

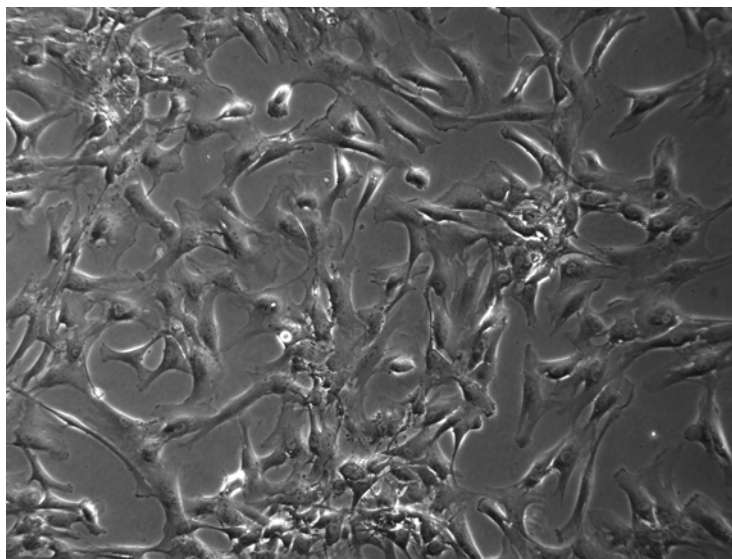


ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ & ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΘΕΜΑ : «ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΙΣΤΙΚΗΣ
ΑΝΑΠΛΑΣΗΣ»**

ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΟΣ: **ΘΕΟΦΑΝΗ ΧΑΤΖΗΣΤΑΜΑΤΙΟΥ**



ΑΘΗΝΑ 2015

Εικόνα εξώφυλλου: Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα σε καλλιέργεια



NATIONAL AND KAPOSTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF CELLULAR BIOLOGY AND BIOPHYSICS

PhD THESIS

**TITLE: “ISOLATION, EXPANSION AND CONTROLLED
DIFFERENTIATION OF UMBILICAL CORD BLOOD AND
UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS. CLINICAL
APPLICATIONS IN TISSUE REGENERATION”**

Author: **THEOFANIS K. CHATZISTAMATIOU**

ATHENS 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΙΣΙΔΩΡΑ ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ	Καθηγήτρια Τομέα Βιολογίας Κύτταρου & Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ - (επιβλέπουσα)
ΛΟΥΚΑΣ ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ	Ομότιμος Καθηγητής Τομέα Βιολογίας Κύτταρου & Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΥ	Ερευνητής Α', Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, ΙΙΒΕΑΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΙΣΙΔΩΡΑ ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ	Καθηγήτρια Τομέα Βιολογίας Κύτταρου & Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ - (επιβλέπουσα)
ΛΟΥΚΑΣ ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ	Ομότιμος Καθηγητής Τομέα Βιολογίας Κύτταρου & Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΥ	Ερευνητής Α', Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, ΙΙΒΕΑΑ
ΟΥΡΑΝΙΑ ΤΣΙΤΣΙΛΩΝΗ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Άνθρωπου
ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ ΚΟΛΛΙΑ	Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, ΕΚΠΑ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέα Βιολογίας Κύτταρου & Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΡΟΥΓΚΑΚΟΣ	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέα Βιολογίας Κύτταρου & Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

N. 5343/1932, άρθρο 202

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (Διευθύντρια Δρ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκικόκα, Ερευνητής Α'), Ιδρύμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, 115 27, Αθήνα, Ελλάδα

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΩΣΤΑ ΚΑΙ ANNA
ΠΟΥ ΜΟΥ ΕΔΕΙΞΑΝ ΤΟ ΔΡΟΜΟ
ΚΑΙ ΜΟΥ ΠΑΡΕΙΧΑΝ ΤΑ ΜΕΣΑ

ΣΤΗ ΣΥΖΥΓΟ ΜΟΥ ΚΑΛΛΙ
ΠΟΥ ΕΓΙΝΕ ΣΥΝΟΔΟΙΠΟΡΟΣ
ΚΑΙ ΣΥΝΕΞΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ
ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΜΟΥ

ΣΤΟ ΓΙΟ ΜΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟ
ΠΟΥ ΘΑ ΧΑΡΑΞΕΙ ΤΗ ΔΙΚΗ ΤΟΥ
ΠΟΡΕΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών σε συνεργασία με τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Είχα την τύχη να γίνω μέλος της οικογένειας της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. από την αρχή της λειτουργίας της και για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκιόκα. Ως ιδρύτρια και Διευθύντρια της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α., με εμπιστεύτηκε και όντας νέος επιστήμονας, μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέτοχος στην προσπάθεια για την εδραίωσή της σε Διεθνές επίπεδο αλλά και τα μέσα προκειμένου να συμβάλω, στο μέτρο των δυνατοτήτων μου, στο χτίσιμο του ερευνητικού της τμήματος, αποκομίζοντας παράλληλα για τον εαυτό μου, ανεκτίμητες εμπειρίες. Σε όλο αυτό το διάστημα έχουν προστεθεί στην οικογένεια της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. πολλοί νέοι συνεργάτες ενώ κάποιοι αποχώρησαν, όλοι όμως άφησαν το ανεξίτηλο αποτύπωμά τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, το στενό μου συνεργάτη και φίλο Δρ. Ευστάθιο Μιχαλόπουλο, ο οποίος με τις εύστοχες παρατηρήσεις του και τις προτροπές του, εξακολουθεί να με διατηρεί σε εγρήγορση και να με βοηθάει να προοδεύω ενώ παράλληλα ακούει αδιαμαρτύρητα τις γκρίνιες και τα νεύρα μου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τους υπόλοιπους συναδέλφους με τους οποίους μοιραστήκαμε προσπάθειες, αγωνίες, απογοητεύσεις και επιτυχίες. Ιδιαίτέρως δε τον κ. Χρήστο Γαμαλούτσο και την κ. Χρυσάνθη Σαλιαγκοπούλου, οι οποίοι «φρόντιζαν» τις καλλιέργειές μου κατά τις περιόδους απουσίας μου καθώς και τους κκ. Ιωάννα Γόντικα και Παναγιώτη Μαλλή οι οποίοι βοήθησαν με ιστολογικές τεχνικές. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. καθώς και όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές και σπουδαστές που πέρασαν όλα αυτά τα χρόνια για την εξαιρετική συνεργασία τους και τις δεκάδες ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί.

Από το Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, καθοριστική υπήρξε η συμβολή του Καθ. κ. Σταύρου Κουσουλάκου, ο οποίος ως αρχικός μου επιβλέπων με επέλεξε, δίνοντας μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω αυτή τη διδακτορική διατριβή και με την εμπειρία του, με καθοδήγησε μέχρι την αποχώρησή του από το Πανεπιστήμιο Αθηνών. Για το λόγο αυτό του είμαι ευγνώμων, όπως ευγνώμων είμαι και στην Καθ. κ. Παπασιδέρη η οποία, μετά την αποχώρηση του κ. Κουσουλάκου και παρόλο που η διατριβή βρισκόταν ήδη σε πολύ προχωρημένο στάδιο, δε δίστασε να

αναλάβει ως επιβλέπουσα και με το ειλικρινές της ενδιαφέρον και την κριτική της ματιά, να επιτρέψει την επιτυχή της ολοκλήρωση. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Ομ. Καθ. Κ. Λουκά Μαργαρίτη για την ουσιαστική καθοδήγηση που μου παρείχε ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Τέλος είναι μεγάλη μου τιμή που η Αναπλ. Καθ. κ. Ουρανία Τσιτσιλώνη, καθώς και οι Επικ. Καθ. κκ. Παναγούλα Κόλλια, Δημήτρης Στραβοπόδης και Ιωάννης Τρουγκάκος, δέχθηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής και τους ευχαριστώ θερμά.

Επέλεξα να αφήσω για το τέλος τον άνθρωπο που μου στάθηκε δίπλα σε όλη την μέχρι τώρα επαγγελματική μου πορεία, τον Δρ. Ανδρέα Παπασάββα, υπεύθυνο του ερευνητικού τμήματος της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α., ο οποίος από συνεργάτης έγινε φίλος και πλέον τον θεωρώ αδελφό μου. Ανδρέα ήσουν και θα είσαι πραγματικός Δάσκαλος και σε ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

Κλείνοντας, τί είναι αυτό που μπορεί να πει ένας γιός στους γονείς του που του παρείχαν κάθε υλικό, πνευματικό και ηθικό έρεισμα και την απεριόριστη αγάπη τους; Τί είναι αυτό που μπορεί να πει ένας σύζυγος στην αγαπημένη του σύντροφο για την καρτερική υπομονή της και την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τα ατελείωτα ξενύχτια στη δουλειά ή τις ατέλειωτες βραδιές «συγγραφικού οίστρου»; Σας ευχαριστώ πολύ και ελπίζω να σας κάνω υπερήφανους.

Θ. Κ. Χατζησταματίου

Αθήνα, Οκτώβριος 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) αποτελούν μία ιδιαίτερη κατηγορία βλαστικών κυττάρων, καθώς επιπλέον της ιδιότητάς τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδερμικής, κυρίως, προέλευσης, παρουσιάζουν και ανοσορρυθμιστική δράση *in vivo*. Θεωρείται κατά συνέπεια ότι θα μπορούσαν να συμβάλλουν σε κλινικές εφαρμογές αναγεννητικής Ιατρικής, γονιδιακής θεραπείας ή λόγω του τροφικού τους ρόλου σε προηγμένες κυτταρικές θεραπείες. Έχει ωστόσο αποδειχθεί ότι τα βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από ιστούς ενηλίκων οργανισμών, είναι «γηρασμένα», παρουσιάζουν μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και περιορισμένη λειτουργικότητα, ενώ ενδέχεται να διατηρούν και τη «γονιδιακή μνήμη» του ιστού από τον οποίο προέρχονται.

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσο το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και ο ιστός του ομφαλίου λώρου, θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως πηγές MSCs για κλινικές εφαρμογές.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης, κύτταρα που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα με επιστίβαση, αφού είχε προηγηθεί εμπλουτισμός του πληθυσμού των MSCs με τη χρήση εμπορικού σκευάσματος *RosetteSep* αλλά και χωρίς εμπλουτισμό, καθώς και κύτταρα που απομονώθηκαν από τον ομφάλιο λώρο με ιστοκαλλιέργειες ή ενζυματική πέψη (με κολλαγενάση και υαλουρονιδάση) καλλιεργήθηκαν εκτεταμένα σε διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά: ένα εμπορικό kit για την καλλιέργεια MSCs και το α-MEM συμπληρωμένο είτε με τον ζωικό ορό εμβρύου βοός (FBS) είτε με ανθρώπινο ορό ομφαλοπλακουντιακού αίματος (CBS). Για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των MSCs ελέγχθηκε ο ανοσοφαινότυπός τους με κυτταρομετρία ροής καθώς και η έκφραση γονιδίων πολυδυναμικότητας των βλαστικών κυττάρων με αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR). Παράλληλα μελετήθηκε η ιδιότητα διαφοροποίησής τους με την καλλιέργειά τους σε θρεπτικά υλικά που επάγουν την οστεογένεση, τη λιπογένεση και τη χονδρογένεση. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα ανιχνεύθηκαν με τη βοήθεια των κατάλληλων χρώσεων. Σε ένα δεύτερο χρόνο επιχειρήθηκε η κρυοσυντήρηση των MSCs του ομφαλίου λώρου εξετάζοντας την επίδραση της κατάψυξης, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, στα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των κυττάρων που είχαν απομονωθεί από τον ομφάλιο λώρο με τις προαναφερθείσες μεθόδους. Τέλος μελετήθηκε η δυνατότητα επικοινωνίας ικριωμάτων κολλαγόνου από MSCs του ομφαλίου λώρου με συγκαλλιέργειά τους τόσο σε στατικές όσο και δυναμικές συνθήκες.

Χρησιμοποιήθηκαν μονοπύρηνια κύτταρα από 172 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος τα οποία καλλιεργήθηκαν χωρίς να προηγηθεί εμπλουτισμός (n=92) ή έπειτα από εμπλουτισμό του πληθυσμού τους σε MSCs με *RosetteSep* (n=80). Μόνο σε δύο περιπτώσεις ανά κατηγορία στάθηκε δυνατή η απομόνωση καθαρού πληθυσμού MSCs μετά από τρία *passages* ο οποίος διατηρήθηκε σε καλλιέργεια μέχρι το 6^ο *passage* οπότε και τα κύτταρα νεκρώθηκαν. Τα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος είχαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά

των MSCs, δηλαδή ατρακτοειδές σχήμα με σφαιρικό πυρήνα που περιέχει πολλούς και έντονα ορατούς πυρηνίσκους. Επιπλέον εξέφραζαν τους δείκτες επιφανείας των MSCs, CD105, CD90, CD51, CD29, CD44, CD117 αλλά και το τάξης I αντιγόνο του μείζονος συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (HLA class I) ενώ ήταν αρνητικά για τους δείκτες επιφανείας της αιμοποιητικής ή ενδοθηλιακής σειράς (CD64, CD3, CD62L, CD1a, CD133, CD34, HLA class II). Η RT-PCR έδειξε την έκφραση, από τα MSCs των γονιδίων πολυδυναμικότητας *Oct-4*, *Nanog* και *Rex-1* καθώς και των γονιδίων *FGF-2* και *LIF* που σχετίζονται με τις ιδιότητές τους. Όσον αφορά την ιδιότητα διαφοροποίησης των MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, στάθηκε αδύνατη η διαφοροποίησή τους σε λιποκύτταρα αν και διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς σε οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα.

Από τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, το εμπορικό kit *Mesencult* επέτρεψε τον ταχύτερο πολλαπλασιασμό (μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού, $PDT=123,7 \pm 22,3$ ώρες) των κυττάρων αλλά όχι και τη διατήρησή τους σε καλλιέργεια για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα (πλέον των 80 ημερών). Αντίθετα, καλλιέργειες των MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος διατηρήθηκαν σε α -MEM με 20% CBS για διάστημα μεγαλύτερο των πέντε μηνών αλλά παρουσίασαν μικρό ρυθμό πολλαπλασιασμού ($PDT= 187,5 \pm 8,9$ ώρες). Ενδιάμεσα χαρακτηριστικά είχαν οι καλλιέργειες σε α -MEM με 20% FBS όπου τα κύτταρα διατηρήθηκαν για 120 ημέρες και πολλαπλασιάζονταν γρήγορα ($PDT= 138,5 \pm 35,9$ ώρες). Ωστόσο με κανένα από τα παραπάνω υλικά δε βελτιώθηκαν τα ποσοστά επιτυχίας της απομόνωσης των MSCs από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα τα οποία παρέμειναν μεταξύ 2,1% και 3,6%

Σε αντίθεση με ότι παρατηρήθηκε στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα, η απομόνωση των MSCs από τον ομφάλιο λώρο ήταν 100% επιτυχής, τόσο με τη μέθοδο των ιστοκαλλιιεργειών όσο και με της ενζυματικής πέψης. Τα κύτταρα που απομονώνονταν μπόρεσαν να διατηρηθούν σε καλλιέργειες για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών όταν χρησιμοποιήθηκε α -MEM με 20% FBS ή 20% CBS και πολλαπλασιάζονταν ταχύτατα ($PDT 82.48 \pm 14.5$ και 111.4 ± 26.8 ώρες αντίστοιχα) ενώ το εμπορικό *Mesencult* αποδείχθηκε τελείως ακατάλληλο καθώς δεν επέτρεψε τη διατήρηση των κυττάρων για διάστημα μεγαλύτερο των 24 ημερών. Τα MSCs του ομφαλίου λώρου είχαν τα ίδια μορφολογικά, φαινοτυπικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά με αυτά του ομφαλοπλακουντιακού αίματος ενώ εξέφραζαν και αυτά τα γονίδια *Oct-4*, *Nanog*, *FGF-2* και *LIF*. Όσον αφορά στη δυνατότητα επικοινωνίας ικριωμάτων κολλαγόνου από αυτά τα κύτταρα διαπιστώθηκε ότι ενώ με την καλλιέργεια σε στατικές συνθήκες ο επικοινωνός περιορίστηκε στην επιφάνεια του ικριώματος (βάθος 150 μ m), η δυναμική καλλιέργεια επέτρεψε τη διείσδυση των κυττάρων στο ικρίωμα (βάθος 650 μ m).

Όταν επιχειρήθηκε η κρυοσυντήρηση των κυττάρων των πρωτογενών καλλιιεργειών MSCs του ομφαλίου λώρου που απομονώθηκαν είτε με ενζυματική πέψη ή με ιστοκαλλιιεργειες, διαπιστώθηκε ότι στο 100% των περιπτώσεων ανακτήθηκαν κύτταρα με βιωσιμότητα μεγαλύτερη του $71 \pm 17\%$ έπειτα από 1 εβδομάδα, 1 μήνα ή 6 μήνες κατάψυξης. Όταν καλλιιεργήθηκαν τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονταν με συγκρίσιμο (τόσο μεταξύ τους, όσο και με τις καλλιιεργειες πριν την κατάψυξη) ρυθμό, ενώ διατήρησαν όλα τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Από την άλλη πλευρά, η κρυοσυντήρηση εναιωρήματος κυττάρων που

ελήφθη από την ενζυματική πέψη του ομφαλίου λώρου, χωρίς να προηγηθεί καλλιέργεια, δεν ήταν επιτυχής καθώς σε κανένα από τα δείγματα που καταψύχθηκαν για 1 μήνα και μόλις στο 10% των δειγμάτων που καταψύχθηκαν για 1 εβδομάδα και 6 μήνες αναπτύχθηκαν κύτταρα, τα οποία όμως δεν πολλαπλασιάζονταν, στις καλλιέργειες. Η μέση βιωσιμότητα δε των κυττάρων κατά την απόψυξη ήταν χαμηλή ($53 \pm 19\%$, $62 \pm 25\%$ και $49 \pm 22\%$ μετά από 1 εβδομάδα, 1 μήνα ή 6 μήνες κατάψυξης αντίστοιχα). Παράλληλα στάθηκε αδύνατη και η απομόνωση MSC από κρυοσυντηρημένα ιστοτεμάχια ομφαλίου λώρου ανεξαρτήτως της διάρκειας κρυοσυντήρησης.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων:

- Προέκυψε ότι MSCs υπάρχουν στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα αλλά η συστηματική απομόνωσή τους είναι ανέφικτη με τις μεθόδους που διαθέτουμε αυτή τη στιγμή. Θεωρούμε ότι η διαπίστωση αυτή, στο μεγαλύτερο δείγμα (268 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος) που έχει χρησιμοποιηθεί έως σήμερα, ξεκαθάρισε οριστικά το νεφελώδες τοπίο το οποίο είχε προκύψει από δημοσιεύσεις μελετών (σε μικρά δείγματα) με αντικρουόμενα αποτελέσματα.
- Διαπιστώθηκε η ευκολία απομόνωσης MSCs από τη Βαρτόνιο γέλη του ομφαλίου λώρου. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν διαφορές στη δυνατότητα διαφοροποίησής τους σε σχέση με αυτά των ενηλίκων, διαφορές οι οποίες σχετίζονται με την εμβρυική προέλευσή τους και την «νεαρή» τους ηλικία.
- Αποδείχθηκε ότι τα MSCs του ομφαλίου λώρου μπορούν να αποικήσουν ικρίωματα κολλαγόνου και θα μπορούσαν πιθανότατα να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση των κατασκευών ιστομηχανικής που έως τώρα στηρίζονται αποκλειστικά στην προμήθεια πιο «γηρασμένων» MSCs από ιστούς ενηλίκων.
- Σχεδιάστηκε μελετήθηκε και επικυρώθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης και κρυοσυντήρησης των κυττάρων αυτών με σκοπό τη μελλοντική τους χρήση για κλινικές εφαρμογές, γεγονός που επέτρεψε τη δημιουργία της πρώτης Τράπεζας Μεσεγχυματικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.
- Διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια εμβρυικών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων μπορεί να γίνει χωρίς τη χρήση ζωικών ορών, χρησιμοποιώντας, για πρώτη φορά, ως υποκατάστατο τον ορό ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a special class of stem cells: in addition to their ability of self-renewal and their differentiation capacity into cells of mesodermal (mainly) origin, they exhibit an *in vivo* immunomodulatory activity. It is therefore considered that MSCs could contribute to clinical applications of regenerative medicine, gene therapy or because of their trophic role in advanced cellular therapies. However, it has been shown that stem cells isolated from adult tissues, are "aged" and thus show decreased proliferative capacity and limited functionality, whilst they may maintain a "genetic memory" of their tissue of origin.

