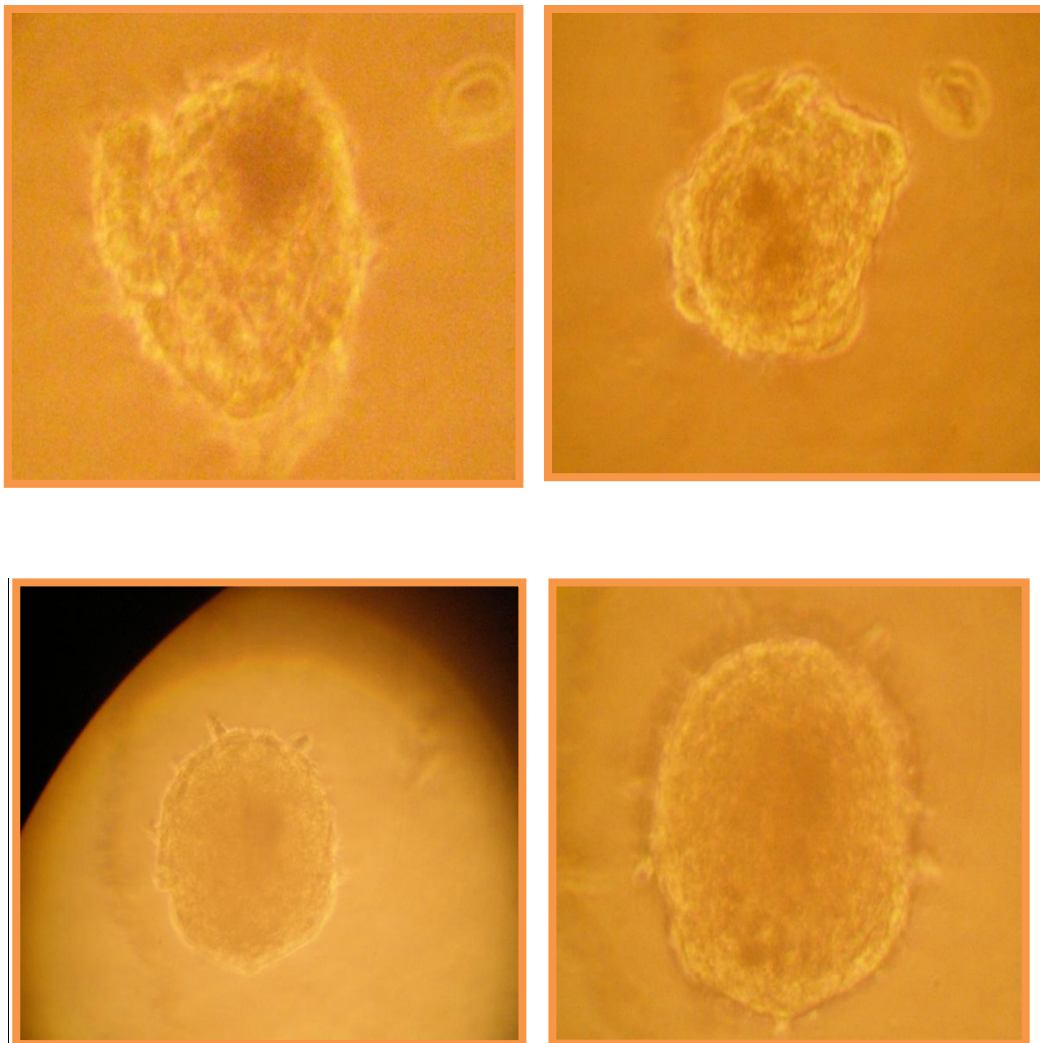


A.

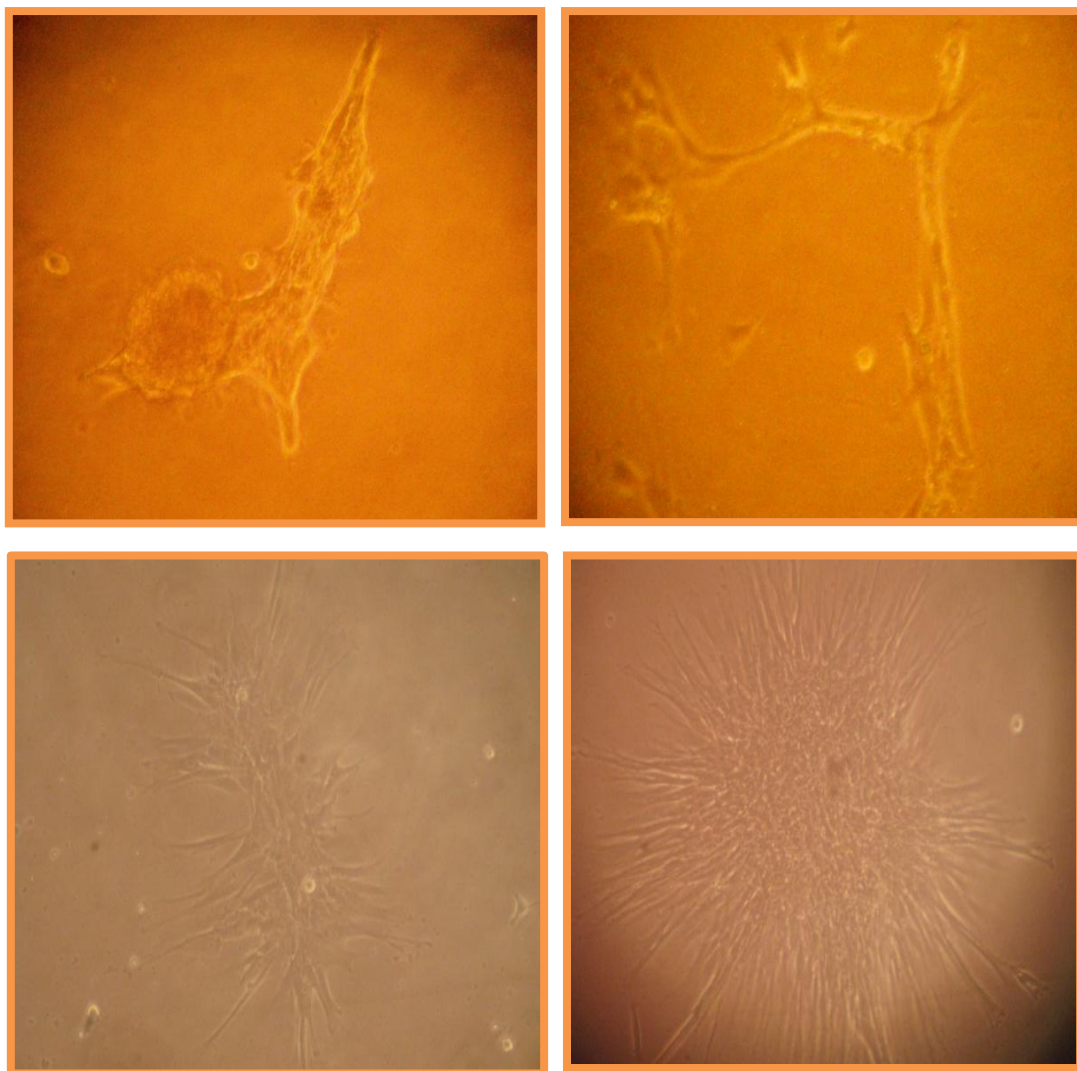
B.

Εικόνα 3.2 A) Ανάπτυξη προσκολλημένων κυττάρων 5 ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας. **B)** Τα προσκολλημένα κύτταρα έχουν καλύψει το 75% περίπου της επιφάνειας του καλλιεργητικού μέσου μετά από 9 ημέρες καλλιέργειας.

Σημαντική διαφοροποίηση από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε κατά την καλλιέργεια ενός δείγματος $CD271^{+}$ κυττάρων. Μετά το 3^ο πέρασμα δημιουργήθηκαν αυτόματα – χωρίς τροποποίηση των καλλιεργητικών συνθηκών ή του καλλιεργητικού υλικού- ποικιλόμορφοι κυτταρικοί σχηματισμοί αναστέλλοντας έτσι τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των ΣΣΚ. Μερικοί από αυτούς προσομοιάζουν με εκείνους που στη βιβλιογραφία περιγράφονται ως νευρόσφαιρες (Neurosphere-like structures) (Poloni et al, 2009), χωρίς όμως να διερευνηθούν περισσότερο (Εικόνες 3.2.Γ και 3.2.Δ).



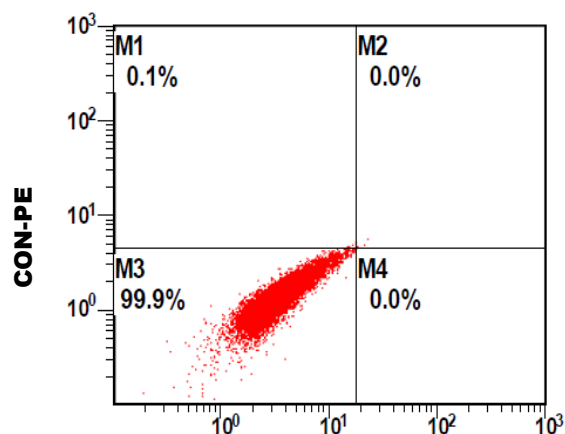
Εικόνα 3.2.Γ Κυτταρικοί σχηματισμοί που προσομοιάζουν με νευρόσφαιρες και εμφανίστηκαν μετά την 3^η ανακαλλιέργεια ενός δείγματος $CD271^{+}$ κυττάρων.



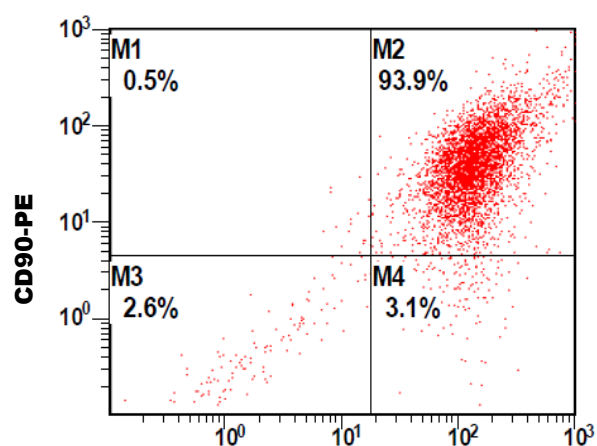
Εικόνα 3.2.Α. Άλλοι κυτταρικοί σχηματισμοί που εμφανίστηκαν μετά την 3^η ανακαλλιέργεια ενός δείγματος CD271⁺ κυττάρων, αναστέλλοντας τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των ΣΣΚ.

3.3. Φαινοτυπική ανάλυση των καλλιιεργημένων κυττάρων

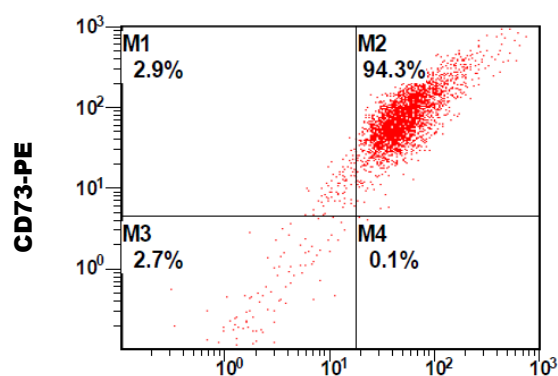
Η φαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων καλλιέργειας με κυτταρομετρία ροής, αποκάλυψε ότι τα κύτταρα αυτά, ανεξάρτητα από τον αρχικό πληθυσμό τον οποίο προέρχονταν (CD34⁺, CD105⁺, CD133⁺, CD271⁺) και ανεξάρτητα από τη χρονική στιγμή κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση (passage 2, passage 6) εξέφραζαν δείκτες που χαρακτηρίζουν τα ΣΣΚ όπως οι CD29, CD90, CD44, CD73, CD105 και Class I – HLA αντιγόνα (Εικόνα 3.3.). Αντιθέτως, απουσίαζε η έκφραση των CD45, CD14, CD19, CD34, HLA- DR και CD31 που ανευρίσκονται σε αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 3.3.).