The aim of this thesis was to determine whether the umbilical cord blood and umbilical cord tissue, could serve as sources of MSCs for clinical applications.

During this study, cells isolated from the umbilical cord blood by gradient centrifugation, either with or without prior enrichment of the MSCs population using the commercial formulation RosetteSep, as well as cells isolated from the umbilical cord tissue following enzymatic digestion (collagenase and hyaluronidase) or explant cultures, were extensively cultured in different conditions. Specifically, two different culture media were tested: a commercial kit for culturing MSCs and α -MEM supplemented with either animal fetal bovine serum (FBS) or with human cord blood serum (CBS). For the phenotypic characterization of MSCs, their immune phenotype was checked using flow cytometry and the expression of pluripotency genes was verified by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). In parallel, the cells differentiation potential was evaluated through culture in media inducing osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis. The differentiated cells were detected using the appropriate staining. In a second time, we studied the effect of freezing of umbilical cord MSCs, at different intervals of cryopreservation. The characteristics and properties of the cryopreserved cells were evaluated with the aforementioned methods. Finally, we investigated the possibility of populating collagen scaffolds with MSCs in cell-scaffold co-cultures under static and dynamic conditions.

Mononuclear cells from 172 cord blood units were cultured without prior enrichment (n = 92) or after enrichment of the MSCs population using RosetteSep (n = 80). Only in two cases per category, it was possible to isolate a pure population of MSCs on the third passage. Cells were maintained in culture up to the 6th passage when their necrosis was observed. The cord blood MSCs had all the morphological characteristics of MSCs, i.e. spindle-like shape with a spherical nucleus containing many strongly visible nucleoli. Furthermore they were expressing the MSCs surface markers, CD105, CD90, CD51, CD29, CD44, CD117 and the class I antigen of the major histocompatibility complex (HLA class I) while they were negative for the surface markers of hematopoietic or endothelial cells (CD64, CD3, CD62L, CD1a, CD133, CD34, HLA class II). The RT-PCR showed expression in the MSCs of Oct-4, Nanog, and Rex-1 pluripotency-related genes as well as the FGF-2 and LIF genes which relate to MSC properties. Regarding their differentiation potential, cord blood MSCs could not differentiate into adipocytes although they successfully differentiated into osteocytes and chondrocytes.

Of the different culture media compared in this thesis, the off-the-shelf Mesencult complete medium, allowed for faster cell proliferation (average population doubling time, PDT = $123,7 \pm 22,3$ hours) but did not permit not keeping them in culture for extended periods of time (more than 80 days). In contrast, cultures of cord blood MSCs were maintained in α -MEM with 20% CBS for more than five months but showed slow proliferation rate (PDT = $187,5 \pm 8,9$ hours). Intermediate characteristics were observed in cultures in α -MEM with 20% FBS wherein the cells were maintained for 120 days, and proliferated rapidly (PDT = $138,5 \pm 35,9$ hours). However, none of the above materials improved success rates of isolation of MSCs from umbilical cord blood, which remained very low, between 2.1% and 3.6%.

Unlike what was observed in the cord blood, isolation of MSCs from the umbilical cord tissue was 100% successful, either using the explant or enzymatic digestion methods. The isolated cells could be maintained in culture for more than three months when α -MEM was used supplemented with 20% FBS or 20% CBS and they proliferated rapidly (PDT 82.48 ± 14.5 and 111.4 ± 26.8 hours, respectively). On the contrary, the off-the-shelf Mesencult proved completely unsuitable as it enabled the preservation of the cells in culture for no longer than 24 days. The umbilical cord MSCs had the same morphological, phenotypic and immunophenotypic characteristics as those of cord blood origin, while expressing the genes Oct-4, Nanog, FGF-2 and LIF. With regard to the possibility of populating collagen scaffolds by these cells, it was observed that in stationary conditions the homing confined to the surface of the scaffold (depth 150mm), while in dynamic cultures allowed better penetration of cells into the scaffold (depth 650mm).

When we attempted cryopreservation of primary cultures of MSCs isolated from the umbilical cord either by enzymatic digestion or by explant cultures, we observed a cell recovery in 100% of the cases. Thawed cells viability was greater than $71 \pm 17\%$ after 1 week, 1 month or 6 months in liquid nitrogen storage. When plated, these cells proliferated in comparable rates (both between themselves and with the cultures prior to freezing), and maintained all of the aforementioned characteristics and properties. On the other hand, cryopreservation of cell suspensions obtained by enzymatic digestion of the umbilical cord without prior culture, was unsuccessful: in none of the samples cryopreserved for 1 month and only in 10% of the samples cryopreserved for 1 week 6 months have we been able to observe adherent cells (which did not proliferate) when the thawed samples were put into culture. Additionally the mean cell viability at thawing was low ($53 \pm 19\%$, $62 \pm 25\%$ and $49 \pm 22\%$ after 1 week, 1 month or 6 months cryopreservation respectively). Finally it was impossible to isolate MSCs from tissue fragments of cryopreserved umbilical cord irrespective of the duration of cryopreservation.

From the analysis of the results:

- It became apparent that MSCs exist in cord blood but their systematic isolation is impossible with the methods available at the moment. We believe that this finding, based on the largest sample (268 cord blood units) studied to date, finally clarified the cloudy landscape which had arisen from previously published studies (in small samples) with conflicting results.

- We confirmed the ease of MSCs isolation from umbilical's cord Wharton's. These cells exhibit differences in their ability to differentiate with respect to those of adults, differences, related to their foetal origin and their "young" age.
- We used for the first time umbilical cord MSCs to colonize collagen scaffolds and showed that these cells could be used as an alternative for tissue engineered constructs, insofar based on the supply of more "aged" adult MSCs.
- We, designed, studied and validated an isolation and cryopreservation protocol of these cells, with a view to their future use for clinical applications, thus enabling the creation of the first Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Bank, in the Biomedical Research Foundation, Academy of Athens.
- It was shown that culturing foetal mesenchymal stem cells can be achieved without the use of animal sera, using as a substitute, for the first time, the cord blood serum.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

B cells	: B Lymphocytes	B – λεμφοκύτταρα
BSA	: <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin	Αλβουμίνη ορού βοός
CBS	: <u>C</u> ord <u>B</u> lood <u>S</u> erum	Ορός ομφαλοπλακουντιακού αίματος
CFU-F	: <u>C</u> olony- <u>F</u> orming <u>U</u> nits <u>F</u> ibroblast	Μονάδες σχηματισμού αποικίας ινοβλαστών
CPD	: <u>C</u> itrate <u>P</u> hosphate <u>D</u> extrose	Κιτρική φωσφορική δεξτρόζη
DCs	: <u>D</u> endritic <u>C</u> ells	Δενδριτικά κύτταρα
• pDC	: <u>P</u> lasmatocytoid -	Πλασματοκυτταροειδή -
DMSO	: <u>D</u> imethylsulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
dH₂O	: Demineralized Water	Απιονισμένο νερό
DNA	: <u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNase	: Deoxyribonuclease	Δεοξυριβονουκλεάση
dNTP	: <u>d</u> eoxy - Ribonucleotides <u>T</u> riphosphate	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
EAE	: <u>E</u> xperimental <u>A</u> llergic <u>E</u> ncephalitis	Αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα
EBSS	: <u>E</u> arl's <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution	Ρυθμιστικό διάλυμα του Earl
EDTA	: <u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> ctic Acid	(Αιθυλο-1,2-διάμινο)-τετραοξικό οξύ
EGF	: <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FBS	: <u>F</u> oetal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum	Εμβρυϊκός ορός βοός
FCS	: <u>F</u> oetal <u>C</u> alf <u>S</u> erum	Εμβρυϊκός ορός μώσχου
FITC	: <u>F</u> luoresceine <u>I</u> sothi <u>c</u> yanate	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
FGF-2	: Basic <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας
GAPDH	: <u>G</u> lycer <u>a</u> ldehyde 3- <u>P</u> hosphate <u>D</u> e <u>h</u> ydrogenase	Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης
GvHD	: <u>G</u> raft <u>v</u> ersus <u>H</u> ost <u>D</u> isease	Νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή
HLA	: <u>H</u> uman <u>L</u> eukocyte <u>A</u> ntigen	Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
HSC	: <u>H</u> aematopoietic <u>S</u> tem <u>C</u> ells	Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα
IFN-γ	: <u>I</u> nter <u>f</u> eron-γ	Ιντερφερόνη-γ
IGF	: <u>I</u> nsulin-like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας
IL	: <u>I</u> nter <u>l</u> eukin	Ιντερλευκίνη
iPSC	: <u>I</u> nduced <u>P</u> luripotent <u>S</u> tem <u>C</u> ells	Επαγόμενα ποικιλοδύναμα βλαστικά κύτταρα
ISCT	: <u>I</u> nternational <u>S</u> ociety of <u>C</u> ell <u>T</u> herapy	Διεθνής Οργανισμός Κυτταρικής Θεραπείας
LIF	: <u>L</u> eukemia <u>I</u> nhibitory <u>F</u> actor	Ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας
MCM	: <u>M</u> esencult <u>C</u> omplete <u>M</u> edium	Πλήρες μέσο Mesencult
α-MEM	: Eagle's <u>a</u> lpha Modified <u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium	Ελάχιστο βασικό μέσο του Eagle, α τροποποίηση
MHC	: <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

MNC	:	M ononucleated C ells	Μονοπύρρηνα κύτταρα
MSC	:	M esenchymal S tem C ells	Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα
• WJ-	:	Wharton's Jelly MSC	- πηκτής του Wharton
o P-I	:	P rimoculture of isolation method I	Πρωτογενείς καλλιέργειες μεθόδου απομόνωσης I
o P-II	:	P rimoculture of isolation method II	Πρωτογενείς καλλιέργειες μεθόδου απομόνωσης II
o FP-I	:	F rozen P rimoculture of isolation method I	Κατεψυγμένες πρωτογενείς καλλιέργειες μεθόδου απομόνωσης I
o FP-II	:	F rozen P rimoculture of isolation method II	Κατεψυγμένες πρωτογενείς καλλιέργειες μεθόδου απομόνωσης II
o F	:	F rozen	Κατεψυγμένα
NK	:	N atural K iller Cells	Κύτταρα φυσικοί φονείς
NGF	:	N erve G rowth F actor	Αυξητικός Παράγοντας Νεύρων
PBS	:	P hosphate B uffered S aline	Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
PC-5	:	P hycoerythrine C yanine - 5	Φυκοερυθρίνη/κυανίνη – 5
PCR	:	P olymerase C hain R eaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDT	:	P opulation D oubling T ime	Χρόνος διπλασιασμού των (κυτταρικών) πληθυσμών
PE	:	P hycoerythrine	Φυκοερυθρίνη
RNA	:	R ibonucleic A cid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNase	:	R ibonuclease	Ριβονουκλεάση
RT	:	R everse T ranscription	Αντίστροφη μεταγραφή
SDF-1	:	S tromal Cell- D erived F actor - 1	Παράγοντας κυττάρων στρώματος - 1
TNF	:	T umor N ecrosis F actor	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
T cells	:	T Lymphocytes	T – λεμφοκύτταρα
• CTL	:	C ytotoxic T Lymphocytes	Κυτταροτοξικά -
• TH2	:	T Helper 2	Βοηθητικά
• Treg	:	T R egulatory Lymphocytes	Ρυθμιστικά
TGF-β1	:	T ransforming G rowth F actor β1	Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β1
TLR	:	T oll- L ike R eceptors	Toll-Like Υποδοχείς
VEGF	:	V ascular E ndothelial G rowth F actor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VSEs	:	V ery S mall E mbryonic- L ike Stem Cells,	Πολύ μικρά εμβρυονικοειδή βλαστικά κύτταρα
O.Λ	:		Ο μφάλιος Λ ώρος
ΚΝΣ	:		Κ εντρικό Ν ευρικό Σ ύστημα

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	V
ABSTRACT	VIII
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	XI
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	XIII

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ - ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	2
1. Βλαστικά Κύτταρα - Ορισμός	2
2. Κατηγοριοποίηση των Βλαστικών Κυττάρων	3
2.1. Κατηγοριοποίηση βάσει δυναμικότητας διαφοροποίησης	3
2.1.1. Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα	3
2.1.2. Ποικιλοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα	4
2.1.3. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα	5
2.1.4. Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα	6
2.1.5. Μονοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα	6
2.1.6. Πρόδρομα ή Προγονικά Κύτταρα	6
2.2. Κατηγοριοποίηση βάσει προέλευσης	7
2.2.1. Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα	7
2.2.2. Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα	8
2.2.3. Βλαστικά Κύτταρα Ιστών Ενηλίκων	8
2.3. Διαφορές Εμβρυονικών, Εμβρυϊκών και Βλαστικών Κυττάρων Ενηλίκων	9
3. Διαφοροποίηση των Βλαστικών Κυττάρων	11
3.1. Υπερδιαφοροποίηση	13
3.2. Κυτταρική Σύντηξη	13
3.3. Τροφική δράση των Βλαστικών Κυττάρων	14
3.4. Αποδιαφοροποίηση – Επαναδιαφοροποίηση - Επαναπρογραμματισμός	14
4. Κλινικές εφαρμογές: από την πρώτη μεταμόσχευση στις προοπτικές του μέλλοντος	15
4.1. Βλαστικά Κύτταρα: μια διαδρομή πενήντα χρόνων	15
4.2. Το παρόν των Βλαστικών Κυττάρων	17
4.3. Μελλοντικές εφαρμογές των Βλαστικών Κυττάρων	18
4.4. Ποια κύτταρα και από ποιούς ιστούς;	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	22
1. Από τους «Ινοβλάστες» στα «Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα».	22

2.	Ορισμός - Μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά	22
3.	Ιδιότητες	23
3.1.	Αυτοανανέωση – Διαφοροποίηση	23
3.2.	Αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό σύστημα – Ανοσορρύθμιση	24
3.3.	Ο φυσιολογικός τους ρόλος	27
4.	Πηγές απομόνωσης των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων – Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα	29
4.1.	Πηγές Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων Ενηλίκων	29
4.1.1.	Ο μυελός των οστών	29
4.1.2.	Ο λιπώδης ιστός	30
4.1.3.	Το δόντι – Ο οδοντικός πολφός	31
4.2.	Πηγές Εμβρυικών Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	32
4.2.1.	Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα	32
4.2.2.	Ο ομφάλιος λώρος	32
4.2.3.	Το Αμνιακό Υγρό	33
5.	Κλινικές εφαρμογές	34
5.1.	Μεταμόσχευση	34
5.2.	Αυτοάνοσες παθήσεις	36
5.3.	Ιστική ανάπλαση	37
5.4.	Προοπτικές των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	39
6.	Περιορισμοί Στη Χρήση Των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	40
7.	Αντιμετώπιση των προβλημάτων στην «πηγή» τους	41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 43

1.	Σκοπός της μελέτης	43
----	--------------------	----

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 46

1.	Εξοπλισμός	46
2.	Συλλογή και μεταφορά βιολογικού υλικού	46
2.1.	Υλικά	46
2.2.	Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος για απομόνωση κυττάρων	47
2.3.	Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την παρασκευή ορού	48
2.4.	Συλλογή ομφαλίου λώρου	48
2.5.	Μεταφορά βιολογικού υλικού στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος	48
3.	Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα	49

3.1.	Υλικά	49
3.2.	Απομόνωση χωρίς εμπλουτισμό	49
3.3.	Εμπλουτισμός με RosetteSep®	50
4.	Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο	51
4.1.	Υλικά	51
4.2.	Παρασκευή διαλυμάτων	52
4.3.	Προετοιμασία ομφαλίου λώρου για την απομόνωση κυττάρων	52
4.4.	Μέθοδος απομόνωσης με ενζυματική πέψη	52
4.5.	Μέθοδος απομόνωσης με ιστοκαλλιέργειες	53
5.	Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας	54
5.1.	Υλικά	54
5.2.	Αυτόματη μέτρηση	54
5.3.	Μέτρηση με οπτικό μικροσκόπιο	55
6.	Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων ομφαλοπλακουντιακού αίματος και ομφαλίου λώρου	56
6.1.	Υλικά	56
6.2.	Παρασκευή διαλυμάτων	56
6.3.	Κυτταροκαλλιέργεια	58
6.4.	Αποκόλληση κυττάρων και ανακαλλιέργεια	58
6.5.	Υπολογισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων	59
7.	Κατάψυξη ιστοτεμαχίων ομφαλίου λώρου και Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου	59
7.1.	Υλικά	59
7.2.	Παρασκευή διαλυμάτων	60
7.3.	Κατάψυξη ιστοτεμαχίων	60
7.4.	Κατάψυξη κυττάρων	61
8.	Απόψυξη ιστοτεμαχίων ομφαλίου λώρου και Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου	61
8.1.	Υλικά	61
8.2.	Απόψυξη και πλύση ιστοτεμαχίων	62
8.3.	Απόψυξη και πλύση των κυττάρων	62
9.	Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων με κυτταρομετρία ροής	64
9.1.	Υλικά	64
9.2.	Σήμανση των κυττάρων	64
9.3.	Λήψη και ανάλυση αποτελεσμάτων	64
10.	Επαγόμενη διαφοροποίηση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	65
10.1.	Υλικά	65
10.2.	Προετοιμασία αντιδραστηρίων	66
10.3.	Προετοιμασία θρεπτικών υλικών διαφοροποίησης	66

10.4.	Οστεογενής και λιπογενής διαφοροποίηση	67
10.5.	Χονδρογενής διαφοροποίηση	67
11.	Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης	68
11.1.	Υλικά	68
11.2.	Προετοιμασία διαλυμάτων	69
11.3.	Προετοιμασία πηκτωμάτων αгарόζης	70
11.4.	Εξαγωγή ολικού κυτταρικού RNA	70
11.5.	Σύνθεση cDNA από το κυτταρικό RNA	71
11.6.	Ενίσχυση cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	72
11.7.	Ηλεκτροφόρηση cDNA και ανάγνωση αποτελεσμάτων	73
12.	Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου σε ικρίωματα	74
12.1.	Υλικά	74
12.2.	Στατική καλλιέργεια	74
12.3.	Δυναμική καλλιέργεια	74
13.	Κυτταροϊστοχημικές μέθοδοι	75
13.1.	Υλικά	75
13.2.	Εγκλεισμός σε παραφίνη	76
13.3.	Τομές παραφίνης και αποπαραφίνωση	77
13.4.	Χρώση von Kossa	78
13.4.1.	Μέθοδος χρώσης	78
13.5.	Χρώση Alizarin Red S	78
13.5.1.	Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής	78
13.5.2.	Μέθοδος χρώσης	79
13.6.	Χρώση Oil-Red-O	79
13.6.1.	Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής	79
13.6.2.	Μέθοδος χρώσης	79
13.7.	Χρώση Sudan IV	80
13.7.1.	Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής	80
13.7.2.	Μέθοδος χρώσης	80
13.8.	Χρώση Toluidine Blue	80
13.8.1.	Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής	80
13.8.2.	Μέθοδος χρώσης	80
13.9.	Χρώση Alcian Blue	80
13.9.1.	Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής	81
13.9.2.	Μέθοδος χρώσης	81
13.10.	Αιματοξυλίνη ηωσίνη	81
13.10.1.	Μέθοδος χρώσης	81
13.10.2.	Χρώση Giemsa	81
13.10.3.	Μέθοδος χρώσης	82