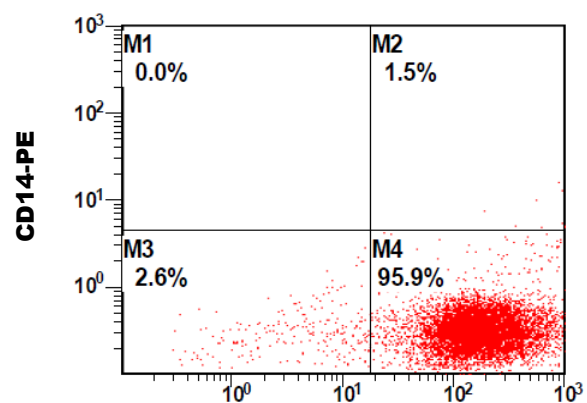
a. CON-FITC



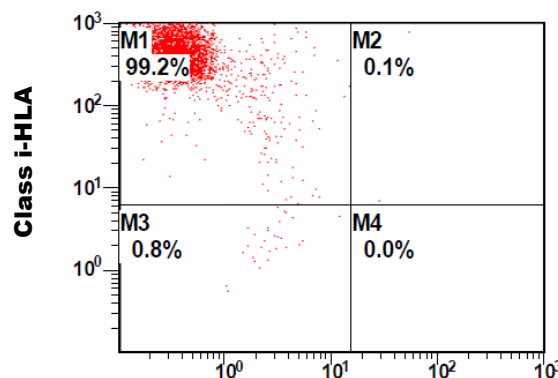
b. CD29-FITC



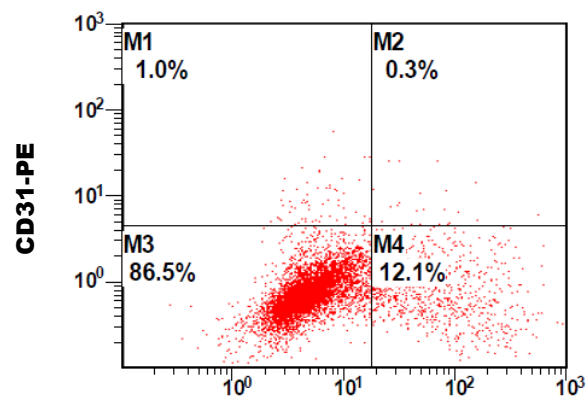
CD44-FITC



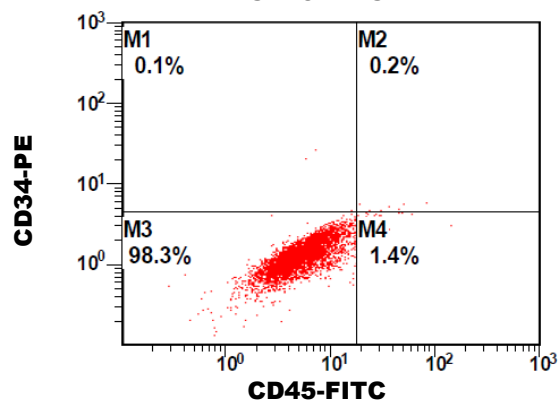
CD105-FITC



CD19-FITC



DR-FITC



CD45-FITC

Εικόνα 3.3. Η κυτταρομετρική ανάλυση έδειξε ότι τα κύτταρα καλλιέργειας εξέφραζαν τους δείκτες CD29, CD90, CD44, CD73, CD105 και Class I – HLA αντιγόνα, ενώ, απουσίαζε η έκφραση των CD14, CD19, CD31, HLA- DR, CD34 και CD45.

3.4. Διαφοροποίηση των ΣΣΚ

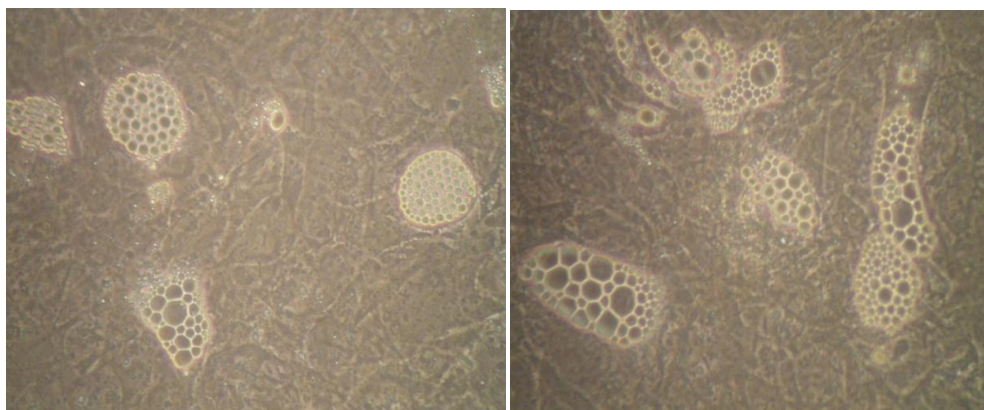
Τα καλλιεργημένα κύτταρα ινοβλαστικής μορφολογίας, με τον ανοσοφαινότυπο που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, διερευνήθηκαν περαιτέρω για την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα.

Η διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα άρχισε να διαφαίνεται τη δεύτερη κιόλας εβδομάδα μετά την έναρξη της καλλιέργειας με το σχηματισμό στο κυτταρόπλασμα μικρών αλλά ευδιάκριτων με το ανάστροφο μικροσκόπιο λιπιδικών σταγονιδίων (Εικόνα 3.4.A). Τα κύτταρα παρέμειναν στην καλλιέργεια μέχρι και 5 εβδομάδες οπότε η απομόνωση του ολικού mRNA και η ανάλυσή του με RT-PCR κατέδειξε την έκφραση του γονιδίου της LPL (Εικόνα 3.4.Γ.).

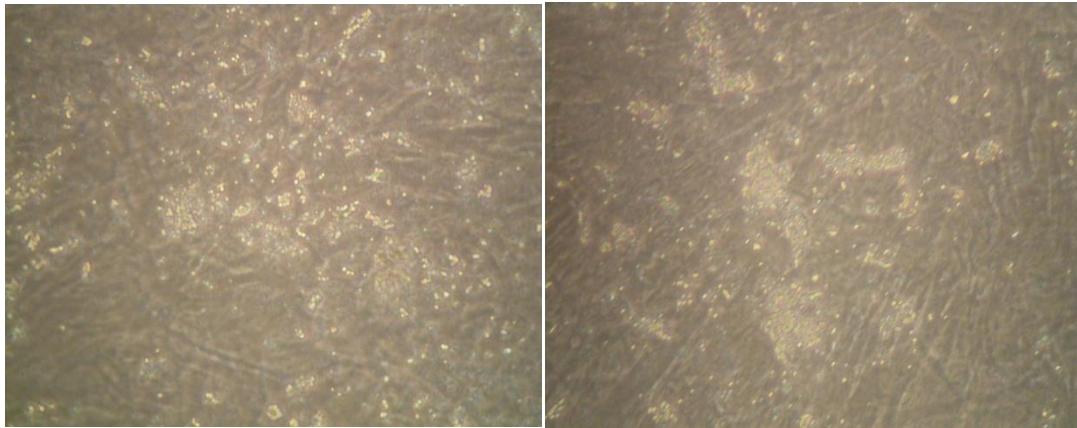
Οι καλλιέργειες διαφοροποίησης σε οστεοκύτταρα ολοκληρώθηκαν σε 7 εβδομάδες οπότε ήταν επαρκώς διακριτά και πάλι με το ανάστροφο μικροσκόπιο καλά σχηματισμένα οστικά οζίδια (Εικόνα 3.4.B). Στο σημείο αυτό επιβεβαιώθηκε και η έκφραση του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης (Εικόνα 3.4.Γ.).

Η διαφοροποίηση σε χονδροκύτταρα ολοκληρώνεται την 21^η ημέρα μετά την έναρξη της καλλιέργειας οπότε και καταδεικνύεται η έκφραση του γονιδίου COL2A1 (Εικόνα 3.4.Γ.).

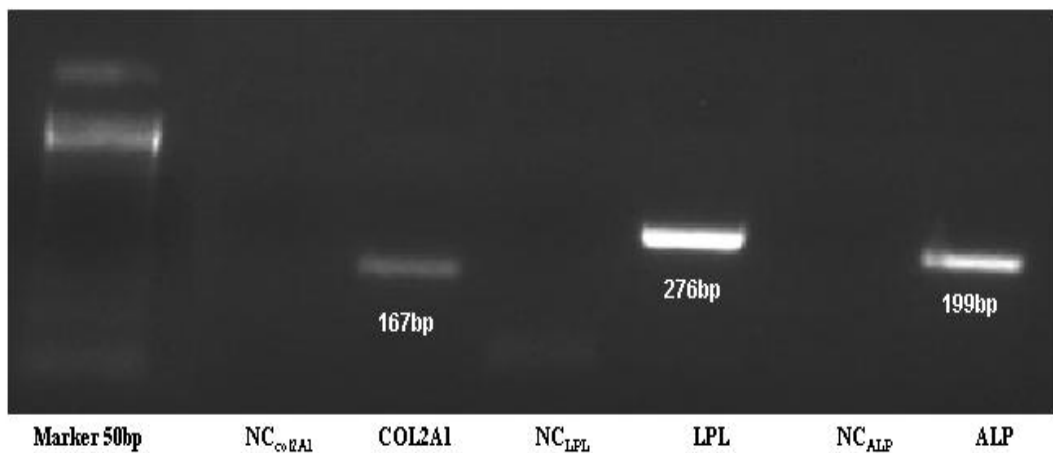
Σε όλες τις περιπτώσεις, ανεξάρτητα και πάλι από τον αρχικό πληθυσμό τον οποίο προέρχονταν ($CD34^+$, $CD105^+$, $CD133^+$, $CD271^+$) και τη χρονική στιγμή κατά την οποία ελέγχθησαν (passage 2, passage 6), τα ΣΣΚ διαφοροποιήθηκαν και στις τρεις παραπάνω κατηγορίες.



Εικόνα 3.4.A. Λιποκύτταρα 5 εβδομάδες μετά την έναρξη της καλλιέργειας, προερχόμενα από $CD34^+$ (αριστερά) και $CD133^+$ κύτταρα (δεξιά).



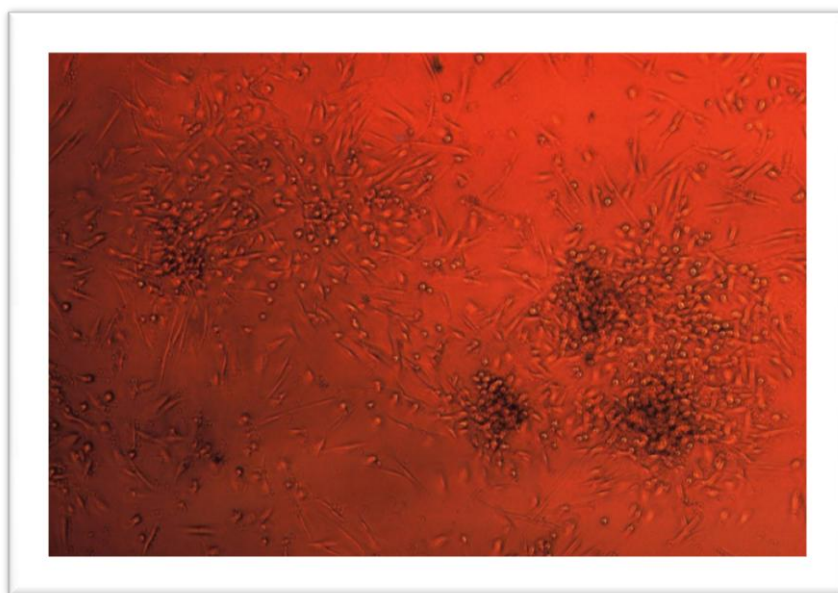
Εικόνα 3.4.Β. Οστεοκύτταρα 7 εβδομάδες μετά την έναρξη της καλλιέργειας, προερχόμενα από CD105⁺ (αριστερά) και CD271⁺ κύτταρα (δεξιά).



Εικόνα 3.4.Γ. Έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου (COL2A1), της λιπάσης της λιποπρωτεΐνης (LPL) και της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), που χαρακτηρίζουν τα χονδροκύτταρα, τα λιποκύτταρα και τα οστεοκύτταρα αντίστοιχα. Ο έλεγχος της έκφρασης πραγματοποιείται με απομόνωση του RNA, RT-PCR και ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε γέλη αγαρόζης 2%. NC:Negative control

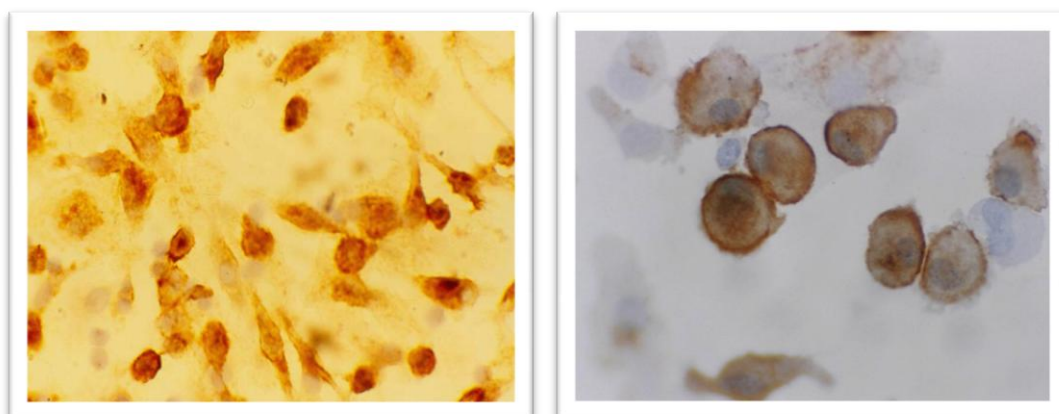
3.5. Διαφοροποίηση σε ενδοθηλιακά κύτταρα

Τρεις έως πέντε ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας των CD34⁺ και CD133⁺ κυτταρικών πληθυσμών στα τρυβλία με φιμπρονεκτίνη, εμφανίζονται στον πυθμένα του καλλιεργητικού μέσου προσκολλημένα κύτταρα βελονοειδούς μορφολογίας. Κατά το τέλος της τρίτης εβδομάδας ο πυθμένας καλύπτεται από αποικίες που απαρτίζονται από άθροισμα στρογγυλών κυττάρων στο κέντρο και μεμονωμένα βελονοειδή κύτταρα στην περιφέρεια (Εικόνα 3.5.Α).



Εικόνα 3.5.A. Αποικίες ενδοθηλιακών κυττάρων 14 ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας

Η *in situ* φαινοτυπική τους μελέτη με την ανοσοκυτταροχημική μέθοδο APAAP αποκάλυψε την έκφραση των δεικτών CD31 και vWF που χαρακτηρίζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 3.5.B.).



Εικόνα 3.5.B. *In situ* ανοσοκυτταροχημική χρώση έναντι του αντιγόνου CD31 (αριστερά) και vWF (δεξιά). Η θετικότητα των αντιδράσεων έναντι των υπό μελέτη αντιγόνων πιστοποιείται από την καφέ χρώση των κυττάρων.

3.6 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα από την απομόνωση και μελέτη των CD34⁺, CD105⁺, CD133⁺ και CD271⁺ κυττάρων του ΜΟ μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- Επιβεβαιώνουν τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν την ύπαρξη προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων στους πληθυσμούς των CD34⁺ και CD133⁺ κυττάρων του ΜΟ.
- Καταδεικνύουν την ύπαρξη ΣΣΚ στον πληθυσμό των CD133⁺ κυττάρων γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από άλλους ερευνητές το ίδιο διάστημα.
- Καταδεικνύουν την ύπαρξη ΣΣΚ και στον πληθυσμό των CD34⁺ κυττάρων, παρά το γεγονός ότι μέχρι τότε δεν υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα που να το αποδεικνύουν.
- Και οι 4 πληθυσμοί αποτελούν πηγές ΣΣΚ που μπορούν να εκπτυχθούν στην καλλιέργεια, σε αριθμό επαρκή για κλινική χρήση.
- Συνολικά, το δυναμικό διαφοροποίησης των υπό μελέτη πληθυσμών απεικονίζεται στον πίνακα 3.6. Η σήμανση υποδεικνύει τη γνώση που αποκτήθηκε από την παρούσα εργασία.
- Για την αντιμετώπιση της GVHD καταλληλότερα φαίνονται να είναι τα ΣΣΚ που προέρχονται από τα CD105⁺ κύτταρα. Οι πληθυσμοί των CD34⁺ και των CD133⁺ εμπεριέχουν και ΑΣΚ, ενώ ο πολλαπλασιασμός των ΣΣΚ από τα CD271⁺ κύτταρα μερικές φορές αναστέλλεται, εξαιτίας της αυτόματης δημιουργίας άλλων κυτταρικών σχηματισμών.
- Για τη θεραπεία ασθενών με χρόνια ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια καταλληλότεροι αποδεικνύονται οι πληθυσμοί των CD34⁺ και των CD133⁺ κυττάρων, αφού εμπεριέχουν τις περισσότερες κατηγορίες ΣΚ.

Πίνακας 3.6 Δυναμικό διαφοροποίησης των πληθυσμών

	CD34	CD105	CD133	CD271
Αιμοποιητικά	+		+	
Ενδοθηλιακά	+		+	
ΣΣΚ	+	+	+	+

3.7 Κλινικές εφαρμογές

3.7.1 Απομόνωση και εξωσωματικός πολλαπλασιασμός αλλογενών ΣΣΚ για την αντιμετώπιση της GVHD

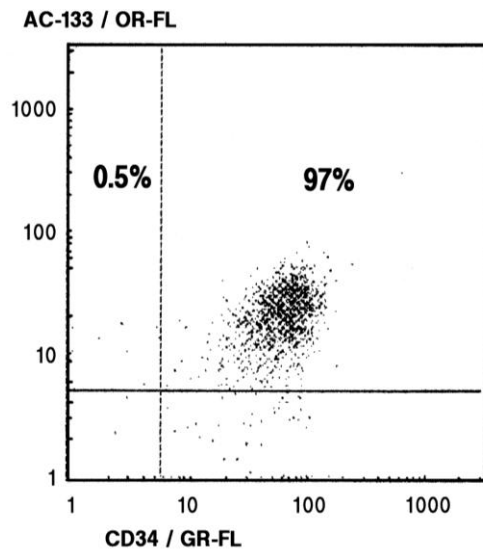
Η απομόνωση των $CD105^+$ κυττάρων από μικρή ποσότητα αλλογενούς ΜΟ (~10ml) και η παραγωγή από αυτά επαρκή αριθμού ΣΣΚ ($\sim 2 \times 10^6$ /Kgr Β.Σ. ασθενούς) που πληρούν τα κριτήρια για την αντιμετώπιση της GVHD (παραγρ. 1.4), αποτελεί πλέον πρακτική του εργαστηρίου της ΜΜΜΟ. Έως σήμερα εκπτυγμένα ΣΣΚ έχουν χορηγηθεί σε 8 ασθενείς (6 παιδιά και 2 ενήλικες). Η μελέτη βρίσκεται υπό εξέλιξη.

3.7.2 Απομόνωση και έγχυση αυτόλογων $CD133^+$ και $CD34^+$ κυττάρων για τη θεραπεία ασθενών με χρόνια ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια

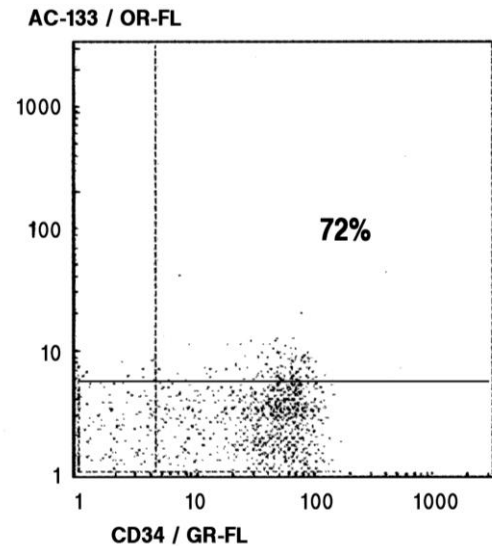
Η διαδικασία της συλλογής του μυελού των οστών διαρκούσε 20 min περίπου και ήταν καλά ανεκτή από όλους τους ασθενείς, παρά την αναρρόφηση μεγάλου όγκου μυελού (310 ± 40 ml), υπό τοπική αναισθησία. Ο μέσος αριθμός εμυρήνων κυττάρων ήταν $38 \pm 5 \times 10^8$, με ποσοστό $0.5 \pm 0.2\%$ $CD133^+$ και $1.2 \pm 0.3\%$ $CD34^+$ επί του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ($CD45^+$) (Εικόνα 3.7.2.B). Ο αριθμός των λεμφομονοκυττάρων μετά το διαχωρισμό με φυκόλη ήταν $9.7 \pm 2.3 \times 10^8$, ενώ ο αριθμός των $CD133^+$ και $CD133^-CD34^+$ κυττάρων μετά τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό ήταν $12.5 \pm 2.3 \times 10^6$ και $5.1 \pm 1.2 \times 10^6$ με καθαρότητα $92 \pm 4.5\%$ και $74.2 \pm 6\%$ (Εικόνα 3.7.2.A) αντιστοίχως. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που χορηγούνταν στους ασθενείς ήταν $17.6 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^6$ (Πίνακας 3.7.2.).

Πίνακας 3.7.2.

Όγκος Μυελού	310 ± 40 ml	
Μέσος αρ. εμυρήνων κυτ.	$38 \pm 5 \times 10^8$	
Μέσος αρ. μονοκυττάρων κυτ.	$9.7 \pm 2.3 \times 10^8$	
	$CD133^+$	$CD133^-CD34^+$
Μέσος αρ. επιλεγμένων κυτ.	$12.5 \pm 2.3 \times 10^6$	$5.1 \pm 1.2 \times 10^6$
Σύνολο κυττάρων	$17.6 \pm 2.3 \times 10^6$	

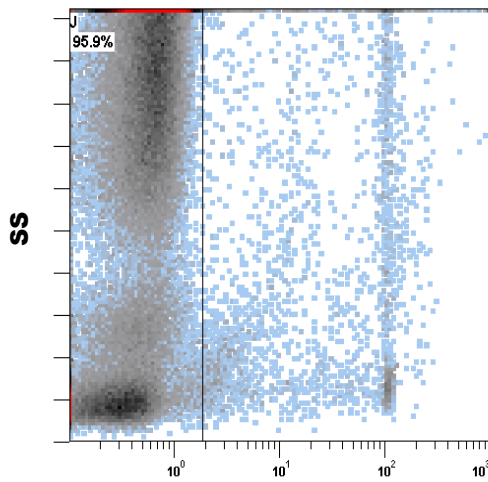


A.

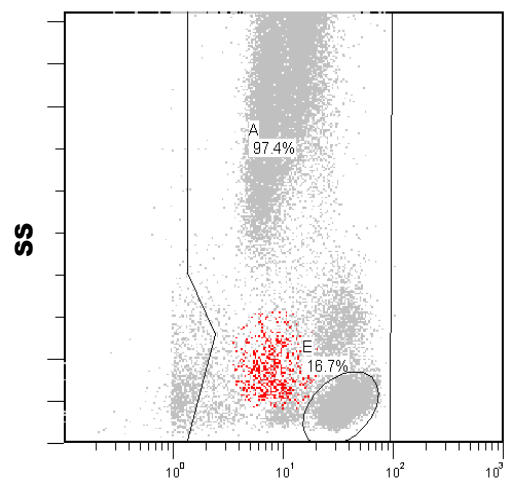


B.

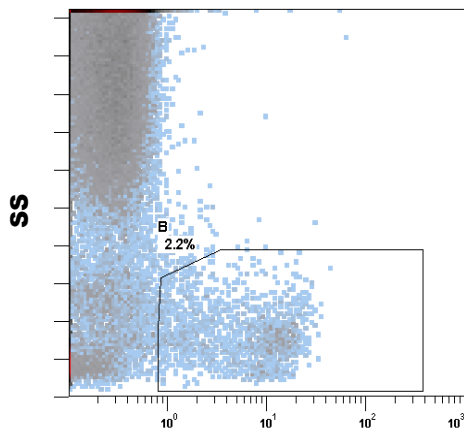
Εικόνα 3.7.2.A. Προσδιορισμός της καθαρότητας των ανοσοεπιλεγμένων κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Αρχικά από το κλάσμα των λεμφομονοκυττάρων του μυελού απομονώνεται ο πληθυσμός των CD133⁺ κυττάρων. Στο συγκεκριμένο δείγμα η καθαρότητά του είναι 97,5%, όπως φαίνεται στην εικόνα A. Στη συνέχεια από το κλάσμα των CD133⁻ απομονώνεται ο πληθυσμός των CD34⁺ με καθαρότητα 72% (Εικόνα B).