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	84
1. Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος	84
2. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	85
2.1. Απομόνωση χωρίς εμπλουτισμό	85
2.2. Εμπλουτισμός με RosetteSep®	85
2.3. Ποιοτική σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης	85
3. Καλλιέργειες Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	89
4. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος	91
4.1. Ανοσοφαινότυπος	92
4.2. Γονιδιακή έκφραση	94
4.3. Ελεγχόμενη <i>in vitro</i> διαφοροποίηση	95
5. Επίδραση του θρεπτικού υλικού	98
5.1. Στις καλλιέργειες Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος	98
5.2. Στα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ	104
1. Συλλογή ομφαλίου λώρου	104
2. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	104
2.1. Απομόνωση με ενζυματική πέψη του ομφαλίου λώρου	104
2.1.1. Επιλογή θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφαλίου λώρου	104
2.2. Απομόνωση με ιστοκαλλιέργειες του ομφαλίου λώρου	107
2.3. Σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο	108
2.3.1. Επίδραση της μεθόδου απομόνωσης στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων	114
2.3.2. Επίδραση της μεθόδου απομόνωσης στις ιδιότητες των κυττάρων	114
2.4. Απομόνωση από κατεψυγμένο ομφάλιο λώρο	116
3. Κατάψυξη Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου	118
3.1. Χαρακτηριστικά καλλιεργειών κρυοσυντηρημένων κυττάρων	118
3.2. Ανοσοφαινότυπος κρυοσυντηρημένων κυττάρων	126
3.3. Γονιδιακή έκφραση κρυοσυντηρημένων κυττάρων	128
3.4. Ελεγχόμενη <i>in vitro</i> διαφοροποίηση κρυοσυντηρημένων κυττάρων	129

3.4.1.	Οστεογενής διαφοροποίηση	129
3.4.2.	Χονδρογενής διαφοροποίηση	129
3.4.3.	Λιπογενής διαφοροποίηση	134
4.	Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου σε ικρίωματα κολλαγόνου	134
4.1.	Στατικές καλλιέργειες σε ικρίωματα κολλαγόνου	134
4.2.	Δυναμικές καλλιέργειες σε ικρίωματα κολλαγόνου	134

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	140
1. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα ως πηγή απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων.	140
1.1. Αποτελεσματικότητα των μεθόδων απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα	140
1.2. Χαρακτηριστικά των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος	142
1.3. Σύγκριση θρεπτικών υλικών για την καλλιέργεια των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος	144
2. Ο ομφάλιος λώρος ως πηγή απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων.	147
2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου	147
2.2. Σχεδιασμός, υλοποίηση και επικύρωση, πρωτοκόλλου κρυοσυντήρησης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου.	148
2.2.1. Σύγκριση μεθόδων απομόνωσης	149
2.2.2. Κρυοσυντήρηση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου	151
2.3. Επικοισμός ικριωμάτων κολλαγόνου από Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα του ομφαλίου λώρου	154
3. Συμπεράσματα	155
4. Μελλοντικές προοπτικές	155

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	158
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: ΜΟΝΑΔΕΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΩΝΩΣΗ MSCs	174

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΜΟΝΑΔΕΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ	
ΜΕΛΕΤΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	180
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ	183
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V: ΣΥΛΛΟΓΕΣ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ	184
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI: ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII: ΔΕΙΓΜΑ ΣΥΝΑΙΝΕΣΗΣ	187

ΣΤ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

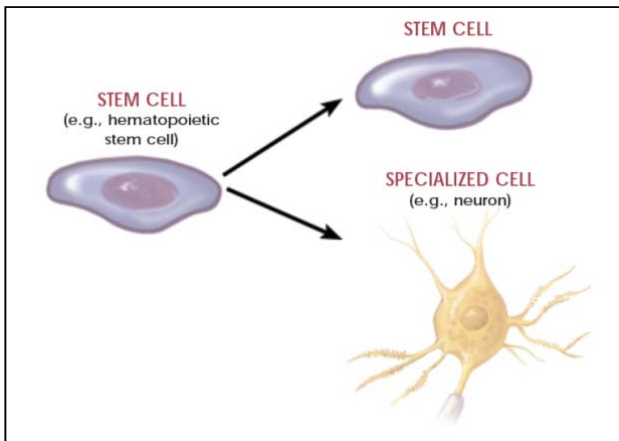
1. Πρωτότυπες δημοσιεύσεις σε ξένα περιοδικά με κριτές	194
2. Βιβλία – Κεφάλαια σε βιβλία	194
3. Ανηρτημένες ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια	194

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ - ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1. Βλαστικά Κύτταρα - Ορισμός

Τα «Βλαστικά Κύτταρα» (*stem cells*) είναι μια ειδική κατηγορία κυττάρων που έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία είκοσι τουλάχιστον χρόνια. Ο αυξημένος όμως όγκος πληροφοριών, από πολλές και διαφορετικές πηγές, προκαλεί σύγχυση με αποτέλεσμα να μην είναι ξεκάθαρο σε ποιά κατηγορία κυττάρων θα αποδίδεται ο όρος «Βλαστικό». Πράγματι η χρήση του όρου γίνεται πολλές φορές αυθαίρετα και άστοχα. Σήμερα όμως, είναι πλέον γνωστό ότι θα καθορίζονται σαν «Βλαστικά» εκείνα τα κύτταρα που έχουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης και που διαφοροποιούνται σε κάποια από τα περίπου 200 διαφορετικά είδη κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού (Εικόνα I-1). Τα περισσότερα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος είναι διαφοροποιημένα και



Εικόνα I-1: Το βλαστικό κύτταρο ανανεώνεται δίνοντας ένα όμοιο κύτταρο ενώ μπορεί να διαφοροποιηθεί σε ώριμο κύτταρο (2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)

επιτελούν συγκεκριμένη λειτουργία (π.χ. λεία μυϊκή ίνα, ηπατοκύτταρο, οστεοκύτταρο). Αντίθετα τα βλαστικά κύτταρα, με την εξαιρετική δυνατότητα πολλαπλασιασμού τους και λόγω του γεγονότος ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λειτουργικά κύτταρα ιστών, είναι μοναδικά. Για το λόγο αυτό αποτελούν αντικείμενο έντονης επιστημονικής έρευνας

με απώτερο τελικό σκοπό να καταστεί δυνατή η χρησιμοποίησή τους στην αποκατάσταση και αναγέννηση ιστών καθώς και στην αποτελεσματική αντιμετώπιση ποικίλων γενετικών και μεταβολικών νοσημάτων. Έτσι, ενώ αρχικά τα βλαστικά κύτταρα αποτελούσαν αντικείμενο σχεδόν αποκλειστικά της αναπτυξιακής βιολογίας, σήμερα στρέφεται στη μελέτη τους μεγάλος αριθμός βιολογικών και ιατρικών ειδικοτήτων. Ταυτόχρονα αυξάνονται με ταχείς ρυθμούς οι κλινικές εφαρμογές τους και πολύ συχνά το κέντρο βάρους μεταφέρεται με γρήγορους ρυθμούς από το εργαστήριο στην κλινική. Ορισμένες χρήσεις των βλαστικών κυττάρων βρίσκονται σε στάδιο κλινικής μελέτης, όπως για παράδειγμα η χρήση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε αυτοάνοσες παθήσεις, ενώ κάποιες άλλες, όπως είναι η μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, έχουν ήδη ενταχθεί στην καθημερινή ιατρική

πρακτική. Δυστυχώς όμως οι γνώσεις σχετικά με τη βιολογία τους δεν συμβαδίζουν πάντα με την ανάγκη για άμεση εφαρμογή. Έτσι παρατηρείται συχνά το φαινόμενο να τους αποδίδονται ιδιότητες ατεκμηρίωτες και γενικότερα καλλιεργείται η άποψη, ακόμα και από έγκριτους επιστήμονες, ότι στο προσεχές μέλλον θα αποτελέσουν πανάκεια για πολλά, άλυτα μέχρι τώρα, προβλήματα υγείας. Για το λόγο αυτό η βασική έρευνα οφείλει να βοηθήσει να συμπληρωθούν τα γνωστικά κενά και να οργανώσει τις πληροφορίες κατά τέτοιον τρόπο ώστε η κλινική πρακτική να αποτελεί φυσική συνέχεια και εφαρμογή της παρατήρησης στο εργαστήριο και όχι το αντίστροφο.

2. Κατηγοριοποίηση των Βλαστικών Κυττάρων

Η κατηγοριοποίηση των βλαστικών κυττάρων γίνεται με δύο τρόπους:

- A) Με βάση τη δυναμικότητα διαφοροποίησης
- B) Με βάση την προέλευσή τους

2.1. Κατηγοριοποίηση βάσει δυναμικότητας διαφοροποίησης

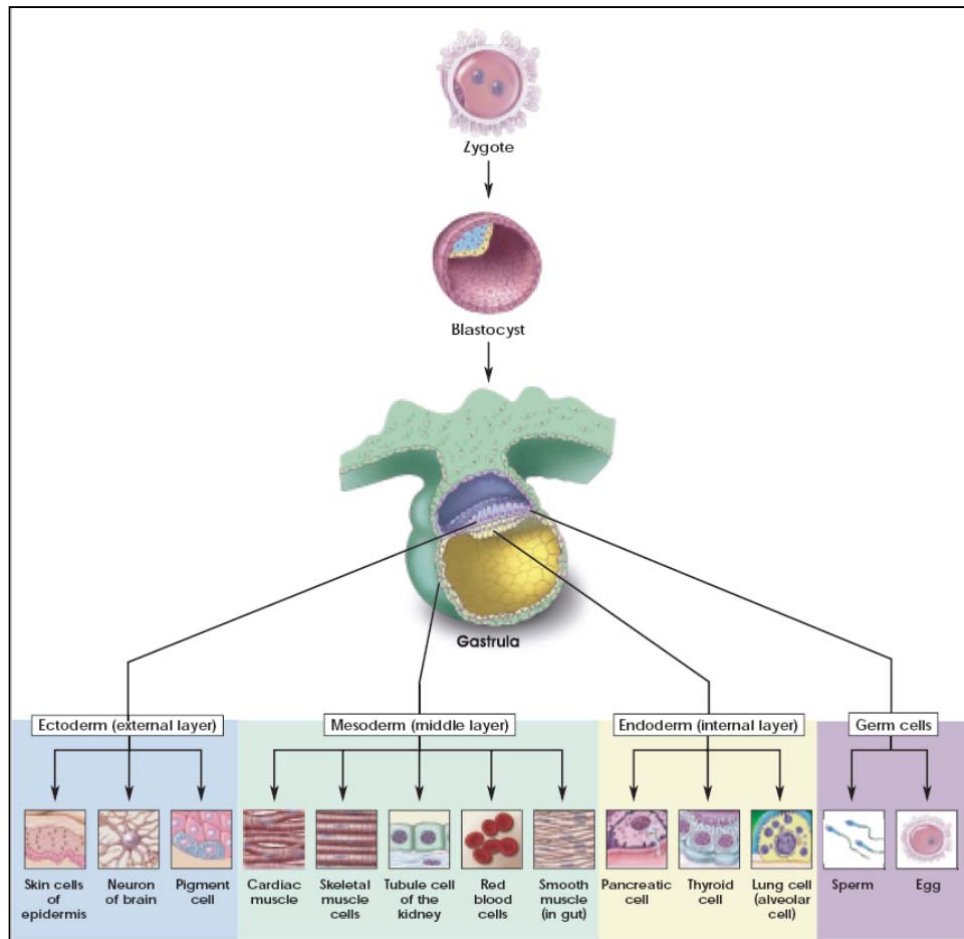
Σήμερα τείνει να επικρατήσει η κατάταξη των βλαστικών κυττάρων με βάση τη δυναμικότητα (*potency*) διαφοροποίησης που τα χαρακτηρίζει. Έτσι, η επικρατούσα ονοματολογία των βλαστικών κυττάρων, όπως αυτή έχει δημοσιευθεί πρόσφατα από τον Smith (Smith A, 2006) έχει ως εξής:

- Ολοδύναμα
- Ποικιλοδύναμα
- Πολυδύναμα
- Ολιγοδύναμα
- Μονοδύναμα
- Πρόδρομα ή προγονικά

2.1.1. Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Ολοδύναμο Βλαστικό Κύτταρο (*totipotent stem cell*) είναι αυτό που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που αποτελούν τον οργανισμό αλλά και σε αυτούς που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του εμβρύου. Μοναδικό πραγματικά ολοδύναμο κύτταρο είναι το ζυγωτό αφού από αυτό προέρχονται όλοι οι ιστοί του οργανισμού καθώς και ο πλακούντας, ο ομφάλιος λώρος και το αμνιακό επιθήλιο. Το ζυγωτό βρίσκεται στην κορυφή της πυραμίδας της οντογένεσης. Καθώς το έμβρυο αναπτύσσεται τα κύτταρα χάνουν σταδιακά την

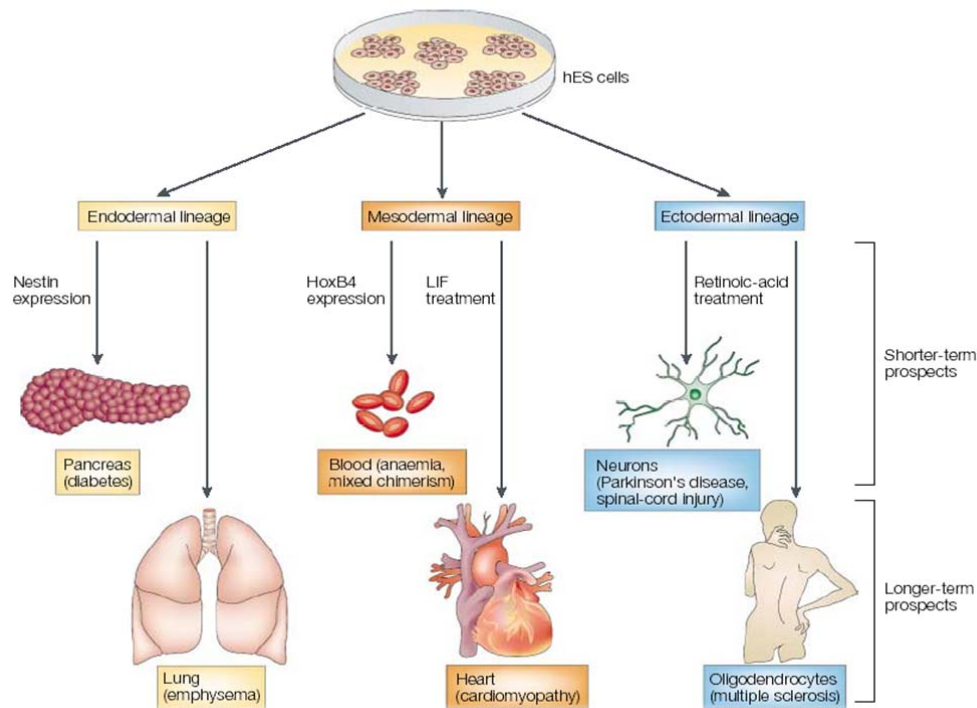
δυναμικότητα διαφοροποίησής τους και δεσμεύονται σε συγκεκριμένες οδούς που καταλήγουν σε διαφοροποιημένα κύτταρα (Εικόνα I-2).



Εικόνα I -2: Η διαφοροποίηση των ιστών του ανθρώπινου σώματος. Από το ζυγωτό θα προκύψουν όλα τα κύτταρα του οργανισμού.
(2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)

2.1.2. Ποικιλοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Ο όρος ποικιλοδύναμα (*pluripotent*) αποδίδεται στα βλαστικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν κύτταρα που ανήκουν και στις τρεις εμβρυϊκές στιβάδες: το μεσόδερμα, το εξώδερμα και το ενδόδερμα (Εικόνα I-3), αλλά όχι το τροφοεξώδερμα. Επιπλέον μπορούν να δώσουν γένεση σε σωματικά και γαμετικά κύτταρα χωρίς από μόνα τους να σχηματίζουν έμβρυο. Παράδειγμα αποτελούν τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (*Embryonic Stem Cells*), τα οποία απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (*inner mass*) της βλαστοκύστης. Συχνά ο όρος αποδίδεται, λανθασμένα, σε κύτταρα που απομονώνονται από εμβρυϊκούς ή ακόμα και από ενήλικες ιστούς χωρίς να πληρούν τις απαραίτητες



Εικόνα Ι-3: Τα ποικιλοδύναμα βλαστικά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικές σειρές που ανήκουν σε όλες τις κυτταρικές στιβάδες
Bradley JA et al. Nat Rev Immunol 2002, 2:859-871

προϋποθέσεις. Πράγματι για να αποδειχθεί ότι είναι ποικιλοδύναμη μια κυτταρική σειρά που μελετάται *in vitro* πρέπει τα κύτταρά της, αφού εμφυτευθούν στη βλαστοκύστη, να μπορούν να συμμετάσχουν στη δημιουργία ιστών και τον τριών εμβρυϊκών στιβάδων και κατά συνέπεια να εντοπίζονται κυτταρικοί τους απόγονοι σχεδόν σε όλους τους ιστούς του ολοκληρωμένου οργανισμού (Baker M, 2007; Smith KP et al., 2009). Ένας άλλος τρόπος για να αποδειχθεί αυτό το επίπεδο δυναμικότητας είναι η υποδότηση χορήγησή τους σε ανοσοκατεσταλμένα πειραματόζωα, οπότε τα ποικιλοδύναμα κύτταρα προκαλούν την ανάπτυξη τερατώματος στο οποίο αντιπροσωπεύονται και οι τρεις εμβρυϊκές στιβάδες. Δυστυχώς σε ελάχιστες από τις περιπτώσεις όπου κύτταρα αναφέρονται ως ποικιλοδύναμα έχουν προηγηθεί αυτοί οι έλεγχοι.

2.1.3. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Τα Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (*multipotent stem cells*) είναι ίσως η πιο μελετημένη κατηγορία απ' όλες. Ο όρος πολυδύναμο αποδίδεται στο κύτταρο που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς που ανήκουν συνήθως στον ίδιο ιστό και αυτά τα πολυδύναμα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν

τόσο από το έμβρυο όσο και από τον ενήλικα οργανισμό. Παράδειγμα πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων αποτελούν τα Αιμοποιητικά Βλαστικά Κύτταρα (*Haematopoietic Stem Cells* - HSC). Απομονώνονται τόσο από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, όσο και από το μυελό των οστών του ενήλικα. Είναι κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που αποτελούν το αίμα, δηλαδή τόσο σε κύτταρα της λεμφικής όσο και σε κύτταρα της μυελικής σειράς. Επίσης τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος δίνουν γένεση στην επιδερμίδα καθώς και στους θύλακες των τριχών. Είναι πιθανό κάποια πολυδύναμα κύτταρα να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πληθυσμούς και των τριών εμβρυϊκών στιβάδων όμως αυτά, σε αντίθεση με τα ποικιλοδύναμα βλαστικά κύτταρα, δεν έχουν τη δυνατότητα να δώσουν γένεση σε γαμέτες αλλά μόνο σε σωματικά κύτταρα.

2.1.4. Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

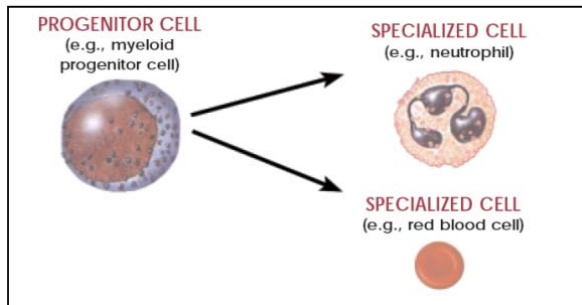
Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (*oligopotent stem cells*) είναι όρος που δεν χρησιμοποιείται συχνά και αναφέρεται συνήθως σε κύτταρα που απομονώνονται κυρίως από τον ενήλικα οργανισμό αλλά και από το έμβρυο. Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα εντοπίζονται στους περισσότερους ιστούς και όργανα όπως για παράδειγμα το μυϊκό ιστό, το κεντρικό νευρικό σύστημα το εντερικό επιθήλιο ή το θύλακα των τριχών (Fuchs E et al., 2004; Morrison SJ and Spradling AC, 2008). Στις περιοχές αυτές διατηρούνται σε αδιαφοροποίητη μορφή μέχρις ότου να χρειαστεί ανάπλαση κατεστραμμένου τμήματος του ιστού, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε περίπτωση τραυματισμού. Μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα του ιστού στον οποίο εντοπίζονται και ο κύριος ρόλος τους είναι να διατηρείται μια κυτταρική εφεδρεία ικανή να επιδιορθώσει τον ιστό. Καθώς όμως πληθαίνουν οι αναφορές ότι κύτταρα απομονωμένα από ιστούς του ενήλικα εμφανίζουν χαρακτηριστικά πολυδύναμων κυττάρων ο όρος ολιγοδύναμο τείνει να καταργηθεί.

2.1.5. Μονοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Τα Μονοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (*unipotent stem cells*) έχουν περιορισμένη δυναμικότητα και μπορούν να δώσουν γένεση σε μια και μόνο κυτταρική σειρά. Παράδειγμα αποτελούν τα σπερματογόνια και τα ωογόνια.

2.1.6. Πρόδρομα ή Προγονικά Κύτταρα

Αναφέρονται ως πρόδρομα (*precursor*) ή προγονικά (*progenitor*) τα μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα του εμβρύου και του ενήλικα οργανισμού. Είναι δεσμευμένα (*committed*) προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση και παρόλο που κατά τον πολλαπλασιασμό τους δίνουν γένεση σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα του



Εικόνα I-4: Το προγονικό κύτταρο είναι μερικώς διαφοροποιημένο και έχει μερικά χαρακτηριστικά κοινά με τα θυγατρικά του διαφοροποιημένα κύτταρα. Μπορεί μόνο να διαφοροποιηθεί και δεν αυτοανανεώνεται. (2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)

ιστού στον οποίο ανήκουν δεν έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης που χαρακτηρίζει τα βλαστικά κύτταρα. Παράδειγμα αποτελεί το κοινό προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς (*common myeloid progenitor*) από το οποίο προέρχονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια τα ουδετερόφιλα, τα κοκκιοκύτταρα

δηλαδή όλα τα κύτταρα που αποτελούν τη μυελική σειρά του αίματος (Εικόνα I-4). Συχνά υπάρχει η τάση ο όρος «προγονικό» να χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τα ολιγοδύναμα ή και τα πολυδύναμα κύτταρα των ιστών, όπως για παράδειγμα τα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα. Αυτά εντοπίζονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα του ΚΝΣ (είναι δηλαδή ολιγοδύναμα) για να αναγεννήσουν τον νευρικό ιστό. Για το λόγο αυτό αναφέρονται συχνά ως Νευρικά Προγονικά Κύτταρα παρόλο που έχουν την δυνατότητα αυτοανανέωσης. Στη σύγχυση συντελεί και το γεγονός ότι συχνά οι μελέτες γίνονται σε ανομοιογενείς και όχι σε πολύ καλά χαρακτηρισμένους πληθυσμούς. Έτσι πολλές φορές κρίνεται δόκιμη η ταυτόχρονη χρήση και των δύο όρων, δηλαδή βλαστικό/προγονικό κύτταρο, για να περιγραφούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο οι παρατηρήσεις.

2.2. Κατηγοριοποίηση βάσει προέλευσης

Η ταξινόμηση με βάση την προέλευση των βλαστικών κυττάρων περιλαμβάνει τρεις ομάδες: τα Εμβρυονικά, τα Εμβρυϊκά και τα Βλαστικά Κύτταρα Ιστών Ενηλίκων

2.2.1. Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα

Με τον όρο αυτό περιγράφονται αποκλειστικά τα κύτταρα που απομονώνονται από την εσωτερική μάζα της βλαστοκύστης. Πρόκειται για ποικιλοδύναμα κύτταρα που μπορούν να αυτοανανεώνονται για αόριστο, θεωρητικά, χρονικό διάστημα σε καλλιέργεια χωρίς να διαφοροποιούνται. Διατηρούν τη διπλοειδία τους και σταθερό αριθμό χρωμοσωμάτων ενώ, υπό κατάλληλες προϋποθέσεις, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικούς πληθυσμούς και των τριών εμβρυϊκών στιβάδων δίνοντας τόσο σωματικά κύτταρα όσο και γαμέτες. Ο όρος Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα έχει συχνά χρησιμοποιηθεί, λανθασμένα, για να

χαρακτηρίσει κύτταρα απομονωμένα από άλλους εμβρυϊκούς ιστούς όπως για παράδειγμα το αμνιακό επιθήλιο ή το εμβρυϊκό ήπαρ. Ωστόσο παρόλο που και αυτά προέρχονται από το έμβρυο ο δόκιμος όρος για να περιγραφούν είναι εμβρυϊκά (*foetal*) βλαστικά κύτταρα. Παρόλο που εμβρυονικά κύτταρα ποντικού καλλιεργούνται με ευκολία από το 1981 (Evans MJ and Kaufman MH, 1981; Martin GR, 1981), ανθρώπινα εμβρυονικά κύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν επιτυχώς για πρώτη φορά μόλις το 1998 από τον James Thomson (Thomson JA et al., 1998). Η κύρια δυσκολία έγκειται στη διατήρησή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ο μόνος τρόπος για να καλλιεργηθούν επιτυχώς τα εμβρυονικά κύτταρα είναι με τη χρήση τροφικής στιβάδας (*feeder layer* – Εικόνα I-5) από ινοβλάστες.

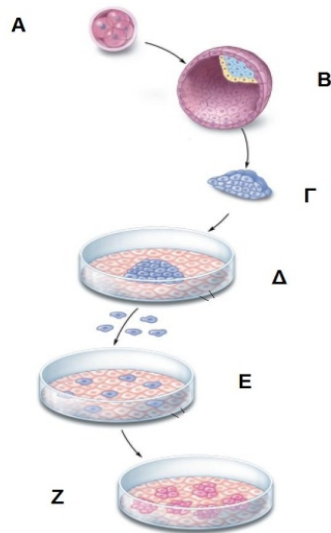
2.2.2. Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα

Εμβρυϊκά είναι τα βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από ιστούς και όργανα του εμβρύου. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο πλακούντας, το αμνιακό επιθήλιο, το αμνιακό υγρό και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα καθότι είναι όλα τους εμβρυϊκής προέλευσης. Απ' όλους αυτούς τους ιστούς έχουν κατά διαστήματα απομονωθεί βλαστικά κύτταρα που ως επί το πλείστον είναι πολυδύναμα. Για παράδειγμα από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα απομονώνονται τόσο αιμοποιητικά (Broxmeyer HE et al., 1989) όσο και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Erices A et al., 2000). Νευρικά βλαστικά κύτταρα έχουν απομονωθεί από εγκεφάλους εμβρύων (Uchida N et al., 2000) ενώ από το ήπαρ εμβρύων απομονώθηκαν πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αλλά και πρόδρομα ηπατοκύτταρα (McCune JM et al., 1988; Namikawa R et al., 1990). Στο αμνιακό επιθήλιο εντοπίστηκαν κύτταρα ικανά να διαφοροποιηθούν σε νευρικά (McLaughlin D et al., 2006) και στο αμνιακό υγρό περιγράφηκαν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Tsai MS et al., 2004).

2.2.3. Βλαστικά Κύτταρα Ιστών Ενηλίκων

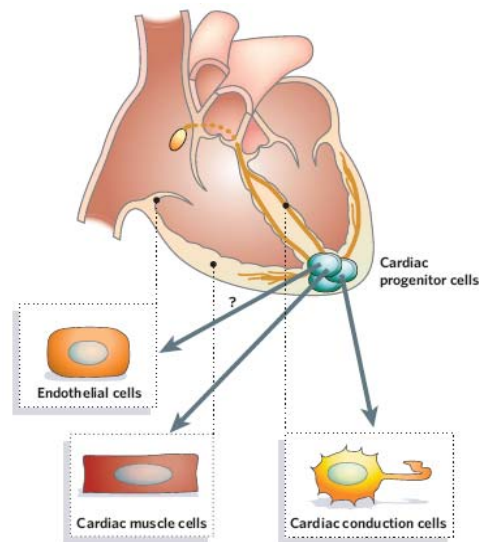
Τα τελευταία χρόνια εντοπίζονται βλαστικά κύτταρα και στους ιστούς των ενηλίκων. Η ύπαρξη αιμοποιητικών κυττάρων στον μυελό των οστών είναι γνωστή από το 1961 (Becker AJ et al., 1963; Till JE and McCulloch EA, 1961) ενώ μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν από την ίδια πηγή το 1966 (Friedenstein AJ et al., 1970; Friedenstein AJ et al., 1968; Friedenstein AJ et al., 1966). Ωστόσο, η ύπαρξη βλαστικών κυττάρων στο ήπαρ, στο μυοκάρδιο (Εικόνα I-6), στους σκελετικούς μύες, στο κεντρικό νευρικό σύστημα ακόμα και στο περιφερικό αίμα διαπιστώθηκαν προς τα τέλη του 20^{ου} αιώνα (Fuchs E et al., 2004; Morrison SJ and Spradling AC, 2008). Η δυναμικότητα αυτών των βλαστικών κυττάρων διαφέρει

ανάλογα από την πηγή από την οποία απομονώνονται. Σημειώνεται όμως ότι, ακόμα και για κύτταρα απομονωμένα από την ίδια πηγή, υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές ως προς τις ιδιότητές τους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι συχνά οι μεθοδολογίες που ακολουθούνται διαφέρουν και οι κυτταρικοί πληθυσμοί που απομονώνονται δεν είναι επαρκώς χαρακτηρισμένοι. Η άποψη που τείνει ωστόσο να επικρατήσει είναι ότι σε όλους τους ιστούς υπάρχει μια «αποθήκη» βλαστικών κυττάρων η οποία σε περίπτωση τραυματισμού ή καταστροφής του συγκεκριμένου ιστού, αναλαμβάνει την αναγέννησή του (Young HE et al., 2004).



Εικόνα Ι-5: Καλλιέργεια εμβρυονικών ποικυλοδύναμων κυττάρων. Το μορίδιο τεσσάρων κυττάρων (Α) καλλιεργείται μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης (Β). Αφαιρείται η εσωτερική μάζα (Γ) και καλλιεργείται πάνω σε τροφική στιβάδα ινοβλαστών (Δ). Στη συνέχεια τα κύτταρα απομακρύνονται, διαχωρίζονται και καλλιεργούνται σε νέα στιβάδα ινοβλαστών (Ε). Από αυτά θα ληφθούν αποικίες εμβρυονικών κυττάρων (Ζ) που μπορούν να καλλιεργηθούν για αόριστο χρονικό διάστημα.

(2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)



Εικόνα Ι-6: Καρδιακά Βλαστικά κύτταρα στο μυοκάρδιο που θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε καρδιακές μυϊκές ίνες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα που επάγουν την καρδιακή ώση. (Srivastava D and Ivey KN. Nature 2006; 441:1097-1099)

2.3. Διαφορές Εμβρυονικών, Εμβρυϊκών και Βλαστικών Κυττάρων Ενηλίκων

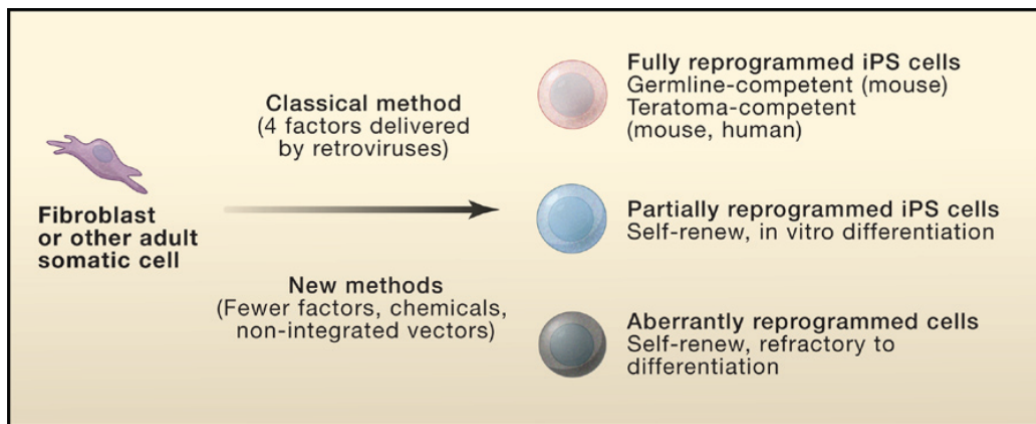
Η σχετική ευκολία που παρατηρείται σήμερα στην απομόνωση των βλαστικών κυττάρων οδηγεί στη γέννηση ποικίλων ερωτημάτων. Μερικά από αυτά τα ερωτήματα είναι: Όλα τα βλαστικά κύτταρα είναι ισοδύναμα; Εξυπηρετούν όλα τους ίδιους σκοπούς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλα με τον ίδιο τρόπο; Η απάντηση σε αυτές ερωτήσεις είναι αρνητική. Έτσι, τα εμβρυονικά κύτταρα είναι τα μόνα πραγματικά ποικυλοδύναμα κύτταρα και μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro*

σε σχεδόν όλους τους ιστούς του οργανισμού. Τη δυνατότητα αυτή δεν την έχουν τα εμβρυϊκά και τα βλαστικά κύτταρα από ιστούς ενηλίκων. Επίσης τα εμβρυϊκά κύτταρα διαφέρουν σε ένα μεγάλο ποσοστό από αυτά των ενηλίκων. Έτσι, τα HSC τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, απομονώνονται τόσο από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (εμβρυϊκά), όσο και από τον μυελό των οστών (ενηλίκων). Ανεξάρτητα από τη πηγή από την οποία προέρχονται τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά: έχουν την ίδια μορφολογία, τους ίδιους δείκτες επιφανείας και εκφράζουν τα ίδια γονίδια. Επίσης έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν στους ίδιους κυτταρικούς πληθυσμούς, δηλαδή σε όλα τα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς. Διαφέρουν όμως στην πολλαπλασιαστική τους ικανότητα καθώς και στην ταχύτητα με την οποία μεταναστεύουν από την περιφέρεια στον μυελό των οστών και εγκαθίστανται σε αυτόν έπειτα από μια μεταμόσχευση. Η πολύχρονη εμπειρία μεταμοσχεύσεων έχει δείξει ότι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αποκατάσταση της αιμοποίησης σε ασθενείς που έχουν λάβει HSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και σε εκείνους που έχουν λάβει HSC του μυελού των οστών δεν είναι ίδια. Συγκεκριμένα τα HSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος αργούν να εγκατασταθούν στο μυελό του δότη, γεγονός που μεταφράζεται σε καθυστερημένη αποκατάσταση του πληθυσμού των αιμοπεταλίων καθώς και σε καθυστερημένη αποκατάσταση του ανοσοποιητικού του συστήματος (Gluckman E et al., 2004; Gluckman E et al., 1997; Wagner JE et al., 2002). Από την άλλη πλευρά όμως τα HSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος παρουσιάζουν αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη αντιγονικότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα του μυελού των οστών (Lansdorp PM et al., 1993; Lu LL et al., 2006; Mayani H et al., 1993; Traycoff CM et al., 1994).

Σε άλλα είδη βλαστικών εμβρυϊκών κυττάρων οι διαφορές από τα αντίστοιχα κύτταρα των ενηλίκων είναι μεγάλες και δεν περιορίζονται μόνο στην πολλαπλασιαστική ικανότητα αλλά εκτείνονται και στη δυνατότητα διαφοροποίησης ή ακόμα και στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, στα βλαστικά κύτταρα που ευθύνονται για την αναγέννηση των γραμμωτών μυών, η δυνατότητα διαφοροποίησης σε μυοκύτταρα μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας, σε αντίθεση με τη δυνατότητα διαφοροποίησής τους σε ινώδη ιστό (Carosio S et al., 2011). Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα να είναι «πιο νεαρά» και με μεγαλύτερη δυνατότητα αυτοανανέωσης όσο και διαφοροποίησης. Αντίθετα τα βλαστικά κύτταρα του ενήλικα οργανισμού είναι πιο «γηρασμένα» και έχει ελαττωθεί η αρχική τους δυναμικότητα (Chambers SM et al., 2007; de Girolamo L et al., 2009; Ergen AV and Goodell MA, 2010; Mareschi K et al., 2006; Rossi DJ et al.,

2007). Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη αναγέννηση των κατεστραμμένων ιστών κατά τη νεαρή ηλικία, ένα χαρακτηριστικό που εξασθενεί με την πάροδο του χρόνου.

Τελευταία μια τεχνική επιχειρεί να γεφυρώσει τη διαφορά ανάμεσα στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και σε αυτά των ενηλίκων. Πρόκειται για τον επαναπρογραμματισμό των δερματικών σωματικών κυττάρων σε κύτταρα με χαρακτηριστικά εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που ονομάζονται «προκλητά ποικιλοδύναμα βλαστικά κύτταρα» (*induced pluripotent stem cells* – iPSCs) (Εικόνα Ι-7). Παρόλο που η δυνατότητα λήψης ποικιλοδύναμων κυττάρων από ενήλικα ιστό ανοίγει νέους ορίζοντες στις κυτταρικές θεραπείες, αυτή τη στιγμή είναι πολλά τα προβλήματα που πρέπει να λυθούν, και κυρίως θέματα που σχετίζονται με την ασφάλεια της χρήσης τους, πριν εμφανιστούν οι πρώτες κλινικές εφαρμογές των iPSCs (O'Malley J et al., 2009).