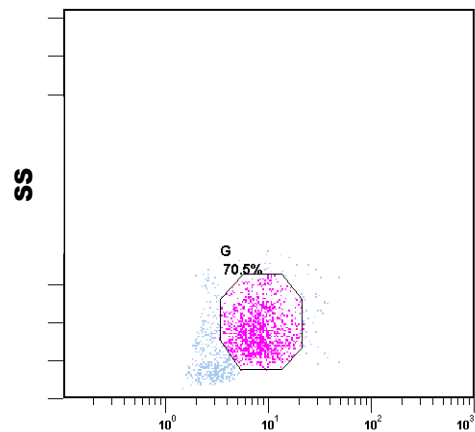
A. 7-AAD



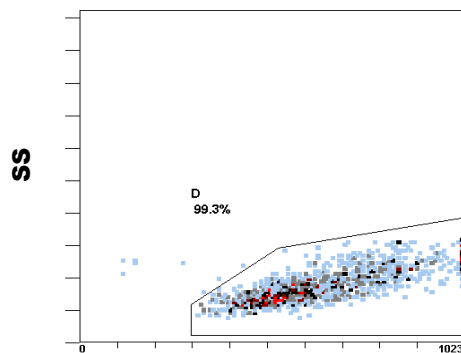
B. CD45-FITC



Γ. CD34-PE



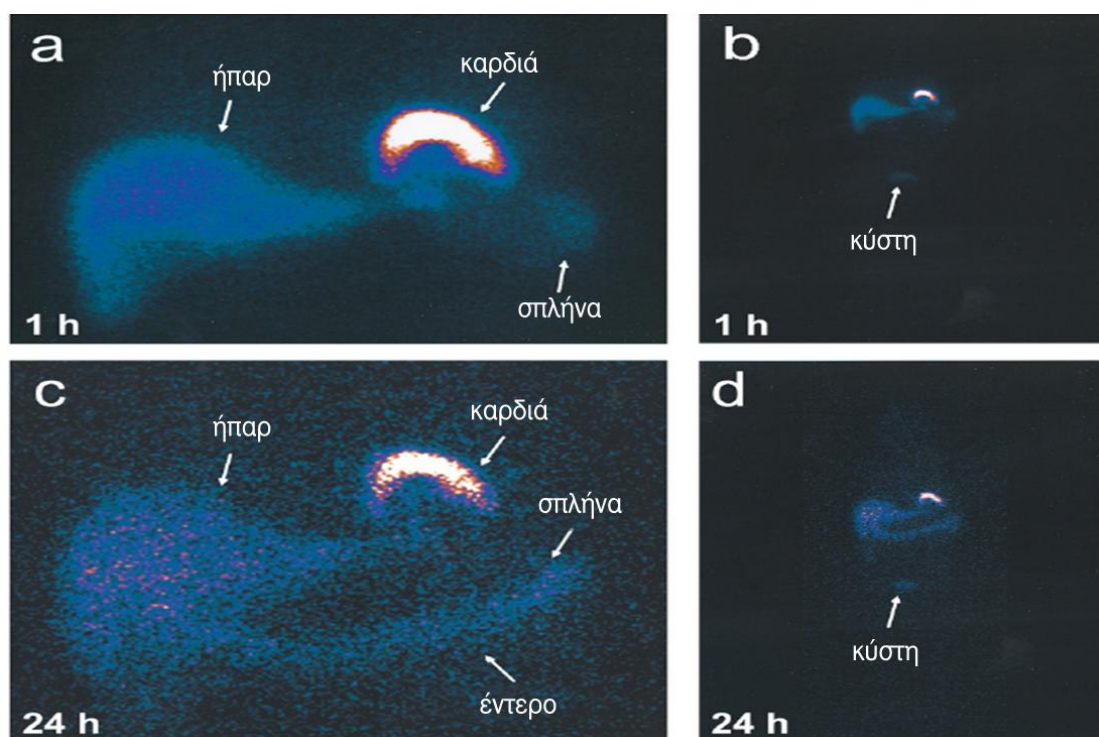
Δ. CD45-FITC



E. FS

Εικόνα 3.7.2.B. Προσδιορισμός του ποσοστού των CD34⁺ κυττάρων σε ένα δείγμα μυελού με κυτταρομετρία ροής **A**. Με την επίδραση της χρωστικής 7-ADD διαχωρίζονται τα ζωντανά (περιοχή J) από τα νεκρά κύτταρα **B**. Η περιοχή J μεταφέρεται στο παρακείμενο στικτόγραμμα στο οποίο διαχωρίζονται τα CD45⁺ (περιοχή A) από τα CD45⁻ κύτταρα και συνεχίζοντας την <<παραθυρική>> στρατηγική **Γ**, **Δ**, **Ε** καταλήγουμε στην απομόνωση των σημάτων των οποίων οι σκεδαστικές ιδιότητες ανταποκρίνονται στο μέγεθος και την κοκκίωση των CD34⁺. Το ποσοστό των τελευταίων στο συγκεκριμένο δείγμα είναι 1,368% επί του συνόλου των CD45⁺ κυττάρων.

Η ενδοστεφανιαία χορήγηση των σημανθέντων με το ραδιοφάρμακο HM-PAO- ^{99m}Tc κυττάρων ήταν καλά ανεκτή, χωρίς επιπλοκές και οι ασθενείς έπαιρναν εξιτήριο 24 ώρες μετά την κυτταρική θεραπεία. Οι σπινθηρογραφικές εικόνες που λαμβάνονταν, 1 και 24 ώρες μετά την έγχυση των κυττάρων, έδειξαν ότι $9.2 \pm 3.6\%$ και $6.8 \pm 2.4\%$ αντιστοίχως της έντασης της ραδιενέργειας εντοπίζονταν στην περιοχή του εμφράγματος. Το υπόλοιπο ποσοστό ανιχνεύονταν στο ήπαρ, στο σπλήνα και στην κύστη (Εικόνα 3.7.2.Γ.). Υψηλή πρόσληψη παρατηρήθηκε και στο έντερο 24h μετά την έγχυση, υποδηλώνοντας την απέκκριση των σημανθέντων κυττάρων.



Εικόνα 3.7.2.Γ. Σπινθηρογραφική απεικόνιση της πρόσληψης των ραδιοσημανθέντων κυττάρων. Μαύρο: μη πρόσληψη. Μπλε – κόκκινο – κίτρινο – άσπρο: αυξημένη πρόσληψη. Πρόσθια λήψη του στήθους και της άνω κοιλίας ενός ασθενούς 1h (a) και 24h μετά την έγχυση (c). Ολόσωμη λήψη 1h (b) και 24h (d) μετά την έγχυση.

Κατά τον επανέλεγχο των ασθενών 6-12 μήνες μετά την κυτταρική θεραπεία, τα κλινικά χαρακτηριστικά της ομάδας στην οποία χορηγήθηκαν τα αυτόλογα CD133⁺ και CD133⁻CD34⁺ κύτταρα και της ομάδας των μαρτύρων, δε διέφεραν σημαντικά. Παρατηρήθηκε όμως:

- βελτίωση της πρόσληψης Tl-201 από το αρχικά μη βιώσιμο μυοκάρδιο
- βελτίωση του κλάσματος εξώθησης σε κατάσταση ηρεμίας από $25.12 \pm 7.18\%$ αρχική τιμή σε $28 \pm 7.26\%$ κατά τη στιγμή του επανέλεγχου, $p=0.044$.
- μείωση του τελοσυστολικού όγκου από 156.5 ± 40.5 αρχική τιμή σε 142.3 ± 38.5 , $p=0.05$
- μείωση του τελοδιαστολικού όγκου από 230.3 ± 45 αρχική τιμή σε 219.8 ± 37.8 , $p=0.01$
- βελτίωση της μυοκαρδιακής ταχύτητας και ιστικής ροής στην περιοχή του μυοκαρδίου χωρίς βιωσιμότητα

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ύπαρξη ενός κοινού ΣΚ και για τα δύο κυτταρικά συστήματα του μυελού των οστών –αιμοποιητικό και σύστημα των κυττάρων του στρώματος- υποστηρίχθηκε από αρκετές μελέτες από τις αρχές σχεδόν του περασμένου αιώνα (*Maximow, 1924; Hamilton et al, 1945; Singer et al, 1984; Islam, 1985; Islam et al, 1988; Huang & Terstappen, 1992*). Όσο όμως ελκυστική και αν είναι αυτή η υπόθεση δεν έχει εδραιωθεί μέχρι σήμερα. Αντιθέτως, άλλες μελέτες αντικρούουν τον παραπάνω ισχυρισμό αφού αδυνατούν να εντοπίσουν έναν κυτταρικό τύπο στο μυελό των οστών που να έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιηθεί και προς τις δύο κατευθύνσεις, στο επίπεδο του ενός κυττάρου (*Huang & Terstappen, 1994; Waller et al, 1995*).

Πολλοί ερευνητές τα τελευταία χρόνια έδειξαν ότι κύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να συνεισφέρουν στην αναγέννηση ποικίλων ιστών και οργάνων (*Petersen et al, 1999; Makino et al, 1999; Lagasse et al, 2000; Jackson et al, 2001; Orlic et al, 2001; Rideout et al, 2001; Buzanska et al, 2002; Corti, 2002a; Corbel et al, 2003; Hess et al, 2003; Pesce et al, 2003; Di Campli et al, 2004*). Οι παρατηρήσεις αυτές ερμηνεύτηκαν κυρίως με την υπόθεση της πλαστικότητας των ΣΚ του μυελού των οστών, της δυνατότητάς τους δηλαδή για μεταδιαφοροποίηση σε ΣΚ διαφορετικής αναπτυξιακής κατεύθυνσης (*Mezey et al, 2000*). Η υπόθεση αυτή φαινόταν συναρπαστική και σκόρπισε ενθουσιασμό στους κόλπους της επιστημονικής κοινότητας. Το ενδεχόμενο ο ΜΟ, το κινητοποιημένο περιφερικό αίμα και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα να αποτελούν πηγή ΣΚ για την επιδιόρθωση και αναγέννηση ιστών και οργάνων, διάνοιξε νέους ελπιδοφόρους ορίζοντες, όχι μόνο για τη θεραπεία μεγάλου αριθμού παθήσεων του ανθρώπου, αλλά και για την επίτευξη μακρότερου προσδόκιμου επιβιώσεως, παράλληλα με καλύτερη ποιότητα ζωής. Όμως, τις αρχικές, πολλά υποσχόμενες μελέτες, ακολούθησαν άλλες που αδυνατούσαν να επιβεβαιώσουν την ικανότητα μεταδιαφοροποίησης των ΣΚ του ΜΟ (*Castro et al, 2002; Murry et al, 2004*). Έτσι, προτάθηκαν εναλλακτικές ερμηνείες προκειμένου να εξηγηθεί το φαινόμενο της πλαστικότητας (παράγρ. 1.2.7). Μια από αυτές είναι και η πιθανότητα ο ΜΟ να περιέχει εκτός από τα ΑΣΚ και άλλους ετερογενείς πληθυσμούς ΣΚ. Το ενδεχόμενο αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι το σύστημα των κυττάρων του στρώματος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια και ως εκ τούτου θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι εμπεριέχει διάφορα μονοδύναμα ΣΚ δεσμευμένα προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση ή ακόμα και πιο αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα ικανά να δημιουργήσουν ιστούς και των τριών βλαστικών

δερμάτων. Παραδόξως όμως στην εκδοχή αυτή δε δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή αν και υπήρχαν πειραματικά ευρήματα που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την υιοθέτησή της. Στον ανθρώπινο ΜΟ πληθυσμοί ΣΣΚ όπως οι MAPCs, MIAMI και hBMSCs διαθέτουν ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των πολυδύναμων ΣΚ και γι αυτό θεωρείται πιθανό να εμπεριέχουν όντως τέτοιους μονοδύναμους ή/και αδιαφοροποίητους πολυδύναμους κυτταρικούς τύπους που μετανάστευσαν στο ΜΟ κατά τις όψιμες φάσεις της εμβρυογένεσης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση ιστών και οργάνων (Kucia et al, 2006; Kucia et al, 2007; Ratajczak et al, 2007). Ωστόσο δεν έχει διαλευκανθεί η ακριβής σχέση των παραπάνω πληθυσμών. Εάν δηλαδή πρόκειται για εντελώς διακριτούς κυτταρικούς πληθυσμούς ή όχι. Πιθανόν οι διάφοροι ερευνητές χρησιμοποιώντας διαφορετικές στρατηγικές απομόνωσης και καλλιέργειας των κυττάρων στο εργαστήριο να περιέγραψαν τελικά τον ίδιο αρχικό πληθυσμό δίνοντάς του διαφορετικές ονομασίες σύμφωνα με τις περιστάσεις. Όμως, παρά την υπάρχουσα σύγχυση όσον αφορά την ταυτότητα των συγκεκριμένων πληθυσμών, αλλά και το σύνολο των ΣΣΚ, με αφορμή τα παραπάνω, οι επιστήμονες άρχισαν να επανεκτιμούν την εναλλακτική αυτή ερμηνεία της πλαστικότητας που επιδεικνύουν τα ΣΚ του ΜΟ. Ερμηνεία που όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.2.7. ουσιαστικά καταργεί την έννοια της πλαστικότητας. Ωστόσο οριστική απάντηση δεν έχει δοθεί.

Ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι ενός κοινού ΣΚ, αλλά και από τη σχέση των διαφόρων πληθυσμών ΣΣΚ που έχουν απομονωθεί στο εργαστήριο, αρχικά υπήρχε η πεποίθηση ότι τα δύο κυτταρικά συστήματα του ΜΟ προέρχονταν από διακριτούς πληθυσμούς που με τη χρήση απλών τεχνικών μπορούσαν εύκολα να διαχωριστούν μεταξύ τους. Έχοντας εντοπίσει ορισμένα αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των ΣΣΚ και άλλα στην επιφάνεια των ΑΣΚ, επικράτησε η μέθοδος της θετικής ή αρνητικής ανοσομαγνητικής επιλογής προκειμένου να επιτευχθεί η απομόνωση πιο ομοιογενών πληθυσμών ΣΣΚ μη επιμολυσμένων με ΑΣΚ (Πίνακας 1.2.5.).

Στο εργαστήριό μας μελετήσαμε δύο χαρακτηριστικούς πληθυσμούς ΣΣΚ ($CD105^+$ και $CD271^+$) και δύο ΑΣΚ ($CD34^+$ και $CD133^+$). Στόχος μας ήταν αφενός η παραγωγή εξωσωματικά εκπτυγμένων ΣΣΚ σε αριθμό τέτοιο που να επιτρέπει την κλινική χρήση (αντιμετώπιση της GVHD σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών) και αφετέρου, η επιλογή του καταλληλότερου πληθυσμού για τη θεραπεία ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.