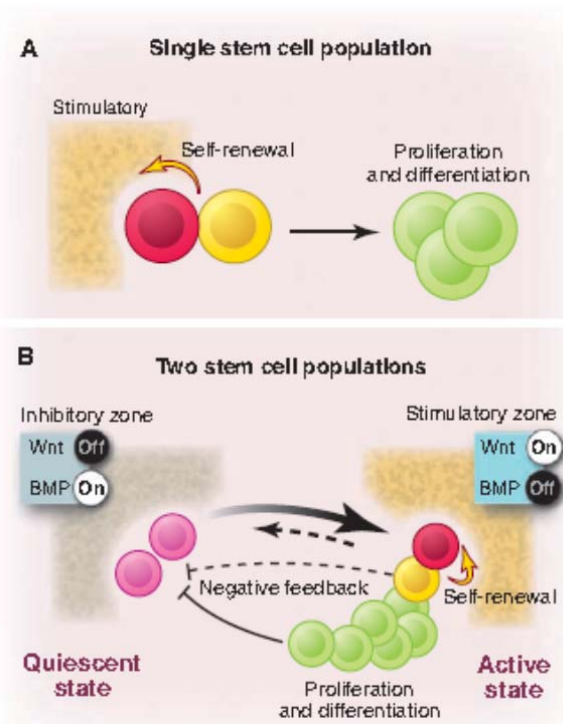


Εικόνα Ι-7.: Ο επαναπρογραμματισμός σωματικού κυττάρου σε iPSC μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Οι νεότερες μέθοδοι χρησιμοποιούν λιγότερους μεταγραφικούς παράγοντες και λιγότερα χημικά. Τα κύτταρα που προκύπτουν μπορεί να είναι λειτουργικά iPSCs ή να έχουν περιορισμένη ή καθόλου δυνατότητα διαφοροποίησης.
(Ensenat-Waser R. et al. *Fertility and Sterility* 2009; 91:971)

3. Διαφοροποίηση των Βλαστικών Κυττάρων

Δεν έχει, ακόμα, διασαφηνιστεί απόλυτα ο μηχανισμός με τον οποίο τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε λειτουργικά κύτταρα ιστών. Ειδικότερα, για τα ποικιλοδύναμα εμβρυονικά κύτταρα της βλαστοκύστης, πιστεύεται ότι η διαφοροποίηση σε ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς αποτελεί ουσιαστικά μονόδρομο, αφού πρόκειται για την αναμενόμενη φυσιολογική εξέλιξή τους. Κάτι τέτοιο όμως δεν φαίνεται να ισχύει για τα βλαστικά κύτταρα του εμβρύου ή των ενηλίκων αφού τα κύτταρα αυτά, στην πλειοψηφία τους, διατηρούνται σε μια

λανθάνουσα κατάσταση (*quiescent*) (Arai F et al., 2004; Cotsarelis G et al., 1990; Potten CS et al., 1997) και η ενεργοποίηση της διαφοροποίησής τους σε κύτταρα ενός συγκεκριμένου ιστού, ελέγχεται από το μικροπεριβάλλον τους και τα μηνύματα



Εικόνα 1-8: Η ισχύουσα θεωρία για την ανανέωση των ιστών (Α) θέλει τα βλαστικά κύτταρα να είναι συνεχώς ενεργά. Η θεωρία που θα μπορούσε να την αντικαταστήσει προτείνει μια συνεχή ισορροπία ανάμεσα στα ενεργά (που πολλαπλασιάζονται και/ή διαφοροποιούνται) και τα ανενεργά (σε λανθάνουσα φάση) βλαστικά κύτταρα (Β)
Li L and Clevers H. *Nature*. 2010;327:542-5

που λαμβάνουν από αυτό (Wilson A et al., 2008) (Εικόνα 1-8). Σήμερα, είναι πλέον γνωστό ότι οι δυο κατηγορίες βλαστικών κυττάρων, δηλαδή τα ενεργά και τα λανθάνοντα, συνυπάρχουν στον ίδιο ιστό. Στον αιμοποιητικό ιστό, για παράδειγμα, εντοπίζονται HSC σε λανθάνουσα κατάσταση (Foudi A et al., 2009) και παράλληλα, άλλα που πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται και στις κρύπτες του εντέρου (*intestinal crypts*) (Barker N and Clevers H, 2007; Lee G et al., 2009) ή στους θύλακες των τριχών (Fuchs E and Segre JA, 2000; Niemann C and Watt FM, 2002). Σε άλλες πάλι περιπτώσεις η συμπεριφορά κάποιων πληθυσμών βλαστικών

κυττάρων όπως για παράδειγμα των μεσεγχυματικών προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι όταν μεταμοσχεύονται σε άλλον οργανισμό εντοπίζονται διαφοροποιημένοι «απόγονοί» τους σε πολλούς ιστούς του λήπτη (Pittenger MF et al., 1999). Η κατανόηση των μηχανισμών που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες είναι σημαντική αφού θα αποτελέσει καθοριστικό παράγοντα για το εύρος των κλινικών – θεραπευτικών εφαρμογών των κυττάρων αυτών. Μέχρι στιγμής προτείνονται τέσσερις κύριες θεωρίες για την *in vivo* διαφοροποίηση των κυττάρων (Allen KJ et al., 2005) ενώ δεν είναι απίθανο να συνεργάζονται περισσότεροι από ένας μηχανισμοί, ο καθένας με διαφορετική βαρύτητα, ή ακόμα σε διαφορετικές περιπτώσεις να επικρατεί και διαφορετικός μηχανισμός.

3.1. Υπερδιαφοροποίηση

Υπερδιαφοροποίηση (*transdifferentiation*) λαμβάνει χώρα όταν βλαστικά κύτταρα δεσμευμένα (*restricted*) σε συγκεκριμένη κατεύθυνση (π.χ. αιμοποιητικά ή μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα) συμβάλλουν στην αναγέννηση ιστών διαφοροποιούμενα σε μη προβλεπόμενους από το είδος τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Η διαδικασία αυτή καταδεικνύει τη δυνατότητα προσαρμογής της γονιδιακής έκφρασης ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα. Ως παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί η *in vitro* διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών σε ηπατοκύτταρα με τη χρήση κυτταροκινών και απουσία άλλων κυττάρων αποκλείοντας έτσι την πιθανότητα σύντηξης (Saji Y et al., 2004; Terai S et al., 2003). Η άποψη αυτή μάλιστα ενισχύεται και από άλλα πειράματα που αφορούσαν διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Σε ένα από αυτά έγινε συγκαλλιέργεια HSC και ηπατοκυττάρων με τη μέθοδο *transwell*, που επιτρέπει την ανταλλαγή διαλυτών παραγόντων αλλά όχι την απευθείας κυτταρική επαφή, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των HSC σε κύτταρα που παράγουν CK-18, μια κυττοκερατίνη χαρακτηριστική της ηπατικής σειράς (Jang YY et al., 2004; Krause DS et al., 2001). Η επαγωγή της υπερδιαφοροποίησης από διαλυτούς παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα οι κυτταροκίνες θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα φαινόμενα που έχουν παρατηρηθεί και περιγραφεί για διάφορους πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων σε *in vivo* μελέτες (Bonner-Weir S et al., 2008; Dong HH et al., 2009). Ωστόσο τα περισσότερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν πριν το 2000 δεν παρέχουν επαρκή δεδομένα που να αποκλείουν το φαινόμενο της κυτταρικής σύντηξης και για το λόγο αυτό θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

3.2. Κυτταρική Σύντηξη

Η κυτταρική σύντηξη (*cell fusion*) παρατηρείται φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών. Τα μονοπύρρηνα συνενώνονται για να δημιουργήσουν τους οστεοκλάστες και οι μυοβλάστες με τη σύντηξή τους δημιουργούν τις μυϊκές ίνες. Ορισμένες εργασίες περιγράφουν την επούλωση του ήπατος με σύντηξη βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών με ηπατοκύτταρα (Vassilopoulos G et al., 2003; Wang X et al., 2003) ενώ το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιστούς (Alvarez-Dolado M et al., 2003; Terada N et al., 2002).

3.3. Τροφική δράση των Βλαστικών Κυττάρων

Σε ορισμένες περιπτώσεις αναγέννησης ιστού τα βλαστικά κύτταρα δεν διαφοροποιούνται τα ίδια σε κύτταρα του ιστού, αλλά εκκρίνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του τραυματισμένου ιστού. Η χορήγηση αλλογενών βλαστικών κυττάρων σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου μπορεί να οδηγήσει τόσο στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα του μυοκαρδίου όσο και στην κινητοποίηση ενδογενών βλαστικών κυττάρων που κατευθύνονται στον τραυματισμένο ιστό (Zhang M et al., 2007). Σήμερα γίνεται προσπάθεια να αναπαραχθεί ο μηχανισμός αυτός με χορήγηση κυτταροκινών αντί για βλαστικά κύτταρα στους ασθενείς (Tanaka H et al., 2003).

3.4. Αποδιαφοροποίηση – Επαναδιαφοροποίηση - Επαναπρογραμματισμός

Η αποδιαφοροποίηση (*de-differentiation*) τελικά διαφοροποιημένων κυττάρων, ώστε να αποκτήσουν χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων, και η επαναδιαφοροποίησή τους σε άλλους από τον αρχικό κυτταρικούς πληθυσμούς, είναι ένα φαινόμενο γνωστό στα αμφίβια (Ramadan AA et al., 1986) αλλά και σε άλλους κατώτερους οργανισμούς, όπως η ύδρα (Haynes J and Burnett AL, 1963). Παρόλο που ανάλογος μηχανισμός είναι δύσκολο να διαπιστωθεί στον άνθρωπο, έχουν διατυπωθεί υποθέσεις ότι κυτταρική αποδιαφοροποίηση και επαναδιαφοροποίηση συμβαίνει και κατά την ανάπτυξη ορισμένων ανθρώπινων ιστών (Reiter I et al., 2002). Η μεταφορά του φαινομένου αυτού στο εργαστήριο πραγματοποιείται με επέμβαση στο γενετικό προγραμματισμό των κυττάρων και ονομάζεται επαναπρογραμματισμός. Η τεχνική βασίζεται στην εισαγωγή σε σωματικά κύτταρα (π.χ. δερματικά κύτταρα), με τη χρήση ιικών φορέων, γονιδίων διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες προκαλούν με τη σειρά τους την αλλαγή της πρωτεϊνικής έκφρασης στα διαμολυσμένα κύτταρα και τη μετατροπή τους σε iPSCs (Park IH et al., 2008; Takahashi K and Yamanaka S, 2006).

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε ώριμα κύτταρα μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Επιπλέον μπορεί να μην είναι τα ίδια τα βλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται αλλά να παίζουν απλώς επικουρικό ρόλο με την έκκριση διαλυτών παραγόντων. Η δυσκολία στην κατανόηση των φαινομένων και των μηχανισμών που ενέχονται στη διαδικασία διαφοροποίησης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι οι παρατηρήσεις που γίνονται *in vitro* δεν περιγράφουν πάντα επακριβώς την *in vivo* πραγματικότητα.

Ωστόσο η πρόοδος σε αυτόν τον τομέα θα παίξει καθοριστικό παράγοντα στη διεύρυνση των εφαρμογών τους.

4. Κλινικές εφαρμογές: από την πρώτη μεταμόσχευση στις προοπτικές του μέλλοντος

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η σημασία των βλαστικών κυττάρων και οι προοπτικές που ανοίγονται για μελλοντικές τους χρήσεις είναι σκόπιμο να αναφερθεί πρώτα η μακροχρόνια πορεία μελετών που οδήγησαν στις σημερινές γνώσεις και να γίνει μια αναφορά για το που βρίσκεται αυτή τη στιγμή η μελέτη τους.

4.1. Βλαστικά Κύτταρα: μια διαδρομή πενήντα χρόνων

Παρόλο που τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στο κέντρο της επικαιρότητας και αποτελούν, κατά πολλούς, το μέλλον των ιατροβιολογικών επιστημών, οι βάσεις της ραγδαίας προόδου που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια ετέθησαν από τις πρώτες παρατηρήσεις στα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Καθοριστικό ρόλο για τις πρώτες ανακαλύψεις και στον τομέα των βλαστικών κυττάρων, όπως και σε άλλους τομείς της βιολογίας και της ιατρικής, διαδραμάτισε ο 2^{ος} Παγκόσμιος Πόλεμος και ειδικότερα η ανάπτυξη της ατομικής ενέργειας. Η παρατήρηση των πρώτων θυμάτων έκθεσης στην ακτινοβολία ώθησε τους επιστήμονες της εποχής στη μελέτη των επιδράσεων της στον ανθρώπινο οργανισμό γεγονός στο οποίο οφείλεται η ραγδαία ανάπτυξη της αιματολογίας που παρατηρήθηκε εκείνη την περίοδο. Δεν είναι λοιπόν τυχαίο που τα πρώτα βλαστικά κύτταρα που αναφέρονται εντοπίζονται στον μυελό των οστών, το όργανο της αιμοποίησης, και δεν είναι άλλα από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Till JE and McCulloch EA, 1961). Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές αναφορές για διαφορετικά είδη βλαστικών κυττάρων που βασιζόταν κατά κανόνα στην *in vivo* παρατήρηση ενώ μόλις από τις αρχές της δεκαετίας του '80 η ανάπτυξη νέων τεχνικών καλλιέργειας επέτρεψε τη συστηματική *in vitro* μελέτη βλαστικών κυττάρων. Οι κυριότεροι σταθμοί στην έρευνα για τα βλαστικά κύτταρα είναι οι εξής:

- 1958: Η πρώτη κλινική εφαρμογή των βλαστικών κυττάρων: Ο E. Donnall Thomas (βραβείο Νόμπελ 1990) πραγματοποιεί την πρώτη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών σε ασθενή που έπασχε από λευχαιμία. Δότης ήταν ο δίδυμος αδερφός του.

- 1961: Ανακάλυψη ενός κυτταρικού πληθυσμού στον μυελό των οστών από τον οποίο προέρχονταν όλα τα κύτταρα του αίματος – Το αιμοποιητικό βλαστικό κύτταρο (Becker AJ et al., 1963; Till JE and McCulloch EA, 1961)
- 1965: Οι Altman και Das εντοπίζουν στον ιππόκαμπο και τον οσφρητικό βολβό του εγκεφάλου του αρουραίου τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (Altman J, 1969; Altman J and Das GD, 1965)
- 1966: Χαρακτηρισμός των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών (Friedenstein AJ et al., 1970; Friedenstein AJ et al., 1968; Friedenstein AJ et al., 1966). Αργότερα ο πληθυσμός αυτός ταυτίζεται με τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Pittenger MF et al., 1999; Pittenger MF and Marshak DR, 2001).
- 1968: Οι Edwards και Bavister γονιμοποιούν για πρώτη φορά ωάριο *in vitro*
- 1969: Ο E. Donnall Thomas πραγματοποιεί την πρώτη επιτυχημένη αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών από μη-συγγενή δότη
- 1981: Οι Evans και Kaufman και παράλληλα ο Martin απομονώνουν για πρώτη φορά από βλαστοκύστες ποντικών εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Evans MJ and Kaufman MH, 1981; Martin GR, 1981)
- 1988: Πραγματοποιείται η πρώτη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (Gluckman E et al., 1989)
- 1992: Ιδρύεται η πρώτη στον κόσμο τράπεζα βλαστικών κυττάρων για κλινική χρήση. Πρόκειται για την Τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος της Νέας Υόρκης (Rubinstein P et al., 1995; Rubinstein P et al., 1993)
- 1994: Δημιουργία ανθρώπινης βλαστοκύστης *in vitro* με σκοπό την υποβοηθούμενη γονιμοποίηση (Bongso TA et al., 1994a). Απομόνωση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων από την εσωτερική μάζα αλλά αδυναμία διατήρησής τους σε καλλιέργεια (Bongso TA et al., 1994b)
- 1995: Καλλιέργεια εμβρυονικών κυττάρων από πρωτεύοντα (Thomson JA et al., 1995; Thomson JA et al., 1996)

- 1998: Τα πρώτα εμβρυονικά κύτταρα από ανθρώπινη βλαστοκύστη καλλιεργούνται επιτυχώς για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στο Πανεπιστήμιο του Wisconsin – Madison από τον James Thomson (Thomson JA et al., 1998)
- 1999: Απομονώνονται, καλλιεργούνται και διαφοροποιούνται *in vitro* νευρικά βλαστικά κύτταρα (Vescovi AL et al., 1999)
- 1999 έως σήμερα: Τα τελευταία χρόνια εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν από ιστούς πολλοί διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων. Στο ήπαρ, την καρδιά, τους σκελετικούς μύες, τα δόντια ή τον λιπώδη ιστό περιγράφονται κύτταρα με διαφορετικές δυνατότητες διαφοροποίησης καθώς και με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι οι γνώσεις για τα βλαστικά κύτταρα δεν συμβαδίζουν πάντα με τις εφαρμογές τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα HSC που χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη θεραπεία της λευχαιμίας το 1958, αρκετά χρόνια πριν απομονωθούν, χαρακτηριστούν και μελετηθούν από τους Till και McCullough. Ασφαλώς και είχαν προηγηθεί παρατηρήσεις που συνηγορούσαν στη χρήση τους ωστόσο σε αυτή την περίπτωση η βασική έρευνα ακολούθησε χρονικά την κλινική εφαρμογή. Το αντίθετο συνέβη με τη μεταμόσχευση HSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Εκτεταμένες εργασίες του Broxmayer *in vitro* και *in vivo* σε πειραματόζωα προηγήθηκαν της πρώτης μεταμόσχευσης από την Gluckman.

4.2. Το παρόν των Βλαστικών Κυττάρων

Σήμερα, 50 χρόνια μετά τα πρώτα της βήματα, η μεταμόσχευση HSC εξακολουθεί να αποτελεί την πλέον εδραιωμένη μορφή κυτταρικής θεραπείας. Αρχικά, αιμοποιητικά κύτταρα από το μυελό των οστών χορηγήθηκαν για τη θεραπεία της λευχαιμίας. Με την εξέλιξη των τεχνικών και την κατανόηση της βιολογίας τους η χρήση τους επεκτάθηκε στη θεραπεία και άλλων νόσων, όπως είναι τα λεμφώματα, ορισμένες μορφές καρκίνου, αναιμίες, μεταβολικές παθήσεις του αίματος και σε κάποιες περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων και ανοσοανεπαρκειών. Με τη προσθήκη δε του ομφαλοπλακουντιακού αίματος στις διαθέσιμες πηγές κυττάρων αυξάνονται οι προοπτικές της χρήσης HSC και σε άλλες νόσους του αιμοποιητικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράλληλα αναπτύσσονται και άλλες μορφές κυτταρικής θεραπείας που στοχεύουν τόσο στην

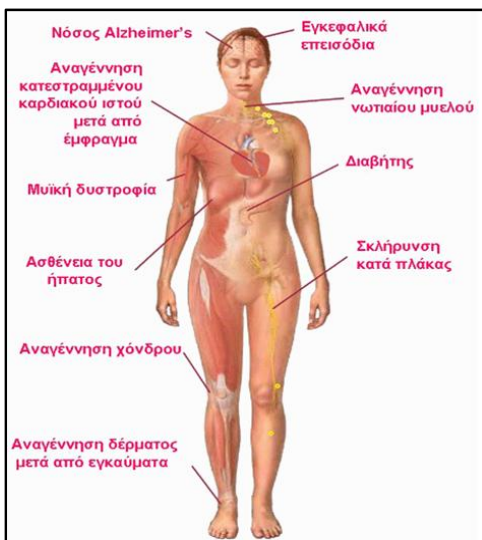
αξιοποίηση των νέων πηγών βλαστικών κυττάρων και της μεγάλης ποικιλίας προγονικών πληθυσμών που ανακαλύπτονται όσο και στη διεύρυνση των εφαρμογών τους. Έτσι, προγονικά ηπατοκύτταρα χορηγούνται πειραματικά για την αποκατάσταση βλαβών του ήπατος ή για την παράταση του χρόνου ζωής του ασθενούς μέχρι να βρεθεί κατάλληλο μόσχευμα και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούνται πειραματικά για την ανακούφιση ασθενών που πάσχουν από νευροεκφυλιστικά νοσήματα ή από συγγενείς μεταβολικές παθήσεις.