Όσον αφορά στην GVHD, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι και οι δύο πληθυσμοί, CD105⁺ και CD271⁺ αναπτύσσονται κατά παρόμοιο τρόπο στην καλλιέργεια, δίνοντας σε εύλογο χρονικό διάστημα, επαρκή αριθμό ΣΣΚ, απαλλαγμένων από αιμοποιητικά κύτταρα, εκπληρώνοντας έτσι και τα τρία κριτήρια που αρχικά τέθηκαν (παραγρ. 1.4.) προκειμένου τα παραγόμενα κύτταρα να μπορούν να χορηγηθούν σε ασθενείς. Όμως, η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε σε ένα δείγμα CD271⁺ κυττάρων, με την αυτόματη δημιουργία ποικιλόμορφων κυτταρικών σχηματισμών (νευρόσφαιρες) και την αναστολή του περαιτέρω πολλαπλασιασμού των ΣΣΚ, μας ώθησε στην επιλογή του CD105⁺ πληθυσμού, προκειμένου να λαμβάνουμε αριθμό ΣΣΚ επαρκή για κλινική χρήση (Goussetis *et al*, 2005; Spiropoulos *et al*, 2011).

Μέχρι σήμερα στο εργαστήριο της MMMO έχουν παραχθεί και χορηγηθεί εξωσωματικά εκπτυγμένα ΣΣΚ σε 8 ασθενείς (6 παιδιά και 2 ενήλικες), που είχαν υποστεί αλλογενή μεταμόσχευση ΜΟ και υπέφεραν από ανθεκτική GVHD. Η μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη.

Η καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί μείζονα αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στις δυτικές κοινωνίες και σημαντικό οικονομικό φορτίο στα περισσότερα συστήματα υγείας. Αναπτύσσεται όταν ένας ικανός αριθμός καρδιομυοκυττάρων χαθεί (π.χ. εξαιτίας μιας ισχαιμικής βλάβης του μυοκαρδίου) και δεν αναπληρωθεί από τα τοπικά ΣΚ. Αν και υπάρχουν μερικές ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι τα καρδιομυοκύτταρα μπορούν να πραγματοποιήσουν μιτωτικές διαιρέσεις και ως εκ τούτου διαθέτουν κάποια αναγεννητική ικανότητα (Kajstura *et al*, 1998), η κοινώς αποδεκτή άποψη στη σύγχρονη καρδιολογία, είναι ότι πολλαπλασιάζονται μέχρι τη στιγμή της γέννησης ενός ατόμου και επομένως δεν μπορούν να συμβάλλουν στην αναγέννηση του μυοκαρδίου που έχει υποστεί βλάβη (Soonpa *et al*, 1996). Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί, όσον αφορά στις διάφορες θεραπευτικές μεθόδους (φαρμακευτική θεραπεία, χειρουργικές επεμβάσεις, συστήματα μηχανικής υποβοήθησης της καρδιάς και στον τομέα των μεταμοσχεύσεων), περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια πεθαίνουν σε διάστημα πέντε ετών από την αρχική διάγνωση.

Την τελευταία δεκαετία έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες *in vitro* αλλά και *in vivo*, σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο οι οποίες προτείνουν τη τοπική κυτταρική θεραπεία ως μια εναλλακτική και εντυπωσιακή θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση της ισχαιμικής βλάβης του μυοκαρδίου και της καρδιακής

ανεπάρκειας. Μια τέτοια θεραπεία μπορεί να αποδειχθεί αποτελεσματική εάν α) προμηθεύει μια ανανεώσιμη πηγή από πολλαπλασιαζόμενα και λειτουργικά καρδιομυοκύτταρα και β) συνεισφέρει στην ανάπτυξη δικτύου αιμοφόρων αγγείων τα οποία θα υποστηρίζουν τα νεοσχηματιζόμενα καρδιομυοκύτταρα αλλά και το περιβάλλον ισχαιμικό μυοκάρδιο (*Psaltis et al, 2008*).

Ο μυελός των οστών μπορεί εύκολα να συλλεχθεί και να μεταμοσχευθεί στο ίδιο άτομο χωρίς ηθικά διλλήματα και κίνδυνο απόρριψης. Γι' αυτό και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες κλινικές μελέτες ως πηγή ΣΚ. Πολλοί ερευνητές επέλεξαν να χορηγήσουν τα μονοπύρηννα κύτταρα, που λαμβάνονται μετά από φυγοκέντρηση σε φυκόλη, ή ακόμα και το σύνολο των κυττάρων του μυελού χωρίς κανένα διαχωρισμό, σε ασθενείς μετά από πρόσφατο έμφραγμα του μυοκαρδίου (*Strauer et al, 2002; Assmus et al, 2002; Wollert et al, 2004*) και ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια (*Perin et al, 2003; Strauer et al, 2005*). Μετα-αναλύσεις έχουν καταδείξει ότι η θεραπευτική αυτή αντιμετώπιση αφενός μπορεί να πραγματοποιηθεί με ασφάλεια και αφετέρου να οδηγήσει σε κάποια ευεργετικά αποτελέσματα όσον αφορά στις φυσιολογικές και ανατομικές καρδιακές παραμέτρους, περισσότερο από τις συμβατικές θεραπείες (*Abdel-Latif et al, 2007; Lipinski et al, 2007*). Παρόλα αυτά, πριν γενικευτεί η κλινική τους χρήση οι ακόλουθοι παράμετροι θα πρέπει να ληφθούν υπόψη: 1) ο ολικός μυελός ή ακόμα και το κλάσμα των μονοπύρηννων κυττάρων εμπεριέχουν πολλούς τύπους στελεχιαίων και προγονικών κυττάρων ο ρόλος των οποίων δεν είναι γνωστός μετά την εγκατάστασή τους στο μυοκάρδιο που έχει υποστεί βλάβη 2) ο αριθμός των κυττάρων με γνωστή ευεργετική δράση όπως τα $CD34^+$, $CD133^+$ και τα ΣΣΚ είναι πολύ μικρός και 3) οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι είναι πιθανόν να ανταγωνίζονται για την εγκατάστασή τους στο μυοκάρδιο με αποτέλεσμα η καθήλωση αυτών που αποδεδειγμένα ωφελούν να είναι μειωμένη (*Bartunek et al, 2005*). Για τους παραπάνω λόγους, η χρησιμοποίηση πιο ομοιογενών κυτταρικών πληθυσμών, δίνει την ευκαιρία στους ερευνητές να εντοπίσουν τον/τους κυτταρικούς τύπους που είναι πιο αποτελεσματικοί στην επιδιόρθωση του μυοκαρδίου, ενώ παράλληλα αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης τους και του *in vivo* διαφοροποιητικού τους δυναμικού. Επιπλέον, μπορεί να δώσει πληροφορίες που να βοηθήσουν στην κατανόηση της όποιας συσχέτισης των πληθυσμών αυτών και στην αποκάλυψη μιας ιεραρχίας που πιθανόν να υπάρχει στο διαμέρισμα των ΣΚ του μυελού των οστών.

Ο Krause και οι συνεργάτες του έδειξαν στο ποντίκι ότι ένα και μόνο ΑΣΚ μπορεί αφενός να αναπλάσει το μυελό και το αιμοποιητικό σύστημα θανάσιμα ακτινοβολημένου πειραματόζωου και αφετέρου να διαφοροποιηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος, του πνεύμονα, του γαστρεντερικού σωλήνα και του δέρματος (Krause et al, 2001). Παράλληλα, ο Orlic και οι συνεργάτες του έδειξαν, επίσης στο ποντίκι, ότι τα ΑΣΚ συμβάλλουν στην αναγέννηση του μυοκαρδιακού ιστού μέσω διαφοροποίησης τους σε μυοκύτταρα και αγγειακές δομές. Τα ΑΣΚ είτε κινητοποιούνται από το μυελό των οστών στο περιφερικό αίμα, με τη χορήγηση αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων όπως ο SCF (Stem Cell Factor) και ο G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) (Orlic et al, 2001), είτε εγχέονται απευθείας στην εμφραγματική περιοχή (Orlic et al, 2001).

Ακολούθησε μια σειρά εργαστηριακών και προκλινικών μελετών που κατέδειξε ότι η χρησιμοποίηση αυτόλογων $CD34^{+}$ και $CD133^{+}$ κυττάρων ήταν ασφαλής και αποτελεσματική όσον αφορά στην νεοαγγείωση του χρόνια ισχαιμικού μυοκάριου (Kocher et al, 2001; Kawamoto et al, 2006; Agbulut et al, 2004; Ma et al, 2006). Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτά αλλά και στη διαθεσιμότητα εμπορικού συστήματος που εξασφάλιζε εύκολα την απομόνωση των παραπάνω πληθυσμών από τους ασθενείς, σύμφωνα με GMP συνθήκες (Good Manufacturing Practices), οι ερευνητές πραγματοποίησαν τις πρώτες κλινικές μελέτες με τους συγκεκριμένους κεκαθαρμένους πληθυσμούς (Patel et al, 2005; Fuchs et al, 2006; Losordo et al, 2007; Stamm et al, 2003; Stamm et al, 2007; Bartunek et al, 2005).

Στον άνθρωπο τα παραπάνω αντιγόνα εκφράζονται στα αιμοποιητικά στελεχιαία και προγονικά κύτταρα (Gabbianelli et al, 1990; Yin et al, 1997; Miraglia et al, 1997). Οι αντίστοιχοι πληθυσμοί μπορούν να αποκαταστήσουν το αιμοποιητικό σύστημα ασθενών που έχουν υποβληθεί σε μυελοεκκενωτικό σχήμα, γι αυτό και η επιλογή και μεταμόσχευσή τους –αυτόλογη ή αλλογενής - αποτελεί εδώ και αρκετά χρόνια θεραπεία εκλογής για ποικίλα νεοπλασματικά και μη νοσήματα (Handgretinger et al, 2001; Flohr et al, 2002; Lang et al, 2003; Koehl et al, 2002; Gordon et al, 2003). Επιπλέον είναι γνωστό ότι χαρακτηρίζουν και τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (ΠΕΚ) (Asahara et al, 1997; Gehling et al, 2000; Quirici et al, 2001; Reyes et al, 2002;) που αποτελούν μέρος του στρώματος του μυελού των οστών και τα οποία επίσης είναι ικανά να συμβάλλουν στην αγγειογένεση οργάνων που έχουν υποστεί βλάβη (Shi et al, 1998; Takahashi et al, 1999; Shintani et al, 2001; Kawamoto et al, 2001). Τέλος, πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα $CD34$ και

CD133 αντιγόνα εκφράζονται και σε ένα ιδιαίτερα σπάνιο κυτταρικό τύπο του μυελού των οστών, την αιμαγγειοβλάστη. Η αιμαγγειοβλάστη είναι ο κοινός πρόγονος των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων και αρχικά υπήρχε η άποψη ότι η ύπαρξή της περιοριζόταν στα πρώιμα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης. Η άποψη όμως αυτή έχει αναθεωρηθεί αφού με βάση τα νεώτερα δεδομένα η αιμαγγειοβλάστη συνεχίζει να υπάρχει και στην ενήλικη ζωή (*Pelosi et al, 2002; Schatteman & Awad, 2004*).

Άλλοι ερευνητές, επέλεξαν τη χορήγηση αυτόλογων καλλιεργημένων ΣΣΚ στις νεκρωμένες περιοχές του μυοκαρδίου, βασισμένοι σε αποτελέσματα χορήγησης τέτοιων κυττάρων σε πειραματόζωα (παράγραφ. 1.3.3.).

Έχοντας λοιπόν υπόψη τα παραπάνω και με δεδομένο το γεγονός, ότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης των ΣΚ του ΜΟ, όσον αφορά στην αναγέννηση του μυοκαρδίου, δεν είναι αποσαφηνισμένος, θεωρήσαμε ότι για τη διάσωση εμφραγματικών περιοχών θα έπρεπε καταρχήν να επιλέξουμε έναν πληθυσμό κατά το δυνατόν ομοιογενή, αποκλείοντας τη χορήγηση ολικού ΜΟ ή ακόμα και το κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων, ούτως ώστε: α) να μειωθεί στο ελάχιστο η πιθανότητα επιπλοκών λόγω αυξημένου όγκου ή/και αυξημένης συγκέντρωσης κυττάρων κατά την ενδοστεφανιαία έγχυση β) το ενιέμενο προϊόν να είναι κατά το δυνατόν εμπλουτισμένο σε κύτταρα που με βάση τα ως τότε *in vitro* και *in vivo* δεδομένα να μπορούν να συμβάλλουν στη μυοκαρδιακή αναγέννηση και γ) με τη χορήγηση σχετικά ομοιογενούς κυτταρικού πληθυσμού να είναι δυνατή η ακριβέστερη αξιολόγηση του ενδεχόμενου θεραπευτικού αποτελέσματος. Έτσι το ερώτημα εντοπίστηκε στο εξής: ΑΣΚ ή ΣΣΚ;

Το διάστημα εκείνο είχαν αρχίσει να δημοσιεύονται μελέτες οι οποίες έδειχναν ότι από τον πληθυσμό των CD133⁺ κυττάρων προέκυπτε *in vitro* πληθυσμός CD133⁺CD34⁻ ιδιαίτερος εμπλουτισμένος σε κύτταρα ικανά να αποκαταστήσουν το αιμοποιητικό σύστημα ακτινοβολημένων NOD/SCID ποντικών. Παράλληλα, τα μεταμοσχευμένα ανθρώπινα κύτταρα ανευρίσκονταν και σε άλλα όργανα των ποντικών όπως στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στην καρδιά, στο έντερο, κ.α., υποδεικνύοντας ότι ο συγκεκριμένος πληθυσμός μπορεί τελικά να εμπεριέχει πολυδύναμο διαφοροποιητικό δυναμικό, αφού πέραν των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων, έδινε γένεση σε κύτταρα και των τριών βλαστικών δερμάτων (*Handgretinger et al, 2003; Kuci et al, 2003*).