Η βιαστική όμως χρησιμοποίηση των βλαστικών κυττάρων στην καθημερινή κλινική πρακτική, χωρίς να έχει προηγηθεί εκτεταμένη ή έστω επαρκώς τεκμηριωμένη έρευνα στο εργαστήριο, μπορεί να επιφέρει το αντίθετο από το επιθυμητό αποτέλεσμα. Τα βλαστικά κύτταρα, ακόμα κι αν προέρχονται από μία συγκεκριμένη πηγή, είναι συχνά ανομοιογενείς πληθυσμοί. Για το λόγο αυτό η μελέτη τους από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, με τη χρήση διαφορετικών πρωτοκόλλων απομόνωσης και καλλιέργειας καταλήγει συχνά σε αντικρουόμενα ή αντιφατικά αποτελέσματα. Κλινικές μελέτες που γίνονται με βλαστικά κύτταρα, ίδιες προέλευσης αλλά με διαφορετική μεθοδολογία, προκαλούν αρκετές φορές σύγχυση αντί να διαφωτίζουν και αντί να εξυπηρετούν, καθυστερούν την εξέλιξη νέων τεχνικών και μεθόδων. Είναι λοιπόν απαραίτητο η επιστημονική κοινότητα να συμφωνήσει σε ορισμένα κριτήρια που θα αφορούν τον χαρακτηρισμό των βλαστικών κυττάρων, τις μεθόδους απομόνωσής τους, τις συνθήκες καλλιέργειάς τους, τις τεχνικές κρυοκατάψυξης κτλ. Με τον τρόπο αυτόν θα

καταστεί δυνατή η λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων κατά την κλινική τους εφαρμογή.

4.3. Μελλοντικές εφαρμογές των Βλαστικών Κυττάρων

Παρά το γεγονός ότι η μελέτη των βλαστικών κυττάρων βρίσκεται στα αρχικά της στάδια, έχουν ήδη αρχίσει να διαφαίνονται οι μελλοντικοί τομείς εφαρμογής τους (Εικόνα I-9). Η δυνατότητα

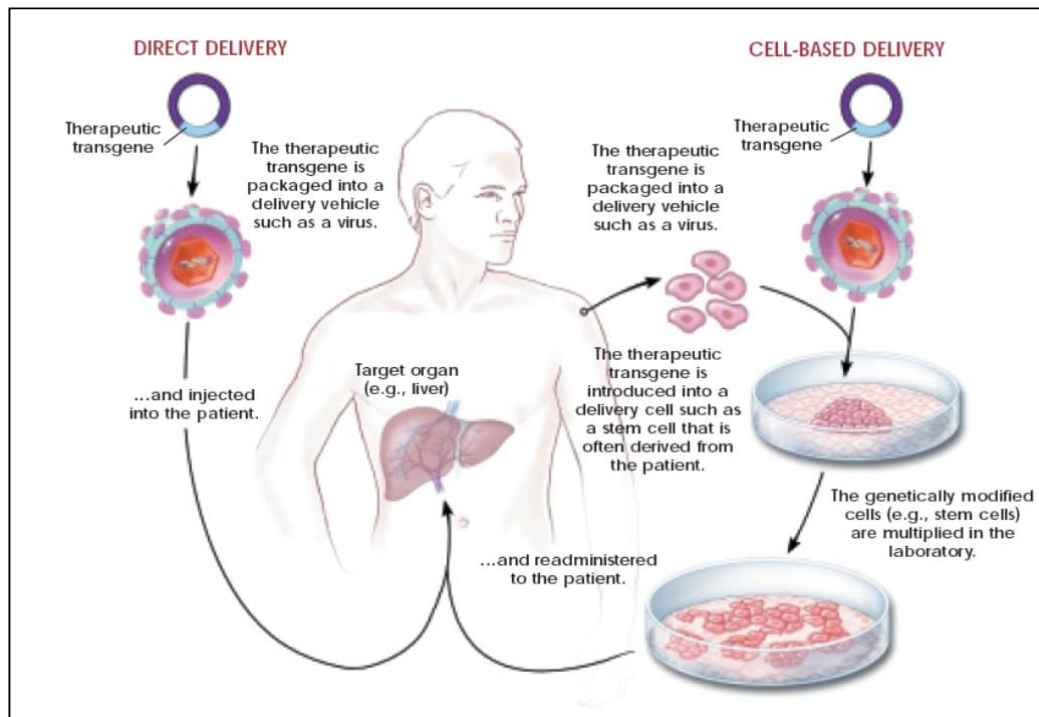


Εικόνα I-9: Πιθανές μελλοντικές εφαρμογές των βλαστικών κυττάρων. Ιατροί και επιστήμονες πιστεύουν ότι τα βλαστικά κύτταρα θα αποτελέσουν θεραπεία πρώτης γραμμής για μια πληθώρα ασθενειών.

διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων αλλά και η ικανότητά τους να μεταναστεύουν (*homing*) και να εγκαθίστανται σε

τραυματισμένους ιστούς, αποτελούν στοιχεία που προσπαθούν να εκμεταλλευτούν θεραπευτικές μέθοδοι βασισμένες σε αυτά. Τέτοιες μελέτες βρίσκονται στο στάδιο του σχεδιασμού ενώ άλλες περνάνε σταδιακά στην εφαρμογή μέσω συνεχών κλινικών δοκιμών. Οι κύριοι άξονες στους οποίους στρέφεται το επιστημονικό ενδιαφέρον και αναμένεται η σημαντικότερη πρόοδος τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα αφορούν την:

- **Αναγέννηση ιστών** έπεται από τραυματισμό ή βλάβη που οφείλεται σε παθολογικά αίτια (π.χ. ισχαιμικό ή αιμορραγικό εγκεφαλικό επεισόδιο, κίρρωση του ήπατος κ.τ.λ.) αναζητείται ήδη τρόπος ώστε υγιή βλαστικά κύτταρα να οδηγούνται στον κατεστραμμένο ιστό προκειμένου, διαφοροποιούμενα, να συμβάλλουν στην αναγέννησή του.
- **Επιδιόρθωση ιστών** σε περιπτώσεις κληρονομικών ή συγγενών παθήσεων όπως για παράδειγμα την αποκατάσταση της οστεοποίησης στην ατελή οστεογένεση (*Osteogenesis imperfecta*) ή των νησίδων του πάγκρεας στο διαβήτη τύπου Ι. Σε αυτές τις περιπτώσεις βλαστικά κύτταρα υγιούς δότη θα μπορούσαν να



Εικόνα Ι-10: Στρατηγικές παράδοσης γονιδίων με τη χρήση α) Ιών, β) Βλαστικών κυττάρων (2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)

χορηγηθούν ακόμα και κατά την κυοφορία (*in utero*) ώστε να καλύψουν την ανεπάρκεια των κυττάρων του εμβρύου (Le Blanc K et al., 2005).

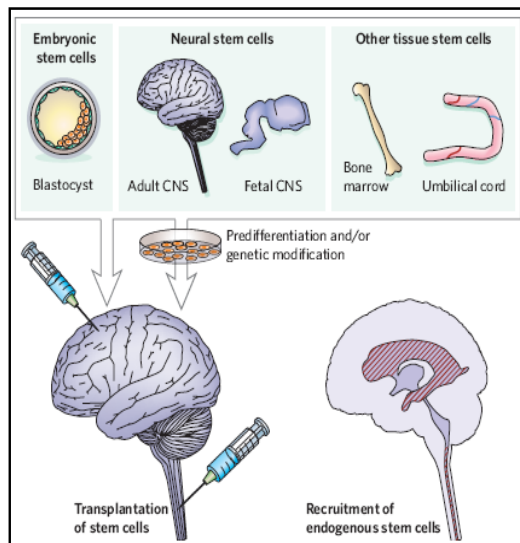
- **Γονιδιακή θεραπεία** όπου τα βλαστικά κύτταρα θα χρησιμεύουν ως φορείς γονιδίων, αξιοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητα στόχευσής τους (*homing*) στο φυσιολογικό τους μικροπεριβάλλον. Κύτταρα από τον ιστό στόχο της θεραπείας θα μετατρέπονται *ex vivo* με το κατάλληλο γονίδιο και θα επαναχορηγούνται στον ασθενή όπου θα κατευθύνονται στο όργανο από το οποίο προήλθαν (Εικόνα I-10).

Για να συστηματοποιηθεί όμως η μελλοντική κλινική χρήση των βλαστικών κυττάρων πρέπει να απαντηθούν ποικίλα ερωτήματα που αφορούν τον τρόπο χορήγησής τους, την προετοιμασία του ασθενή, την ταυτόχρονη ή όχι χορήγηση παραγόντων που θα διευκολύνουν τη δράση των κυττάρων, τη χορήγηση αδιαφοροποίητων κυττάρων ή διαφοροποιημένων. Σημαντικότερο, όλων είναι να καθοριστεί ποια είδη βλαστικών κυττάρων είναι τα καταλληλότερα για κάθε περίπτωση.

4.4. Ποια κύτταρα και από ποιούς ιστούς;

Νέοι πληθυσμοί με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων εμφανίζονται στη

διεθνή βιβλιογραφία με ταχείς πλέον ρυθμούς. Παράλληλα αυξάνεται και ο αριθμός δυνητικών πηγών για κάποια γνωστά είδη. Η πρακτική σημασία των βλαστικών κυττάρων όμως καθορίζεται από τις εφαρμογές για τις οποίες προορίζονται. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιημένα βλαστικά κύτταρα είναι τα HSC που ήδη απομονώνονται από το μυελό των οστών και τον ομφάλιο λώρο. Για τις υπόλοιπες εφαρμογές τα ερωτηματικά είναι πολλά και αφορούν κυρίως τον πληθυσμό βλαστικών κυττάρων που θα είναι τα καταλληλότερα ανά περίπτωση αλλά και την πηγή από την οποία θα μπορούσαν



Εικόνα I-11: Για τη θεραπεία του ΚΝΣ θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων από διαφορετικές πηγές.

Lindall O and Kokaia Z. Nature 2006; 441:1094-1095

να προέλθουν (Εικόνα I-11). Τα εμβρυονικά κύτταρα είναι αυτά με τη μεγαλύτερη ευελιξία διαφοροποίησης. Ωστόσο ηθικοί λόγοι εμποδίζουν τη χρήση τους καθώς μοναδική πηγή τους είναι η βλαστοκύστη. Βλαστικά κύτταρα ιστών ενηλίκων θα μπορούσαν να συμβάλλουν σε θεραπείες που αφορούν τους ιστούς προέλευσής τους. Ενώ θεωρητικά μια τέτοια προοπτική είναι ελκυστική στην πράξη προκύπτουν δυσκολίες στην απομόνωσή τους. Ο νευρικός ιστός, ο καρδιακός μυς, το ήπαρ, το πάγκρεας και άλλα όργανα δεν είναι εύκολα προσπελάσιμα και η ποσότητα ιστού που λαμβάνεται για βιοψίες δεν θα επαρκούσε για την απομόνωση ικανής ποσότητας βλαστικών κυττάρων. Έτσι η μοναδική πηγή βλαστικών κυττάρων ενηλίκων για κλινικές εφαρμογές παραμένει ο μυελός των οστών. Η λήψη του δεν είναι χωρίς κινδύνους καθώς απαιτεί γενική νάρκωση ενώ παράλληλα πρόκειται για ιστό χρήσιμο για το δότη. Γίνεται λοιπόν μια στροφή προς τους εμβρυϊκούς ιστούς που μετά τον τοκετό απορρίπτονται και δεν έχουν καμία άλλη χρησιμότητα, δηλαδή τον πλακούντα, τον ομφάλιο λώρο και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Από τους ιστούς αυτούς μπορούν να απομονωθούν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα με μεγάλη ευκολία ενώ δεν υπάρχουν ηθικά προβλήματα στη χρήση τους. Επιπλέον τα μεσεγχυματικά κύτταρα παρουσιάζουν ξεχωριστές ιδιότητες και βρίσκονται στο επίκεντρο της μελέτης τα τελευταία χρόνια. Αποτελούν δε αυτή τη στιγμή τον πληθυσμό βλαστικών κυττάρων με τις περισσότερες δυνητικές εφαρμογές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

1. Από τους «Ινοβλάστες» στα «Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα».

Η ομάδα του Friedenstein πρώτη μελέτησε το αιμοποιητικό στρώμα του μυελού των οστών και περιέγραψε κύτταρα με μορφολογία ινοβλαστών (Friedenstein AJ et al., 1966; 1968; 1970). Χρειάστηκε ωστόσο να περάσουν πολλά χρόνια μέχρι να ταυτιστεί ο πληθυσμός αυτός με εκείνον που ο Caplan αποκάλεσε για πρώτη φορά Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα (*mesenchymal stem cells* - MSC) (Caplan AI, 1991). Έως τότε τα MSC συναντώνταν σε παλαιότερες βιβλιογραφικές αναφορές με ποικίλες ονομασίες, όπως «συγκρότημα σχηματισμού αποικιών ινοβλαστών» (*Fibroblast Colony-Forming Units*, CFU-F), «μυελικά κύτταρα του στρώματος» (*marrow stromal cells*) ή «προγονικά κύτταρα του (μυελικού) στρώματος (*stromal progenitor cells*). Οι διάφορες ερευνητικές ομάδες που κατά καιρούς μελετούσαν τα MSC, τα ονομάτιζαν με βάση την προέλευσή τους, τις ιδιότητές τους ή ακόμα και βάσει των παρατηρήσεών τους. Έγινε όμως αντιληπτό ότι όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί που αντιστοιχούσαν σε αυτές τις ονομασίες είχαν κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Σε αυτά στηρίχθηκε η επιστημονική κοινότητα για να καταλήξει σε έναν κοινό ορισμό των MSC (Dominici M et al., 2006; Horwitz EM et al., 2005).

2. Ορισμός - Μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

Στην πραγματικότητα τα MSC αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό ενώ δεν υπάρχει ένας αποκλειστικός ανοσοφαινότυπος που να τα χαρακτηρίζει. Λόγω αυτών των δυσκολιών χρειάστηκε η παρέμβαση του Διεθνούς Οργανισμού Κυτταρικής Θεραπείας (*International Society of Cell Therapy* – ISCT) προκειμένου να καθοριστούν τα κριτήρια, με βάση τα οποία, θα ορίζονται τα MSC (Dominici M et al., 2006; Horwitz EM et al., 2005). Τα κριτήρια αυτά περιλαμβάνουν τόσο μορφολογικά όσο και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και για το λόγο αυτό είναι αδύνατο να δοθεί ο ορισμός χωρίς την παράλληλη περιγραφή τους.

Έτσι σήμερα ορίζονται ως μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα εκείνα που προσκολλούνται στο πλαστικό σχηματίζοντας αποικίες κυττάρων με μορφολογία ινοβλαστών. Κατά τον ανοσοφαινοτυπικό τους έλεγχο τα MSC δεν πρέπει να εκφράζουν τους δείκτες προγονικών ή ώριμων αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων CD45, CD34, CD14, CD19 ή το αντιγόνο του τάξης II Ανθρώπινου Λευοκυτταρικού Αντιγόνου (*Human Leukocyte Antigen* – HLA) HLA - DR. Αντιθέτως

πρέπει να εκφράζουν σε ποσοστό τουλάχιστον 95% τα αντιγόνα CD105 (ενδογλίνη), CD73 (εξω-5'-νουκλεοτιδάση) και CD90 (thy1). Οι διαφορές στα ποσοστά έκφρασης αυτών των δεικτών που είναι πιθανό να παρατηρούνται, φαίνεται να σχετίζονται με τη πηγή από την οποία απομονώνονται τα κύτταρα αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται από τον εκάστοτε μελετητή.

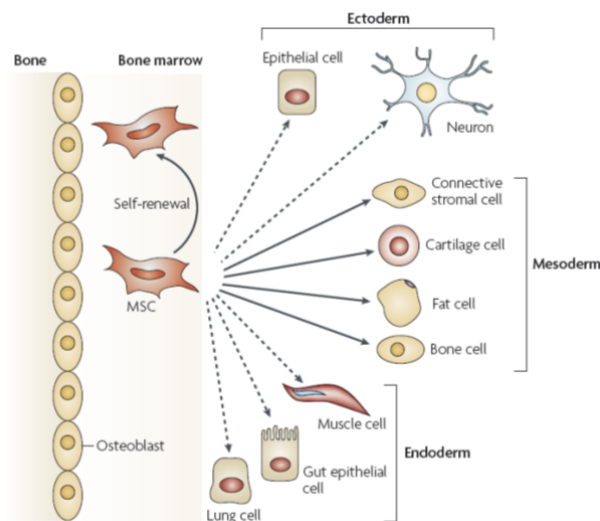
Σε γονιδιακό επίπεδο στα MSC είναι ενεργά ορισμένα γονίδια χαρακτηριστικά και των εμβρυονικών κυττάρων. Συγκεκριμένα εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες *Oct-4*, *Rex-1* και *Nanog*, (Riekstina U et al., 2009) τον πυρηνικό υποδοχέα *PPAR γ 2* (Shockley KR et al., 2007) και το μεμβρανικό υποδοχέα για τον *Leukemia Inhibitory Factor (LIF)* (Friedman R et al., 2007). Όλα αυτά τα μόρια έχουν σχέση με τη δυνατότητα διαφοροποίησης των κυττάρων και με τη διατήρηση του αριθμού των σωματικών βλαστικών κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού.

Πέρα όλων αυτών, για να είναι MSC κάποια κύτταρα πρέπει και να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε τρεις τουλάχιστον κυτταρικούς πληθυσμούς: οστεοκύτταρα (*osteocytes*), χονδροκύτταρα (*chondrocytes*), λιποκύτταρα (*adipocytes*).

3. Ιδιότητες

3.1. Αυτοανανέωση – Διαφοροποίηση

Τα MSCs διατηρούν τις βασικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων, δηλαδή την ικανότητα αυτοανανέωσης ώστε να διατηρούν αριθμητικά σταθερό τον πληθυσμό



Εικόνα II-1: Διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα των τριών εμβρυϊκών στιβάδων. (Uccelli A et al Nat Rev Immunol 2008, 8:726)

τους ενώ παράλληλα, όντας βλαστικά κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άλλες μεσοδερμικές κυτταρικές σειρές: σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο πληθαίνουν οι αναφορές που θέλουν τα MSCs ικανά να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα των άλλων εμβρυϊκών στιβάδων. Φαίνεται λοιπόν ότι κύτταρα εκτοδερμικής προέ-

λευσης, όπως είναι τα επιθηλιακά (*epithelial*), τα αστροκύτταρα (*astrocytes*) (Schwarz EJ et al., 1999) ή τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, αλλά και κύτταρα της ενδοδερμικής στιβάδας, όπως για παράδειγμα τα μυοκύτταρα (*myotubes*) (Lee JH et al., 2005), τα τενοντοκύτταρα (*tenocytes*) (Awad HA et al., 1999), τα κύτταρα του αναπνευστικού (*lung cells*) ή του εντερικού επιθηλίου του (*gut cells*) (Uccelli A et al., 2008), μπορούν να προκύψουν και από την απευθείας διαφοροποίηση των MSCs (Εικόνα II-1). Πρόκειται δηλαδή για πολυδύναμα κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα υπερδιαφοροποίησης. Αυτή η ελαστικότητα στη διαφοροποίηση θα μπορούσε να εξηγηθεί από την εμβρυϊκή προέλευση των MSCs. Ενώ τα «ενήλικα» MSCs θεωρούνται ότι είναι κατά κανόνα μεσοδερμικής προέλευσης (Dennis JE and Charbord P, 2002), τα εμβρυϊκά προέρχονται κυρίως από το νευροεπιθήλιο και τη νευρική ακρολοφία (*neural crest*), δηλαδή από το νευροεκτόδερμα (Takashima Y et al., 2007). Το γεγονός ότι η υπερδιαφοροποίηση παρατηρείται σπάνια *in vivo* πιθανόν να οφείλεται στο ότι μετά τη γέννηση το ποσοστό των MSCs νευροεκτοδερμικής προέλευσης σταδιακά μειώνεται και τελικά στον ενήλικα οργανισμό ο πληθυσμός των μεσεγχυματικών αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από κύτταρα μεσοδερμικής καταγωγής.