Βασιζόμενοι στις ενδείξεις αυτές αποφασίσαμε να ελέγξουμε *in vitro* εάν ο πληθυσμός των CD133⁺ κυττάρων εμπεριέχει και ΣΣΚ. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επιβεβαίωσαν την αρχική μας σκέψη, αφού τοποθετώντας τα απομονωμένα CD133⁺ σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό διαπιστώσαμε την ανάπτυξη προσκολλημένων κυττάρων με μορφολογία, ανοσοφαινότυπο, πολλαπλασιαστικό δυναμικό και διαφοροποιητικές ιδιότητες, όμοιες με αυτές που χαρακτηρίζουν τα ΣΣΚ που προέρχονται από πληθυσμούς όπως οι CD105⁺ και CD271⁺. Αργότερα το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες (*Pozzobon et al, 2009*).

Τα αποτελέσματά μας σε συνδυασμό με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας που υποστήριζαν την πολυδυναμία των CD133⁺CD34⁻, τοποθετούσαν τον πληθυσμό των CD133⁺ σε αρκετά υψηλή θέση στην ιεραρχία των ΣΚ του ΜΟ, αφού έδειχνε να εμπεριέχει πολύ πρώιμα κύτταρα, προγονικά, τόσο των ΑΣΚ όσο και των ΣΣΚ. Αντιθέτως, για τον πληθυσμό των CD34⁺ κυττάρων δεν υπήρχαν παρόμοια ευρήματα. Το δυναμικό του φαινόταν να περιορίζεται στην κατεύθυνση των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων, αφού, οι έως τότε ερευνητικές προσπάθειες δεν είχαν επιτύχει τον εντοπισμό ΣΣΚ στο κυτταρικό αυτό διαμέρισμα. Με σκοπό την περαιτέρω επιβεβαίωση των υπαρχόντων δεδομένων, θελήσαμε, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων διερεύνησης του πληθυσμού CD133⁺, να τοποθετήσουμε στο ίδιο καλλιεργητικό υλικό και το σύνολο των CD133⁻CD34⁺ κυττάρων, που εναπομένει μετά την απομόνωση των CD133⁺. Παρά τη βεβαιότητά μας ότι ο συγκεκριμένος πληθυσμός δε θα μπορούσε να αναπτυχθεί σε συνθήκες καλλιέργειας ΣΣΚ, πολύ γρήγορα παρατηρήσαμε την ανάπτυξη προσκολλημένων κυττάρων ινοβλαστικής μορφολογίας.

Κατόπιν αυτού, προχωρήσαμε στην απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων από το ΜΟ, η τοποθέτηση των οποίων στο συγκεκριμένο καλλιεργητικό υλικό είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη πληθυσμού, που όπως και στην περίπτωση των CD133⁺ κυττάρων, η μορφολογία, ο ανοσοφαινότυπος, το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και οι διαφοροποιητικές ιδιότητές τους, μας επέτρεψαν να τα χαρακτηρίσουμε ως ΣΣΚ.

Το εύρημα αυτό αναθεωρούσε την άποψη για τη θέση που κατείχε ο πληθυσμός των CD133⁺ κυττάρων στο ΜΟ. Οι πληθυσμοί των CD133⁺ και CD34⁺ κυττάρων δε φαίνεται να διαφέρουν ως προς το δυναμικό τους αφού και οι δύο είναι ικανοί να δώσουν γένεση σε αιμοποιητικά, ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα. Αν αυτό σημαίνει ότι υπάρχει στο ΜΟ ένας πολύ πρώιμος κυτταρικός τύπος, που αποτελεί τον

κοινό πρόγονο και των τριών ειδών κυττάρων που αναφέρθησαν, εκφράζοντας ταυτόχρονα και τα δύο αντιγόνα (CD133 και CD34), ή οι πρόγονοι των παραπάνω (αιμαγγειοβλάστη και ΣΣΚ) είναι διακριτές οντότητες που συνεκφράζουν κοινά μόρια δεν είναι αποσαφηνισμένο. Χρειάζονται πειράματα σε κυτταρικό επίπεδο προκειμένου να αποδειχτεί ότι ένα και μόνο κύτταρο μπορεί να διαφοροποιηθεί και προς τις τρεις κατευθύνσεις. Όσον αφορά τον πληθυσμό των $CD133^+CD34^-$ κυττάρων, τα ευρήματα που υποστήριξαν την ύπαρξη πολυδύναμου διαφοροποιητικού δυναμικού και την ενδεχομένη πρακτική αξία του μένει να επιβεβαιωθούν περαιτέρω. Όμως, ανεξάρτητα από το τι τελικά ισχύει, τα αποτελέσματά μας αυτά κατέδειξαν ότι τα δύο κυτταρικά συστήματα του ΜΟ, το σύστημα των αιμοποιητικών-ενδοθηλιακών κυττάρων και το σύστημα των κυττάρων του στρώματος, διαθέτουν ορισμένα κοινά αντιγονικά χαρακτηριστικά, χάρη στα οποία μας παρέχεται η δυνατότητα να απομονώνουμε ΣΚ, που εύκολα μπορούν να εκπτυχθούν και να διαφοροποιηθούν αναπαράγοντας και τα δύο συστήματα. Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη αξία αν λάβουμε υπόψη ότι για τους συγκεκριμένους πληθυσμούς υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο, αξιόπιστο και ευρέως διαδεδομένο σύστημα ανοσομαγνητικής επιλογής, όχι μόνο για *in vitro* αλλά και για κλινική χρήση.

Τα παραπάνω δεδομένα ακύρωναν το δίλλημα που υπήρξε αρχικά, ΑΣΚ ή ΣΣΚ για την αντιμετώπιση ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, αφού οι πληθυσμοί των $CD34^+$ και $CD133^+$ κυττάρων εμπεριέχουν και τις δύο κατηγορίες. Έτσι, αποφασίσαμε την επιλογή όλων εκείνων των ΣΚ που διαθέτουν αιμοποιητικό, ενδοθηλιακό και μεσεγχυματικό δυναμικό, απομονώνοντας πρώτα τα $CD133^+$ και στη συνέχεια τα $CD34^+$ από το κλάσμα των εναπομεινάντων $CD133^-CD34^+$ κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό το κυτταρικό κλάσμα που τελικά χορηγούνταν στους ασθενείς ήταν σχετικά ομοιογενές, απαλλαγμένο από κυτταρικούς τύπους με αμφίβολη ή ακόμα και ανασταλτική δράση, ενώ ταυτόχρονα περιείχε όλα εκείνα τα προγονικά κύτταρα που ήταν γνωστό ότι δρούσαν ευεργετικά στην αναγέννηση του μυοκαρδίου. Επιπλέον, ο αριθμός των χορηγούμενων κυττάρων ($17.6 \pm 2.3 \times 10^6$) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος, σε σχέση με άλλες μελέτες, όπως αυτή των Bartunec και συν. που είχαν επιλέξει έναν μόνο από τους παραπάνω πληθυσμούς ($12.6 \pm 2.2 \times 10^6$ $CD133^+$), ενισχύοντας έτσι την πιθανότητα για καλύτερο αποτέλεσμα (Bartunec et al, 2005).

Η διαδοχική απομόνωση των $CD133^+$ και $CD34^+$ κυττάρων δε σημαίνει ότι εξασφαλίζει την πλήρη ανάκτηση των ΑΣΚ και ΣΣΚ από το ΜΟ. Αντιθέτως, η

ανάπτυξη προσκολλημένων κυττάρων ινοβλαστικής μορφολογίας που παρατηρήθηκε μετά την τοποθέτηση στις ίδιες καλλιεργητικές συνθήκες και του κλάσματος των CD133⁺CD34⁺ κυττάρων, υποδηλώνει την ύπαρξη υπολοίπων ΣΣΚ, χωρίς όμως να διερευνηθεί περισσότερο το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους. Παρόλα αυτά, ο περαιτέρω εμπλουτισμός των χορηγηθέντων στον ασθενή κυττάρων, με την απομόνωση πληθυσμών όπως οι CD105⁺ ή CD271⁺ από το παραπάνω κλάσμα, δε είναι τεχνικά εφικτή.

Η κλινική μελέτη που ακολούθησε έδειξε ότι η συλλογή μεγάλου όγκου ΜΟ υπό τοπική αναισθησία, η *in vitro* απομόνωση των συγκεκριμένων πληθυσμών και η ενδοστεφανιαία χορήγησή τους στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια είναι εφικτή και ασφαλής. Με τη χρήση του ραδιοφαρμάκου HM-PAO-99^mTc και τις σπινθηρογραφικές εικόνες που λαμβάνονταν 1 και 24 ώρες μετά την έγχυση διαπιστώθηκε ότι περίπου 10% και 7% αντιστοίχως των χορηγουμένων κυττάρων εντοπίζονταν στην περιοχή του ουλοποιημένου μυοκαρδίου. Ο αριθμός των προγονικών κυττάρων που αντιστοιχεί στα ποσοστά αυτά (1.6×10^6 περίπου, 1 ώρα μετά την έγχυση) είναι αρκετά σημαντικός, αν λάβουμε υπόψη μας ότι είναι ίσος με το συνολικό αριθμό των χορηγουμένων κυττάρων άλλων μελετών (*Stamm et al, 2003*). Αν και ο χρόνος παραμονής τους στην περιοχή του εμφράγματος, καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους παραμένει αδιευκρίνιστος, ωστόσο, η μείωση του μεγέθους των μη βιώσιμων περιοχών του μυοκαρδίου, η αύξηση της αιμάτωσής τους και η βελτίωση των καρδιακών παραμέτρων που παρατηρήθηκαν, δικαιολογούν τη διενέργεια μιας προοπτικής κλινικής μελέτης φάσης II (*Goussetis et al, 2006; Manginas et al, 2007*).

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής μπορούμε ασφαλώς να υποστηρίξουμε ότι δόθηκαν σαφείς απαντήσεις στα ερωτήματα που αρχικά τέθηκαν. Απαντήσεις που βρήκαν άμεση εφαρμογή. Η χρησιμοποίηση του CD105⁺ κυτταρικού πληθυσμού για την εξωσωματική έκπτυξη και δημιουργία μεγάλου αριθμού ΣΣΚ, κλινικά επαρκή, αποτελεί πλέον πρακτική του εργαστηρίου μας, ενώ, η απομόνωση των CD133⁺ και CD133⁺CD34⁺ πληθυσμών αποτέλεσε τη βάση για την κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια.

Όμως, η νέα γνώση που αποκτήσαμε και αφορά στη δυνατότητα γένεσης ΣΣΚ στην καλλιέργεια, από πληθυσμούς (CD133⁺ και CD34⁺) που έως πρότινος θεωρούνταν πηγές αποκλειστικά αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων, δε μας βοηθάει στη διαλεύκανση της όποιας σχέσης και ιεραρχίας μπορεί

να υπάρχει στο διαμέρισμα των ΣΚ του μυελού των οστών. Αντιθέτως, καταργεί και προηγούμενες απόψεις που με αβασάνιστο ίσως τρόπο είχαν διατυπωθεί, υπενθυμίζοντάς μας ότι η πολυπλοκότητα που διέπει τον ανθρώπινο οργανισμό και τις λειτουργίες του, δεν είναι εύκολα προσπελάσιμη.

Επιπροσθέτως, και έχοντας κατά νου, ότι η επιστημονική σκέψη μπορεί πολλές φορές παροδικά να λανθάνει, θεωρούμε σκόπιμο να μην αποσιωπήσουμε τα τολμηρά μεν, υπαρκτά δε, ερωτήματα που μας προέκυψαν, στην προσπάθειά μας να αξιολογήσουμε τα έως τώρα δεδομένα και πως αυτά ερμηνεύονται. Αποτελεί πράγματι *in vivo* οντότητα το επανομαζόμενο ΜΣΚ ή αντικατοπτρίζει απλώς και μόνο τη μορφή που τείνουν να λαμβάνουν στην καλλιέργεια ποικίλες κατηγορίες ΣΚ υπό την επίδραση των συγκεκριμένων παραγόντων; Το προφίλ του, όπως αυτό αναγιγνώσκεται σε φαινοτυπικό, λειτουργικό αλλά και μοριακό επίπεδο, είναι αποτέλεσμα μιας σοφής διαφοροποιητικής και εξελικτικής διαδικασίας που συντελείται στον οργανισμό, ή απλώς και μόνο το επακόλουθο μιας εκφυλιστικής πορείας που λαμβάνει χώρα σε ένα τεχνητό περιβάλλον;

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ΣΣΚ είναι κύτταρα ινοβλαστικής μορφολογίας που παράγονται στο εργαστήριο, όταν καλλιεργηθεί κατάλληλα μυελός των οστών. Πιθανώς, το *in vivo* κύτταρο καταγωγής τους να είναι το περιαγγειακό κύτταρο (perivascular cell) ή περικύτταρο (pericyte). Οι *in vitro* ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα ΣΣΚ ως τέτοια είναι: η προσκόλλησή τους στην επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου, ο συγκεκριμένος ανοσοφαινότυπος, όπως προσδιορίζεται από την κυτταρομετρική ανάλυση και η ικανότητά διαφοροποίησή τους σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροβλάστες. Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και καταστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων σε μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες.

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έδειξαν ότι τα ΣΣΚ διαθέτουν και *in vivo* ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, συμβάλλοντας στην επιβίωση του μοσχεύματος σε πειραματικά ζωικά μοντέλα. Επιπλέον, προσελκύονται στην περιοχή των τραυματισμένων ιστών προωθώντας τη λειτουργική αποκατάστασή τους με αντιφλεγμονώδη δράση. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στη χρησιμοποίησή τους και στον άνθρωπο για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Έτσι, έχουν διεξαχθεί πολλές κλινικές μελέτες φάσης I και II, που αφορούν στην έγχυση ΣΣΚ για την υποβοήθηση της μεταμόσχευσης ΑΣΚ, τη θεραπεία της ανθεκτικής GVHD, την αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων και φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, καθώς και την αναγέννηση ιστών με περιορισμένη ανανεωτική δυνατότητα (καρδιακός, νευρικός, ιστοί του μυοσκελετικού συστήματος, κ. ά.).

Με στόχο την παραγωγή εξωσωματικά εκπτυγμένων ΣΣΚ σε αριθμό επαρκή για την αντιμετώπιση της GVHD, αλλά και την ανεύρεση του καταλληλότερου πληθυσμού ΣΚ του ΜΟ για τη θεραπεία ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, στο εργαστήριό μας μελετήσαμε δύο χαρακτηριστικούς πληθυσμούς ΣΣΚ (CD105⁺ και CD271⁺) και δύο, μέχρι πρόσφάτως θεωρούμενων, ΑΣΚ (CD34⁺ και CD133⁺).

Από 23 δείγματα ΜΟ, 10ml το καθένα, απομονώθηκαν οι παραπάνω πληθυσμοί χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα αντισώματα και τη μέθοδο της θετικής ανοσομαγνητικής επιλογής. Ακολούθησαν καλλιέργειες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των διαχωρισθέντων κυττάρων σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα. Η φαινοτυπική ανάλυση των καλλιεργημένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής, ενώ η διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα,

οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα ελέγχτηκε με την έκφραση των γονιδίων της LPL, της αλκαλικής φωσφατάσης και της COL2A1 αντίστοιχα.

Και οι 4 πληθυσμοί έδωσαν γένεση σε προσκολλημένα κύτταρα ινοβλαστικής μορφολογίας, που διατηρούν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους για 5 περίπου εβδομάδες και 9 συνεχείς ανακαλλιέργειες. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και ο συνολικός αριθμός τους κατά το τέλος της καλλιέργειας, δε φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ τους, ενώ, ο ανοσοφαινότυπος ($CD29^+$, $CD90^+$, $CD44^+$, $CD13^+$, $CD105^+$, Class I – HLA $^+$, $CD14^-$, $CD19^-$, $CD31^-$, HLA-DR $^-$, $CD34^-$ και $CD45^-$) και η ικανότητα διαφοροποίησής τους σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα, όπως καταδεικνύεται και από την έκφραση των γονιδίων της LPL, της αλκαλικής φωσφατάσης και της COL2A1 αντίστοιχα, πιστοποιούν την ταυτότητά τους ως ΣΣΚ.

Σημαντική διαφοροποίηση από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε σε ένα δείγμα $CD271^+$ κυττάρων, στο οποίο, η αυτόματη δημιουργία ποικιλόμορφων κυτταρικών σχηματισμών μετά την 3^η ανακαλλιέργεια, ανέστειλε τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των ΣΣΚ.

Το εύρημα αυτό μας οδήγησε στην επιλογή του $CD105^+$ πληθυσμού, προκειμένου να λαμβάνουμε αριθμό ΣΣΚ επαρκή για την αντιμετώπιση της GVHD, γεγονός που αποτελεί πλέον πρακτική του εργαστηρίου μας.

Όσον αφορά στους πληθυσμούς των $CD133^+$ και $CD34^+$ κυττάρων, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ξεκάθαρα ότι, πέραν των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων, εμπεριέχουν και ΣΣΚ, επιβεβαιώνοντας το γεγονός που εκείνο το διάστημα είχε αρχίσει να διαφαίνεται για τον πρώτο και ανατρέποντας τα έως τότε βιβλιογραφικά δεδομένα για το δεύτερο.

Στα ευρήματά μας αυτά στηρίχτηκε η κλινική μελέτη που ακολούθησε, κατά την οποία πραγματοποιήθηκε επιλογή των $CD133^+$ και $CD133^-CD34^+$ κυττάρων από το MO 26 ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και επαναχορήγησή τους στον ασθενή με ενδοστεφανιαία έγχυση. Η σήμανση με ραδιοφάρμακο των εγχεόμενων κυττάρων σε 8 περιπτώσεις έδειξε ότι σημαντικός αριθμός από αυτά εντοπίζονταν στην περιοχή του ουλοποιημένου μυοκαρδίου, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους των μη βιώσιμων περιοχών, την αύξηση της αιμάτωσής τους και τη βελτίωση των καρδιακών παραμέτρων, δικαιολογώντας έτσι τη διενέργεια μιας προοπτικής κλινικής μελέτης φάσης II.

6. ABSTRACT

Stromal stem cells (SSC) are produced *in vitro* when bone marrow (BM) is cultured under standard conditions. They are characterized by fibroblast-like morphology, adherent growth, specific phenotype as defined by flow cytometric analyses and capacity to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes. They also possess remarkable expansion potential and suppress the proliferation of lymphocytes in mixed lymphocyte cultures. They probably originate from perivascular cells or pericytes.

In recent years, several experimental studies have shown that SSC are endowed with immunomodulatory properties and with the capacity to promote graft survival in animal models. Furthermore, they have the ability to home to damaged tissue and to produce paracrine factors with anti-inflammatory effects, resulting in functional recovery of the wounded area. In view of these properties, SSC have been tested in pilot studies aimed at accelerating recovery and at treating steroid-resistant aGVHD after allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. Moreover, there are many ongoing clinical studies phase I and II, investigating the effect of cell therapy with SSC on autoimmune and inflammatory bowel diseases, as well as, on regeneration of tissue with limited renewal capacity (heart, nervous, tissues of the musculoskeletal system, etc.).

With the aim to produce *ex vivo* expanded SSC, in a number sufficient to treat GVHD, but also, the detection of the most appropriate population of bone marrow stem cells for the treatment of patients with heart failure, we studied two distinct populations of SSC (CD105⁺ and CD271⁺) and two HSC (CD34⁺ and CD133⁺), as they considered until recently.

We obtained 10ml BM samples from 23 healthy donors. The above populations were isolated using corresponding antibodies and positive immunomagnetic selection method. The isolated cells were placed in *ex vivo* expansion and differentiation cultures towards osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. Surface marker expression of cultured SSC were analyzed by flow cytometry, while chondrogenic, adipogenic and osteogenic differentiation were confirmed by COL2A1, LPL and ALP expression, respectively.

All selected populations generated fibroblast-like, adherent cells which maintain their expansion potential for about 5 weeks and 9 sequential passages. The expansion rate and the total number of cells at the end of the culture, does not seem to vary

considerably, while, the immunophenotype (CD29⁺, CD90⁺, CD44⁺, CD13⁺, CD105⁺, Class I – HLA⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD31⁺, HLA-DR⁺, CD34⁺ and CD45⁺) and the ability to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes, as demonstrated by gene expression of LPL, ALP and COL2A1 respectively, confirm their identity as SSC.

Significant variation of the above results were observed during cultivation of a CD271⁺ sample, in which spontaneous generation of diverse cell clusters after third passage, inhibited further proliferation of SSC.

This finding led us to the choice of CD105⁺ cells in order to receive sufficient numbers of SSC to treat GVHD. This approach is now well established in our laboratory.

As far as CD133⁺ and CD34⁺ cells are concerned, our results very clearly showed that in addition to hematopoietic and endothelial progenitor cells, they also contain SSC, confirming the fact at that time had just begun to emerge for the first population, but, upsetting the literature data for the second.

The clinical study that followed was based on these findings. CD133⁺ and CD133⁺CD34⁺ cells were immunomagnetically selected from BM of 26 patients with heart failure and subsequently re-infused to the patients with intracoronary administration. In 8 cases, isolated cells were labeled with ^{99m}Tc-hexamethylpropylenamineoxime. This fact revealed that significant number of injected cells homed to the infarcted area of the heart, resulting in reduction of size of non-viable areas, improvement of myocardial perfusion and cardiac parameters, thus justifying the conductive of a prospective clinical trial phase II.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: A systematic review and meta-analysis. Arch Intern Med 2007; 167: 989-997

Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. Circ Res 2004; 95:671-676

Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, et al. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133 progenitors for the repair of infarcted myocardium. J Am Coll Cardiol 2004; 44: 458-463

Aggarwall S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005; 105: 1815-1822

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged period of culture. Dev. Biol. 2000; 227: 271-278

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964-967

Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). Circulation 2002; 106: 3009-3017

Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. Eur Cell Mater. 2010; 20: 121-133

Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM. Co-transplantation of ex-vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2007; 110: 2764-2767

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol. 2002; 30: 42-48

Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B et al. Intracoronary Injection of CD133-positive Enriched Bone Marrow Progenitor Cells Promotes Cardiac Recovery After Recent Myocardial Infarction. Feasibility and Safety. Circulation 2005; 112(suppl I): 178-183

Becker AJ, McCullough EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452-454

Bernardo ME, Pagliara D, Locatelli F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in regenerative medicine? *Bone Marrow Transplant*. 2011; 1-8

Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res*. 2003; 287: 98-105

Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 7999-8004

Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779

Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007; 110: 1362-1369

Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, et al. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 2002; 115: 2131-2138

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopedic Research* 1991; 9: 641-650

Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21: 429-35

Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 2008; 3: 229-230

Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of pathology* 2009; 217: 318-324

Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, Imberti B, Morigi M, Cugini D, Cavinato RA, Todeschini M, Solini S, Sonzogni A, Perico N, Remuzzi G, Noris M. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181: 3933-3946

Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, et al. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002; 297: 1299

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301

Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003; 5: 1028-1038

Choi KS, Shin JS, Lee JJ. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1299-1305

Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* 2011; 60: 788-798

Cohnheim J. *Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* 1867; 40: 1

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 3213-3218

Conget PA and Minguell JJ. Phenotypical and Functional Properties of Human Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells. *Journal of Cellular Physiology* 1999; 181: 67-73

Corbel SY, Lee A, Yi L. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* 2003; 9: 1528-1532

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107: 367-372

Corti S, Locatelli F, Donadoni C, et al. Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia. *J Neurosci Res* 2002a; 70: 721-733

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 301-313

Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am. J. Pathol.* 1993; 143: 1606-1620

Di Campli C, Piscaglia AC, Pierelli L, et al. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 603-613

Di Girolamo CM, Stokes D, Colter D. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107: 275-81

D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117: 2971-2981

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T- lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843

Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1998; 13:828-838

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317

Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 613-624

Duijvenstein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 2010; 59: 1662-1669

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Hematol* 2000; 109: 235-242

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156

Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 2004; 110: 2226-2232

Fehrer C, Laschober G, Lepperdinger G. Aging of murine mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1067: 235-42

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530

Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 2002; 61 (Suppl II): ii29-ii31

Flohr T, Hess G, Kolbe K, et al. Rituximab in vivo purging is safe and effective in combination with CD34-positive selected autologous stem cell transplantation for salvage therapy in B-NHL. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29: 769-775

Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci*. 1995; 108: 3181-3188

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1966; 16: 381-390

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230-247

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol*. 1974; 2: 83-92

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol*. 1976; 4: 267-274

Friedenstein A. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh. Patol*. 1982; 44: 3-11

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and Tissue Kinetics* 1987; 20: 263-272

Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*. 2006; 97(6): 823-829

Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009; 85(8): 348-62

Gabbianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, et al. ‘‘Pure’’ human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1990; 249: 1561-1564

Galach M, Utikal J. From skin to the treatment of diseases—the possibilities of iPS cell research in dermatology. *Exp Dermatol*. 2011; 20(6): 523-8

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133- positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106-3112

Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010; 15: 1(1): 2

Gordon PR, Leimig T, Babarin-Dorner A et al. Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31: 17-22

Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2004; 22: 487-500

Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Peristeri J, Petropoulos D, Kitra V, Papassarandis C, Graphakos S. A functional hierarchy among the CD34+ hematopoietic cells based on in vitro proliferative and differentiative potential of AC133+CD34(bright) and AC133(dim-)-CD34+ human cord blood cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000; 9(6): 827-40

Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Stefanaki K, Tsecoura C, Papassarandis C, Graphakos S. Kinetics of quiescent cord blood stem/progenitor cells with high proliferative potential in stem-cell expansion culture. *Cytherapy* 2003; 5(6): 500-8.