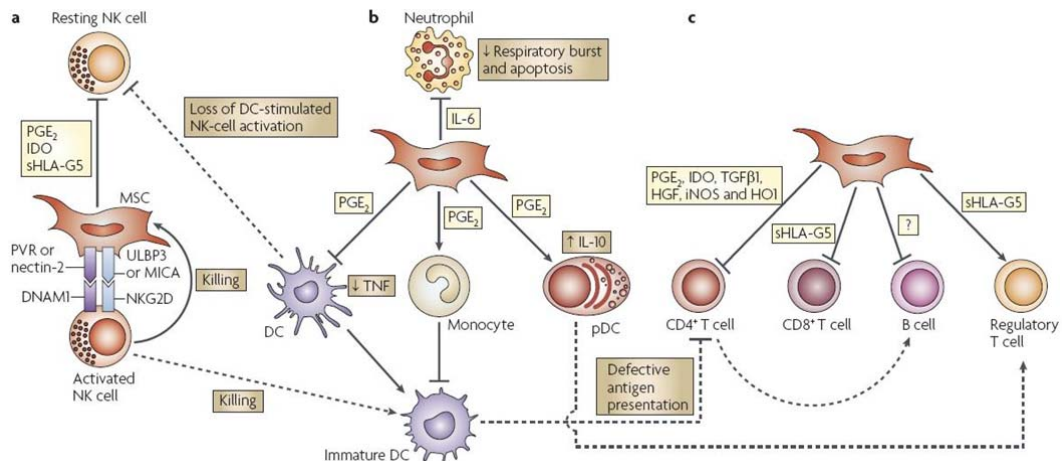
3.2. Αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό σύστημα – Ανοσορρύθμιση

Ο ανοσορρυθμιστικός ρόλος των MSCs διαπιστώθηκε πρόσφατα από τις ομάδες των Di Nicola και Bartholomew (Bartholomew A et al., 2002; Di Nicola M et al., 2002), οι οποίοι παρατήρησαν ότι MSCs του μυελού των οστών έχουν την ιδιότητα να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων. Παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών που συμβάλουν στο φαινόμενο, πολλά από τα ερωτηματικά δεν έχουν ακόμα απαντηθεί. Είναι όμως πλέον βέβαιο, ότι τα MSCs επιδρούν σε όλα τα επίπεδα της ανοσολογικής απάντησης και σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που συμμετέχουν σε αυτή (Εικόνα II-2). Αναλυτικά τα MSCs επιδρούν στα:

- Δενδριτικά κύτταρα (*Dendritic cells – DC*)

Έχει αποδειχθεί ότι τα MSCs εμποδίζουν την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων και των HSCs σε DCs (Jiang XX et al., 2005; Li YP et al., 2008; Nauta AJ et al., 2006; Ramasamy R et al., 2007). Στα ώριμα DCs μειώνουν την έκφραση των μορίων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τάξης II (*Major Histocompatibility Complex– MHC class II*), του CD11c, του CD83 και των συνδιεγερτικών μορίων και

επάγουν την παραγωγή από αυτά της ιντερλευκίνης-12 (*IL-12*) εξασθενώντας κατ' αυτόν τον τρόπο την αντιγονοπαρουσιαστική τους δράση (Beyth S et al., 2005; Maccario R et al., 2005). Επιπλέον, τα MSCs περιορίζουν την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (*Tumor necrosis factor – TNF*) από τα DCs, εμποδίζοντας έτσι την εκκίνηση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Τέλος μια υποομάδα των DCs που επηρεάζεται από τα MSCs είναι και τα πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (*plasmacytoid dendritic cells – pDC*) στα οποία επάγεται η παραγωγή της κυτταροκίνης IL-10, μιας κυτταροκίνης με αντιφλεγμονώδη δράση (Aggarwal S and Pittenger MF, 2005).



Εικόνα II.2: Η αλληλεπίδραση των MSCs με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ένα σύνθετο φαινόμενο. Τα MSCs εμποδίζουν την ενεργοποίηση και την κυτταροτοξικότητα των NK αλλά λύνονται από τα ενεργοποιημένα NK μέσω του υποδοχέα NKG2D (a). Επιπλέον τα MSCs εμποδίζουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε DC ενώ ταυτόχρονα περιορίζουν την αντιγονοπαρουσίαση από τα ώριμα DC και ωθούν τα pDC στην έκκριση αντιφλεγμονωδών παραγόντων (b). Τέλος καταστέλλουν το κυτταρικό σκέλος της ειδικής ανοσίας και έμμεσα το χυμικό ενώ επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ρυθμιστικών Tregs. (Ucellì A et al Nat Rev Immunol 2008, 8:726)

- *Κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer cells – NK)*

Τα MSCs μπορούν να περιορίσουν τη κυτταροτοξική δράση των αδρανών (*resting*) NK ρυθμίζοντας καταρροϊκά (*downregulate*) την έκφραση των ενεργοποιητικών υποδοχέων τους NKp30 και NKG2D (Spaggiari GM et al., 2006). Επιπλέον η εξαρτώμενη από την IL-2 (ή την IL-15) ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των NK και η έκκριση της ιντερφερόνης-γ (*Interferon-γ – IFN-γ*) καταστέλλονται από την παρουσία MSCs (Spaggiari GM et al., 2008). Ωστόσο σε *in vitro* πειράματα, τα ενεργοποιημένα NK προκαλούν τη λύση των MSCs. Το γεγονός αυτό

φαίνεται να οφείλεται στα χαμηλά ποσοστά έκφρασης του MHC τάξης I από τα MSCs. Η προσθήκη IFN-γ στις καλλιέργειες MSCs αυξάνει την έκφραση αυτού του αντιγόνου και τους παρέχει μερική προστασία από τα NK (Sotiropoulou PA et al., 2006a).

- *T – λεμφοκύτταρα (T lymphocytes ή T cells)*

Μια από τις πρώτες παρατηρήσεις που αφορούσαν στην αλληλεπίδραση των MSCs με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ήταν ότι τα MSCs καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των διεγερμένων CD8⁺ κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (*Cytotoxic T-cells – CTL*) (Krampera M et al., 2003; Meisel R et al., 2004; Rasmusson I et al., 2005; Tse WT et al., 2003). Στην καταστολή αυτή δεν ισχύει ο MHC περιορισμός (*MHC restriction*), αφού τόσο αυτόλογα όσο και ετερόλογα MSCs έχουν την ίδια επίδραση. Αν και ο μηχανισμός που προκαλεί το φαινόμενο αυτό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, έχει διαπιστωθεί *in vitro* ότι παρουσία MSCs, τα διεγερμένα CTL εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου και μπλοκάρονται στη φάση G0/G. Επιπλέον τα MSCs προστατεύουν τα υπερδιεγερμένα CTL από την Fas – Fas-Ligand εξαρτώμενη απόπτωση, δηλαδή από την επαγωγή κυτταρικού θανάτου λόγω ενεργοποίησης (*activation induced cell death*) (Benvenuto F et al., 2007; Glennie S et al., 2005). Εκτός όμως των CTL, επηρεάζονται και οι άλλοι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων από τα MSCs. Στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (*T helper 2 – TH2*) παρατηρείται μείωση των επιπέδων της παραγόμενης IFN-γ με ταυτόχρονη αύξηση της έκκρισης της IL-4, δηλαδή επιτελείται μια στροφή από την προ-φλεγμονώδη στην αντιφλεγμονώδη δράση (Zarria E et al., 2005). Τέλος τα MSCs προάγουν τον πολλαπλασιασμό των ρυθμιστικών T – λεμφοκυττάρων (*T regulatory lymphocytes – Treg*) είτε άμεσα, με την έκκριση HLA-G (Selmani Z et al., 2008), είτε έμμεσα, με την επαγωγή της έκκρισης IL-10 από τα DCs (Aggarwal S and Pittenger MF, 2005).

- *B – λεμφοκύτταρα (B lymphocytes ή B cells)*

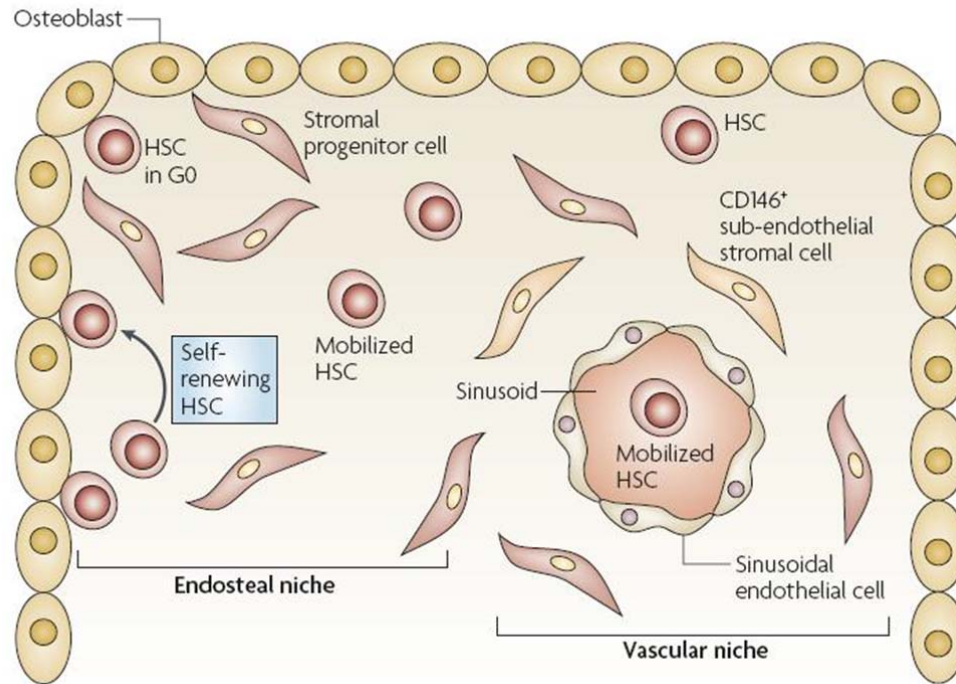
Υπάρχουν διάφορες μελέτες με αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των MSCs στα B – λεμφοκύτταρα. Οι περισσότερες αναφορές υποστηρίζουν ότι τα MSCs καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους *in vitro* (Augello A et al., 2005; Krampera M et al., 2006) σε αντίθεση με

άλλες που έδειξαν ότι δεν επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B – λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα (Rasmusson I et al., 2007; Traggiai E et al., 2008). Οι αντικρουόμενες παρατηρήσεις πιθανόν να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες πραγματοποίησης των πειραμάτων.

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι τα MSCs είναι ικανά να περιορίσουν τόσο τη φυσική όσο και την επίκτητη ανοσία, επηρεάζοντας τους μηχανισμούς της φλεγμονής καθώς και την κυτταροτοξικότητα. Ακόμα κι αν με τα μέχρι στιγμής πειραματικά δεδομένα, δεν είναι δυνατό να αποδειχθεί ότι έχουν τη δυνατότητα να περιορίσουν την παραγωγή αντισωμάτων με απευθείας ρύθμιση του πληθυσμού των B – λεμφοκυττάρων, η εξάρτηση του χυμικού σκέλους της ανοσολογικής απάντησης από τα DCs, NK και Th1 οδηγεί στην υπόθεση της έμμεσης καταστολής του από τα MSCs. Ένα ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσο ο περιορισμός της ανοσολογικής απάντησης από τα MSCs, μπορεί να καταστήσει ευάλωτο τον οργανισμό σε μολυσματικούς παράγοντες. Αυτό είναι δύσκολο, ακόμα, να απαντηθεί καθότι η πολυπλοκότητα του ανοσοποιητικού συστήματος σε συνδυασμό με το μικρό αριθμό μελετών σε *in vivo* συνθήκες δεν έχουν επιτρέψει τη συλλογή επαρκών δεδομένων. Σύμφωνα όμως με τις πρώτες ενδείξεις τα MSCs φαίνεται να έχουν ενεργούς Toll-like υποδοχείς (TLR) και η σύνδεση, σε αυτούς, προσδετών (*ligands*) μικροβιακής προέλευσης, επάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την έκκριση χημειοκινών και κυτταροκινών από τα MSCs (Hwa Cho H et al., 2006; Pevsner-Fischer M et al., 2007; Tomchuck SL et al., 2008). Κατ’ αυτόν τον τρόπο, η ενεργοποίηση των TLR3 και TLR4 έχει σαν αποτέλεσμα την εξασθένηση της σηματοδότησης των υποδοχέων Notch και κατά συνέπεια την απώλεια της δυνατότητάς τους να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T – λεμφοκυττάρων (Liotta F et al., 2008). Ενώ λοιπόν οι πρώτες αναφορές ήθελαν τα MSCs να έχουν αποκλειστικά ανοσοκατασταλτική δράση, τα νέα δεδομένα δείχνουν ότι η σχέση τους με τις συνιστώσες του ανοσοποιητικού συστήματος είναι πολύπλοκες και αποτελούν κι αυτά αναπόσπαστο τμήμα των ομοιοστατικών του μηχανισμών. Για το λόγο αυτό θεωρείται πλέον ότι τα MSCs έχουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο.

3.3. Ο φυσιολογικός τους ρόλος

Στον ενήλικα ανθρώπινο οργανισμό τα MSCs επιτελούν δύο κύριους ρόλους. Η πρωταρχική τους λειτουργία είναι να παρέχουν στα HSC το απαραίτητο για την ανανέωση τους και την διαφοροποίησή τους μικροπεριβάλλον (*hematopoietic-*



Εικόνα II-3: Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα δίνουν γένεση στους κυτταρικούς πληθυσμούς που σχηματίζουν τις εστίες αιμοποίησης του μυελού των οστών. (Ucelli A et al Nat Rev Immunol 2008, 8:726)

supporting stroma) (Minguell JJ et al., 2000). Από ξενομεταμόσχευση ανθρώπινων MSCs στον μυελό μυών NOD-SCID έχει διαπιστωθεί ότι σχηματίζουν όλους εκείνους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που απαιτούνται για τη δημιουργία μιας «ανθρώπινης» εστίας αιμοποίησης (*hematopoietic niche*) δηλαδή περικύτταρα (*pericytes*), μυοϊνοβλάστες (*myofibroblasts*), μυελικά στρωματικά κύτταρα (*marrow stromal cells*), οστεοκύτταρα, οστεοβλάστες (*osteoblasts*) και ενδοθηλιακά κύτταρα (*endothelial cells*) (Muguruma Y et al., 2006). Στις μυελοκυψέλες των σπογγικών οστών τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα περιβάλλουν τα HSCs στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησής τους. Στην ενδοοστική μοίρα της αιμοποιητικής εστίας (*endosteal niche*) τα στρωματικά κύτταρα, με τη συνδρομή των οστεοβλαστών, διατηρούν τα HSCs σε λανθάνουσα μεταμιτωτική κατάσταση (δηλαδή στη φάση G0) ενώ στην αγγειακή μοίρα (*vascular niche*) τα στρωματικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό τους, τη διαφοροποίησή τους και τη μετάβασή τους στην κυκλοφορία του αίματος (Εικόνα II-3) (Kiel MJ and Morrison SJ, 2008; Wilson A and Trumpp A, 2006).

Η δεύτερη λειτουργία των MSCs σχετίζεται με την αντιμιτωτική τους ιδιότητα. Όπως τα MSCs στο μυελικό στρώμα μπορούν να διατηρήσουν τα HSC σε

λανθάνουσα κατάσταση ή μπορούν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων, έτσι και οι διαφοροποιημένοι απόγονοί τους έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο άλλων κυτταρικών πληθυσμών. Οι ινοβλάστες ή τα χονδροκύτταρα μπορούν να αναστείλουν και αυτά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων (Bocelli-Tyndall C et al., 2006; Jones S et al., 2007). Η ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης των T-λεμφοκυττάρων από τους ινοβλάστες διαμέσου της IFN- γ , καταδεικνύει ότι οι απόγονοι των MSCs σε όποιο στάδιο της διαφοροποίησης κι αν βρίσκονται, πιθανόν να ευθύνονται για την ομοιοστάση των περιφερικών λεμφοκυττάρων και να ασκούν έναν γενικότερο έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους συνδετικούς ιστούς, όπως ακριβώς συμβαίνει και στις εστίες αιμοποίησης (Haniffa MA et al., 2007; Parsonage G et al., 2005).

4. Πηγές απομόνωσης των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων – Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

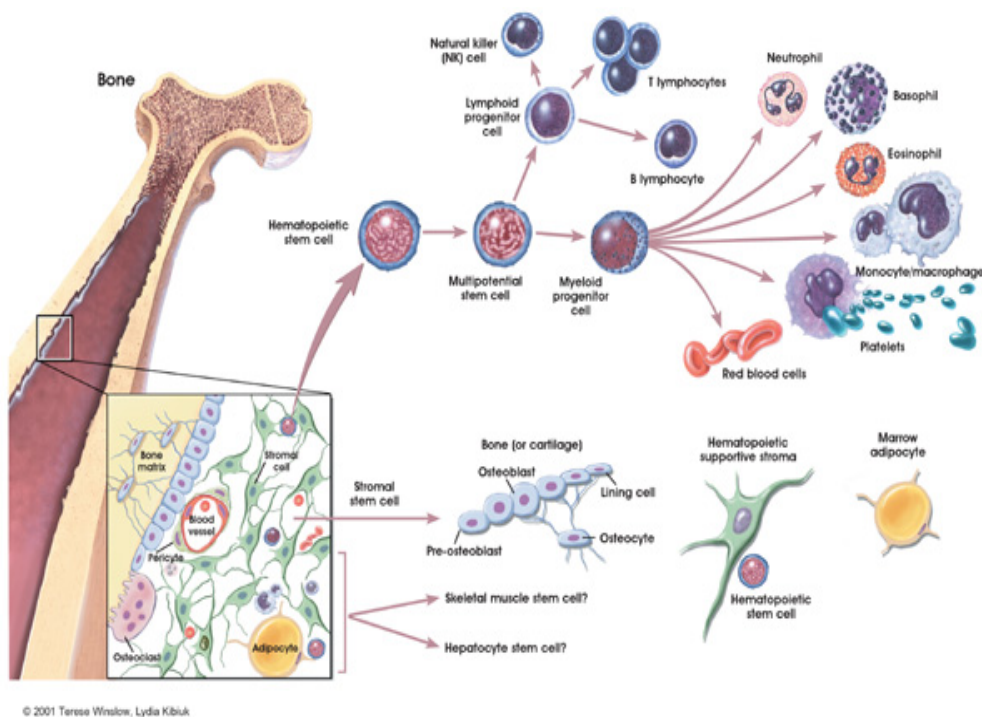
Η πρώτη εστία απ' όπου απομονώθηκαν MSCs ήταν το στρώμα του μυελού των οστών. Η παρουσία όμως των MSCs έχει πλέον διαπιστωθεί σε όλους σχεδόν τους συνδετικούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος καθώς και σε πολλούς εμβρυικούς ιστούς (in 't Anker PS et al., 2003; In 't Anker PS et al., 2004). Διάφοροι όμως παράγοντες καθορίζουν την αξία καθενός από αυτούς τους ιστούς ως πηγή MSCs. Μερικοί από αυτούς είναι: η προσβασιμότητα του ιστού – πηγής, ο βαθμός επικινδυνότητας κατά τη λήψη του, ο βαθμός ευκολίας της απομόνωσης των MSCs από αυτόν, η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των απομονωμένων MSCs και η διατήρηση των χαρακτηριστικών τους (φαινότυπος και ικανότητα διαφοροποίησης) κατά την καλλιέργεια. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω κριτήρια γίνεται αντιληπτό ότι η χρήση κάποιων ιστών για την απομόνωση MSCs πιθανόν να παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων.