Goussetis E, Spiropoulos A, Theodosaki M, Paterakis G, Peristeri I, Kitra V, Petrakou E, Soldatou A, Graphakos S. Culture of bone marrow CD105+ cells allows rapid selection of pure BM-stromal cells for chimerism studies in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 36(6): 557-9.

Goussetis E, Manginas A, Koutelou M, Peristeri I, Theodosaki M, Kollaros N, Leontiadis E, Theodorakos A, Paterakis G, Karatasakis G, Cokkinos DV, Graphakos S. Intracoronary infusion of CD133+ and CD133-CD34+ selected autologous bone marrow progenitor cells in patients with chronic ischemic cardiomyopathy: cell

isolation, adherence to the infarcted area, and body distribution. *Stem Cells*. 2006; 24(10): 2279-83.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394

Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW. *Human Embryology*. Cambridge, UK, W. Heffer & Sons Ltd, 1945

Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27: 777-783

Handgretinger R, Gordon PR, Leiming T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 141-151

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-23

Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 2277-2286

Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of Cells for Cardiac Repair. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 711-717

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102(10): 3483-3493

Hess D, Li L, Martin M, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 763-770

Hiraoka K, Grogan S, Olee T, Lotz M. Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage. *Biorheology* 2006; 43: 447-454

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy.

Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5): 393-5.

Howlett CR, Cave J, Williamson M, Farmer J, Ali SY, Bab I, Owen ME. Mineralization in in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells. *Clinical Orthopedics and Related Research*. 1986; 213: 251-263

Huang S, Terstappen LW. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992; 360: 745

Huang S, Terstappen LWMM. Correction: Formation of a haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1994; 368: 664

Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002; 20: 249-258

Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells* 2000; 18: 1-9

Islam A. Hematopoietic stem cells: A new concept. *Leuk Res* 1985; 9: 1415

Islam A, Gong J, Henderson J. Direct evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro micro environment: Studies on syngeneic (inbred) Wistar Furth rats. *J Med* 1988; 19: 119

Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Christiano AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(21): 8797-802

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 2000; 6: 88-95

Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402

Jiang Y, Jahagirdar B, Reyes M. Pluripotent nature of adult marrow derived mesenchymal stem cells. *Nature* 2002; 418: 41-49

Jiang Y, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100(suppl 1): 11854-11860

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; 458(7239): 771-5

Kajstura J, Leri A, Finato N. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 8801-8805

Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gommer JM, Kassis I. Safety and immunological effect of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2010; 67: 1187-1194

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637

Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, et al. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation* 2006; 114: 2163-2169

Keene CD, Ortiz –Gonzalez XR, Jiang Y, Largaespada DA, Verfaillie CM, Low WC. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell Transplant* 2003; 12: 210-213

Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia & Lymphoma* 2005; 46(11): 1531-1544

Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 1199–1205

Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI. Rapid hematopoietic recovery after co-infusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 307–316

Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 215-222

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte

apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-436

Koehl U, Zimmermann S, Esser R et al. Autologous transplantation of CD133 selected hematopoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 927-930

Kordes C, Sawitza I, Muller-Marbach A. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417

Krampera M, Glennie S, Dyson J. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729

Krampera M, Cosmi L, Angeli R. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 386-398

Krause DS, Theise ND, Collector MI. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377

Kuci S, Wessels JT, Buhring HJ, Schibach K, Schumm M, Seitz G, Loffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 2003; 101: 869-876

Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857-869

Kucia M, Wu W, Ratajczak MZ. Bone Marrow-Derived Very Small Embryonic-Like Stem Cells: Their Developmental Origin and Biological Significance. *Developmental Dynamics* 2007; 236: 3309-3320

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* 2001; 153: 1133-1140

LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111:589-601

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 2000; 6: 1229-1234

Lang P, Handgretinger R, Niethammer D, et al. Transplantation of highly purified CD34⁺ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* 2003; 101: 1630-1636

Lange C, Bassler P, Lioznov MV. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4497-4504

Lazaro CA, Rhim JA, Yamada Y, Fausto N. Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res.* 1998; 58: 5514-5522

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 16: 557-564

Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 389-398

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363: 1439-1441

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371: 1579-1586

Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* 2010; 28: 1099-1106

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284

Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: A collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1761-1767

Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng.* 2002; 8: 739-751

Losordo DW, Schatz RA, White CJ, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa doubleblind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; 115(25): 3165-3172

Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. *Science* 2001; 292: 1389-1394

Ma N, Ladilov Y, Moebius JM, et al. Intramyocardial delivery of human CD133+ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells. *Cardiovascular Research* 2006; 71: 158-169

MacMillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of culture-expanded haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2008; 43: 1-8

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 1998; 176: 57-66

Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris A. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 185: 98-106

Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE. Human marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research* 2000; 9: 841-848

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705

Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, Leontiadis E, Plessas N, Theodosaki M, Graphakos S, Cokkinos DV. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007; 69(6): 773-81.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 7634-7638

Martin P. Prochymal[®] improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease involving the liver and gut: results of a randomized, placebo-controlled, multicentre phase III trial in GVHD. In: *Bone Marrow Transplantation* 2010; 45: S1-77

Masuya M, Drake CJ, Fleming PA. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood* 2003; 101: 2215-2218

Maximow AA. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol Rev* 1924; 4: 533

McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997; 276: 66-71

Meirelles Lda S, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 2287-2299

Mets T & Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow-derived stromal cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 1981; 16: 81-89

Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113: 1287-1294

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90: 5013-5021

Mohyeddin Bonab M, Yazdanbakhsh S, Lotfi J, Alimoghaddom K, Talebian F, Hooshmand F. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. *Iran J Immunol* 2007; 4: 50-57

Momma S, Johansson CB, Frisen J. Get to know your stem cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10: 45-49

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* 2000; 113: 1161-1166

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haemopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668

Nakano T, Kodama H, Honjo T. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* 1996; 272: 722-724

Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990; 110: 815-821

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 8424-8428

Nardi NB & Meirelles LS. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 174: 249-282

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110: 3499-3506

Nesti LJ, Jackson WM, Shanti RM, Koehler SM, Aragon AB, Bailey JR, Sracic MK, Freedman BA, Giuliani JR, Tuan RS. Differentiation potential of multipotent progenitor cells derived from war-traumatized muscle tissue. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90(11): 2390-8.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-10349

Owen ME and Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues: Ciba Foundation Symposium*, Chichester, UK. 1988; pp. 42-60

Owen M. Marrow derived stromal stem cells. *J. Cell Science Supp.* 1988; 10: 63-76

Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:930-941

Pal R, Venkataramana NK, Bansal A, Balaraju S, Jan M, Chandra R. Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytotherapy* 2009; 11: 897-911

Patel AN, Geffner L, Vina RF, et al. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 130(6): 1631-1638

Patel M and Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2010; 6(3): 367-80

Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblast in the postnatal life. *Blood* 2002; 100: 3203-3208

Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfect. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1142-1147

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-2302

Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, Hockema JJ, Woods EJ, Goebel WS. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods* 2008; 14: 149-156

Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, et al. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res* 2003; 93: e51-62

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170

Piersma AH, Brockbank KGM, Ploemacher RE, van Vilet E, Brakel-van Peer KMJ, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp. Hematol.* 1985; 13: 237-243

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147

Polchert D, Sobinsky S, Douglas GW, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrotra S, Setty S, Smith B, Bartholomew A. IFN- γ activation of mesenchymal

stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1745-1755

Poloni A, Maurizi G, Rosini V, Mondini E, Mancini S, Discepoli G, Biasio S, Battaglini G, Felicetti S, Berardinelli E, Serrani F, Leoni P. Selection of CD271⁺ cells and human AB serum allows a Large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytotherapy* 2009; 11(2): 153-62

Pozzobon M, Piccoli M, Ditadi A, Bollini S, Destro R, André-Schmutz I, Masiero L, Lenzini E, Zanesco L, Petrelli L, Cavazzana-Calvo M, Gazzola MV, De Coppi P. Mesenchymal stromal cells can be derived from bone marrow CD133⁺ cells: implications for therapy. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(3): 497-510.

Prockop DJ. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science* 1997; 276: 71-74

Psaltis PJ, Zannettino ACW, Worthley SG, Gronthos S. Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Cardiovascular Repair. *Stem Cells* 2008; 26: 2201-2210

Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, et al. Bone- marrow-derived stem cells- our key to longevity? *J Appl Genet* 2007; 48(4): 307-319

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18: 399-404

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-2625

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-346

Rideout WMr, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093-1098

Rzhaninova AA, Gornostaeva SN, Goldshtein DV. Isolation and phenotypical characterization of mesenchymal stem cells from human fetal thymus. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139: 134-140

Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 2001; 115: 186-194

Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 2002; 30(7): 783-91

Sabatini F, Petecchia L, Tavian M. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest* 2005; 85: 962-971

Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010; 28: 585-596

Sato K, Ozaki K, Mori M, Muroi K, Ozawa K. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease: basic aspects and clinical outcomes. *J Clin Exp Hematopathol* 2010; 50(2): 79-89

Satomura K, Derubeis AR, Fedarko NS, Ibaraki-O'Connor K, Kuznetsov SA, Rowe DW, Young MF, Robey PG. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 1998; 177: 426-438

Schatteman GC & Awad O. Hemangioblasts, Angioblasts, and Adult Endothelial Cell Progenitors. *Anat Rec Part A* 2004; 276A: 13-21

Schwartz RE, Reyes M, Koodie L. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302

Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 2000; 218: 115-124

Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: State of the art. *Seminars in Reproductive Medicine* 2006; 24(5): 379-388

Shenag DS, Rastegar F, Petkovic D, et al. Mesenchymal progenitor cells and their orthopedic applications: forging a path towards clinical trials. *Stem Cells Int.* 2010; 16: 519028

Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow- derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-367

Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, Shen EY, Chiu WT. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005; 23: 1012-1020

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-2779

Simmons PJ & Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78: 55-62

Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20: 592-596

Singer JW, Keating A, Cuttner J, et al. Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: Studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia. *Leuk Res* 1984; 8: 535

Sirica AE, Mathis GA, Sano N, Elmore LW. Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology* 1990; 58: 44-64

Slack JM. Stem cells in Epithelial Tissues. *Science* 2000; 287: 1431- 1433

Smith AG. Origins and properties of mouse embryonic stem cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001; ***

Soonpa MH, Kim KK, Pajak L. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 1996; 271: H2183-2189

Spiropoulos A, Theodosaki M, Stefanaki K, Paterakis G, Tzetis M, Giannikou K, Petrakou E, Dimopoulou MN, Papassotiriou I, Roma ES, Kanavakis E, Graphakos S, Goussetis E. Rapid clinical-scale propagation of mesenchymal stem cells using cultures initiated with immunoselected bone marrow CD105+ cells. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(9): 1983-8.

Stadtfield M and Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2010; 24(20): 2239-63

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46

Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 133(3): 717-725

Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918

Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: The IACT Study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1651-1658

Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab Invest* 1996; 74: 452-466

Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-872

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine- induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-438

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; 102: 451-461

Terada N, Hamazaki T, Oka M. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147

Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells. *Am. J. Pathol.* 1993; 142: 1331-1333

Till JE, McCullough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 1961; 14: 213-222

Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 14720-14725

Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005; 100(1): 12-27

van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47: 1634-43

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle and Nerve* 1995; 18: 1417-1426

Wagner W, Horn P, Castoldi M, Dichlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE* 2008; 3: c2213

Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR. The 'common stem cell' hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 1995; 85: 2422-2435

Wang B, Han J, Gao Y. The differentiation of rat adipose-derived stem cells into OEK-like cells on collagen scaffolds by co-culturing with OEKs. *Neurosci Lett* 2007; 421: 191-196

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(5): 618-30

Wernicke CM, Grunewald TGP, Juenger H, Kuci S, Kuci Z, Koehl U, Mueller I, Doering M, Peters C, Lawitschka A, Kolb HJ, Bader P, Burdach S, von Luetichau I. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. *Int Arch Med*. 2011; 4(1): 27

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-148

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res*. 2000; 61: 364-370

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002-5012

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-548

Yoon YS, Wecker A, Heyd L. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115: 326-338

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 2007; 318(5858): 1917-1920

Zappia E, Casazza S, Pedemonte E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood 2005; 106:1755-1761

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell. 2009; 4(5): 381-4

Zhu AJ, Haase I, Watt FM. Signaling via beta 1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96: 6728-6733

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13: 4279-4295

Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. Diabetes 2001; 50: 521-533

Γουσέτης Ε. Μεσεγχυματικά ή στρωματικά στελεχιαία κύτταρα μυελού των οστών. Αίμα 2002; Συμπλήρωμα: 68-74

Κυριακού Δ, Αλεξανδράκης Μ, Ηλιόπουλος Γ. Εισαγωγή στην αιμοποίηση. Ιατρικές εκδόσεις “Αιμοβιολογική” 1996; Κεφ.1: 11-14