4.1. Πηγές Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων Ενηλίκων

4.1.1. Ο μυελός των οστών

Σχεδόν όλες οι κλινικές εφαρμογές που αφορούν MSCs στηρίζονται σε αυτόλογα κύτταρα, που απομονώνονται από το μυελό των οστών του ασθενούς. Ο μυελός των οστών αποτελεί το «όργανο» της αιμοποίησης. Διακρίνεται σε ερυθρό και κίτρινο. Ο ερυθρός μυελός των οστών εντοπίζεται στους αυλούς των μακρών οστών και στις οστικές κοιλότητες των πλατιών και σπογγωδών οστών. Καθώς αναπτύσσεται ο οργανισμός, ο ερυθρός μυελός των οστών αντικαθίσταται σταδιακά

από κίτρινο, ο οποίος αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα. Έτσι στον ενήλικα, ο ερυθρός μυελός περιορίζεται στην κλείδα, το στέρνο και στα λαγόνια οστά της λεκάνης. Ο ερυθρός μυελός των οστών περιέχει αιμοποιητικούς πληθυσμούς σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης και ωρίμανσης καθώς και ώριμους κυτταρικούς πληθυσμούς του αίματος. Παράλληλα όμως αποτελείται και από το στρώμα το οποίο, περιλαμβάνει τα MSCs, ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, λιποκύτταρα, τριχοειδή αγγεία ενώ οστεοβλάστες και οστεοκλάστες σχηματίζουν το όριο του με το οστό (Εικόνα II-4). Η λήψη του μυελού των οστών γίνεται από τη λαγόνια ακρολοφία. Είναι επίπονη για τον ασθενή και απαιτεί γενική νάρκωση, με όποιους κινδύνους αυτή μπορεί να συνεπάγεται και εικοσιτετράωρη νοσηλεία και παρακολούθηση.



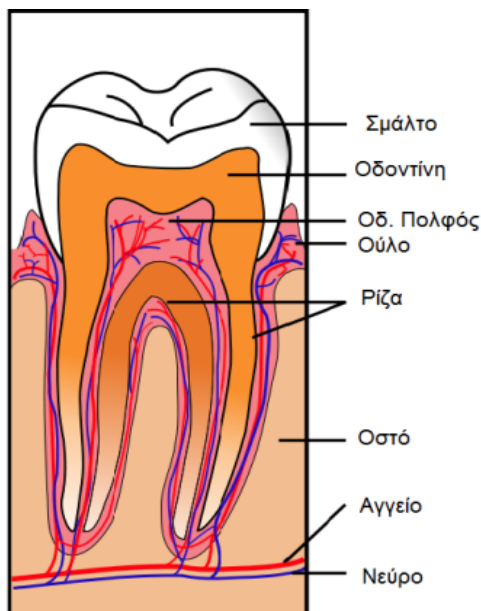
Εικόνα II-4: Ο μυελός των οστών περιέχει αιμοποιητικούς και μη-αιμοποιητικούς πληθυσμούς. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται και τα MSCs. (2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)

4.1.2. Ο λιπώδης ιστός

Ο λιπώδης ιστός διακρίνεται στον λευκό (*white*) και τον φαιό (*brown*). Ο λευκός εντοπίζεται κυρίως κάτω από το δέρμα (υποδόριο), αλλά περιβάλλει και εσωτερικά όργανα παρέχοντάς τους έτσι προστασία από πιέσεις και κραδασμούς. Στο δέρμα συσσωρεύεται στην υποδόρια στοιβάδα (*subcutaneous layer*) παρέχοντας μόνωση τόσο απέναντι στη θερμότητα όσο και το ψύχος, ενώ παράλληλα λειτουργεί

και ως αποθήκη θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον ο λευκός λιπώδης ιστός έχει ενδοκρινή δράση. Εκκρίνει, ορμόνες που σχετίζονται με το μεταβολισμό και την ομοιόσταση, κυτταροκίνες και χημειοκίνες που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Ο φαιός λιπώδης ιστός εντοπίζεται κυρίως γύρω από το λαιμό και τα μεγάλα αιμοφόρα αγγεία του θώρακα. Προκαλεί την έκλυση θερμότητας μέσω της συνεχούς λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας και άρα και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσα στα μιτοχόνδρια των κυττάρων, που έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη διάσπαση των λιπαρών οξέων. Τα τελευταία χρόνια MSCs έχουν απομονωθεί επιτυχώς από το λευκό λιπώδη ιστό (Zuk PA et al., 2001). Ωστόσο η συλλογή του αποτελεί πρόβλημα καθότι μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν συγκεκριμένα πρωτόκολλα. Το λίπος που αφαιρείται κατά τις λιποαναρροφήσεις χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό αλλά μια τέτοια τεχνική δε θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε κλινικό επίπεδο. Εξάλλου το ποσοστό του σωματικού λίπους διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο οπότε η συλλογή του δεν θα ήταν εφικτή σε όλες τις περιπτώσεις.

4.1.3. Το δόντι – Ο οδοντικός πολφός



Εικόνα II-5: Τα τμήματα του μόνιμου δοντιού. Ο οδοντικός πολφός αποτελεί πηγή MSCs.
© Sam Fentress (2005).

Η οδοντική θηλή (κατά την εμβρυογένεση), ο οδοντικός πολφός και ο περιοδοντικός σύνδεσμος των νεογιλών και των μόνιμων δοντιών, είναι ιστοί που έχουν κατά διαστήματα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση βλαστικών κυττάρων. Καλύτερα χαρακτηρισμένα είναι τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον οδοντικό πολφό, τα οποία, όπως διαπιστώθηκε, έχουν χαρακτηριστικά MSCs (Εικόνα II-5). Ο οδοντικός πολφός είναι ο μαλακός συνδετικός ιστός που βρίσκεται στο κέντρο του δοντιού. Σε αυτόν εντοπίζονται τα αγγεία και τα νεύρα του δοντιού. Παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ιστούς του δοντιού, γιατί η

συλλογή του είναι ευκολότερη, ακίνδυνη και καθόλου επίπονη για το δότη καθότι μπορεί να ληφθεί εύκολα από τα νεογιλά δόντια (Gronthos S et al., 2002; Jo YY et al., 2007).

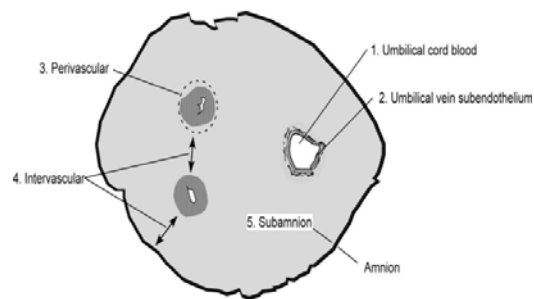
4.2. Πηγές Εμβρυικών Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

4.2.1. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα

Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα είναι ένας εμβρυϊκός ιστός. Πρόκειται για το αίμα που κυκλοφορεί στο πλακούντα και το έμβρυο μέσω του ομφαλίου λώρου. Αρχικά η αιμοποίηση γίνεται στους λεκιθικούς σάκους του πλακούντα (*yolk sacs*). Καθώς αναπτύσσεται το έμβρυο οι πληθυσμοί αιμοποιητικών κυττάρων μεταναστεύουν αρχικά στη σπλήνα και στη συνέχεια στο μυελό των οστών. Καθ' όλη λοιπόν τη διάρκεια της εγκυμοσύνης HSC κυκλοφορούν στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Ενώ αυτό το γεγονός ήταν γνωστό από τα τέλη της δεκαετίας του '70, τα τελευταία χρόνια αποδείχθηκε ότι περιέχει και άλλους πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων και MSCs. Ωστόσο, για τα τελευταία, υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με τη δυνατότητα απομόνωσής τους από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα παρά το γεγονός ότι φαίνεται ότι είναι εφικτή (Erices A et al., 2000; Lee OK et al., 2004; Yang SE et al., 2004). Μετά τον τοκετό και την απολίνωση του ομφαλίου λώρου και την απομάκρυνση του νεογνού, το ομφαλοπλακουντιακό αίμα συλλέγεται εύκολα από την ομφαλική φλέβα, με μια διαδικασία τελείως ανώδυνη και ακίνδυνη, ενώ δεν επηρεάζεται καθόλου η κατάσταση της μητέρας και του νεογνού, αφού τόσο ο πλακούντας όσο και ο ομφάλιος λώρος δεν έχουν πλέον καμία βιολογική χρησιμότητα.

4.2.2. Ο ομφάλιος λώρος

Ο ομφάλιος λώρος είναι άλλος ένας ιστός που απορρίπτεται μετά τον τοκετό. Η συλλογή του είναι εξίσου εύκολη και ακίνδυνη με αυτή του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και έχει αναφερθεί η δυνατότητα απομόνωσης MSCs από διάφορα μέρη του. Στο μεγαλύτερο τμήμα του αποτελείται από βλεννώδη συνδετικό ιστό, τη πηκτή του Wharton (*Wharton's Jelly, WJ*), που περιορίζεται εξωτερικά από το αμνιακό επιθήλιο (βέλη). Το συνδετικό ιστό διασχίζουν, για όλο το μήκος του ομφαλίου λώρου, δύο ομφαλικές αρτηρίες και η ομφαλική φλέβα. Η πηκτή του Wharton περιέχει ατρακτόμορφα και αστεροειδή κύτταρα.



Εικόνα II-6: Μεσεγχυματικά κύτταρα απομονώνονται από διάφορα σημεία του ομφαλίου λώρου: (1) από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, (2) από την ομφαλική φλέβα, (3) γύρω και ανάμεσα (4) από τις ομφαλικές αρτηρίες και (5) από τον υπαμνιακό χώρο. Η πηκτή του Wharton είναι ο συνδετικός ιστός του ομφαλίου λώρου και περιλαμβάνει και τις τρεις τελευταίες περιοχές. (Troyer, D et al. Stem Cells 2008)

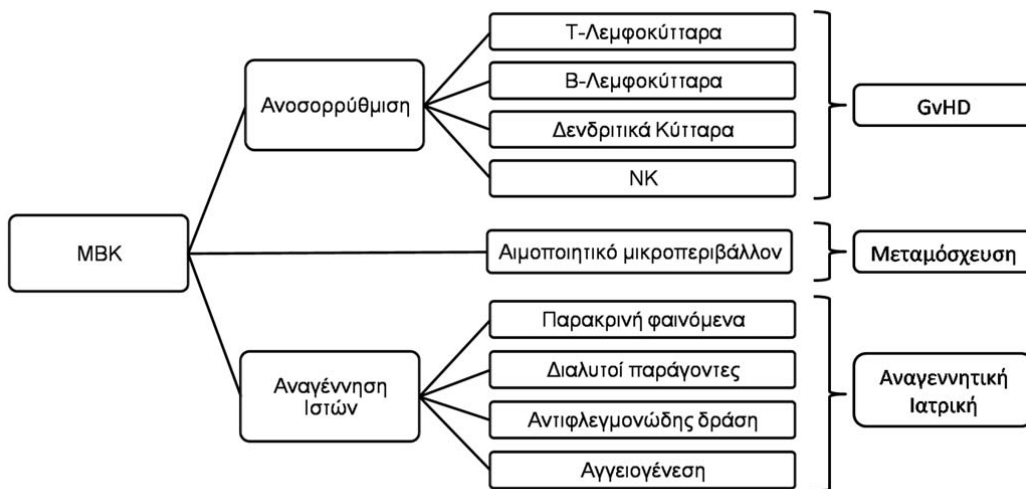
Αρχικά η ομφαλική φλέβα (Romanov YA et al., 2003) και ο περιαγγειακός χώρος (Sarugaser R et al., 2005) χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την απομόνωση βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο φαίνεται ότι ολόκληρη η πηκτή του Wharton αποτελεί σημαντική πηγή εμβρυικών MSCs (Εικόνα II-6) (Lu LL et al., 2006; Wang HS et al., 2004). Μέχρι στιγμής όμως, όπως το ομφαλοπλακουντιακό αίμα έτσι κι ο ομφάλιος λώρος δεν έχει μελετηθεί επαρκώς και παραμένει άγνωστο αν θα μπορούσε να αποτελέσει πηγή MSCs για κλινική χρήση.

4.2.3. Το Αμνιακό Υγρό

Το αμνιακό υγρό σχηματίζεται νωρίς κατά την εγκυμοσύνη μέσα στον αμνιακό σάκο, από διήθηση υγρών του μητρικού και του εμβρυικού εξωκυττάριου διαμερίσματος. Με την ανάπτυξη του εμβρύου αυξάνεται κι ο όγκος του καθώς προστίθενται και οι εκκρίσεις των βλεννογόνων, των επιθηλίων (δέρμα, αναπνευστικό, εντερικό), αλλά και των ούρων του. Το αμνιακό υγρό είναι δυναμικό καθώς συνεχώς «απορροφάται» και αποβάλλεται από το έμβρυο και αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, φωσφολιπίδια, ουρία και ηλεκτρολύτες. Από κυτταρικής πλευράς η σύστασή του μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Στο αμνιακό υγρό απαντώνται κύτταρα που προέρχονται και από τις τρεις εμβρυικές στιβάδες. Αυτά χωρίζονται με βάση τα μορφολογικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά σε τρεις κατηγορίες: τα επιθηλιοειδή κύτταρα (*E-type*), τα κύτταρα αμνιακού υγρού (*AF-type*) και τους ινοβλάστες (*F-type*). Τα *E-type* πιθανότατα προέρχονται από το δέρμα και τα ούρα του εμβρύου, τα *AF-type* από τις εμβρυικές μεμβράνες και την τροφοβλάστη ενώ τα *F-type* από τους ινοβλάστες του δέρματος και τους ινώδεις συνδετικούς ιστούς του εμβρύου. Επιπλέον στο αμνιακό υγρό έχουν παρατηρηθεί πρόδρομα νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα. Ο φυσιολογικός ρόλος του αμνιακού υγρού είναι να προστατεύει το έμβρυο από τις μηχανικές πιέσεις ενώ συμβάλει και στις ανταλλαγές συστατικών. Από εξέταση της χημικής και κυτταρικής του σύστασης μπορούν να διαγνωστούν παθολογικές καταστάσεις και γενετικές ανωμαλίες του εμβρύου. Τα τελευταία χρόνια κατέστη δυνατή η απομόνωση MSCs από το αμνιακό υγρό, όμως η συλλογή του μπορεί να γίνει μόνο με αμνιοκέντηση που ως τεχνική είναι δεν είναι ακίνδυνη για τη μητέρα και το έμβρυο (Tsai MS et al., 2004).

5. Κλινικές εφαρμογές

Ακόμα κι αν οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται όταν MSCs χορηγούνται σε έναν οργανισμό παραμένουν, σε μεγάλο βαθμό, άγνωστοι, οι κλινικές μελέτες που στηρίζονται στη χρήση τους πολλαπλασιάζονται με ταχύτατους ρυθμούς. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις ιδιότητές τους, οι οποίες δίνουν στα MSCs τη δυνατότητα, θεωρητικά τουλάχιστον, να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύτατο πεδίο εφαρμογών (Εικόνα II-7). Η αλληλεπίδρασή τους με το ανοσοποιητικό θα μπορούσε να αποτελέσει λύση σε παθήσεις που οφείλονται στην απορρύθμισή του, όπως είναι για παράδειγμα τα αυτοάνοσα νοσήματα ή ακόμα και σε περιπτώσεις όπου η φυσιολογική ανοσολογική απόκριση είναι ανεπιθύμητη (π.χ. στις μεταμοσχεύσεις). Από την άλλη πλευρά ο πολυδύναμος χαρακτήρας τους αλλά και η ικανότητά τους να ελέγχουν άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική. Τέλος η διαμόρφωση του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος από τα MSCs είναι ένα από τα ζητούμενα των κλινικών μελετών που τα χορηγούν σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση HSC.



Εικόνα II-7: Οι ιδιότητες των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων είναι αυτές που καθορίζουν τις κλινικές εφαρμογές τους.

(Battiwalla M. and Hematti P. Cytotherapy 2009; 11:503)

5.1. Μεταμόσχευση

Η πρώτη εφαρμογή των MSCs σε ευρεία κλίμακα ήταν η έγχυσή τους σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση HSC. Από το 2004, που πρωτοεφαρμόστηκε η τεχνική αυτή, μέχρι σήμερα, έχει αυξηθεί σημαντικά ο αριθμός των

κλινικών μελετών με MSCs στη μεταμόσχευση τόσο HSC όσο και ιστών και οργάνων.

- *MSCs στη Μεταμόσχευση HSCs*

Τα MSCs χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 2004 από την Le Blanc και τους συνεργάτες της (Le Blanc K et al., 2004) για την αντιμετώπιση της νόσου του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (*Graft versus Host Disease – GvHD*). Ο ασθενής ήταν ένα νεαρό αγόρι που παρουσίασε οξύ (*acute*) GvHD έπειτα από αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών και δεν ανταποκρινόταν σε καμία θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Η έγχυση MSCs όμως αποδείχθηκε αποτελεσματική, ανοίγοντας το δρόμο για την καθιέρωση της μεθόδου στην κλινική πρακτική καθώς αυτήν την αρχική προσπάθεια, την ακολούθησαν πολλές μελέτες με εξίσου καλά αποτελέσματα. Σε αυτές, τα MSCs χορηγήθηκαν είτε προληπτικά, είτε μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου (Le Blanc K et al., 2008). Ένας επιπλέον λόγος που συνηγορεί στη χρήση αυτών των κυττάρων στις μεταμοσχεύσεις HSC είναι η επίδρασή τους στην εγκατάσταση του μοσχεύματος στο μυελό των οστών του λήπτη. Μελέτες σε ζωικά πρότυπα αλλά και στον άνθρωπο έδειξαν ότι η ταυτόχρονη χορήγηση μεσεγχυματικών και HSC επιταχύνει την εγκατάσταση των τελευταίων στο μυελό των οστών (Ball LM et al., 2007), αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιβίωσης του ασθενούς. Το φαινόμενο αυτό πιθανό να οφείλεται στην έκκριση από τα MSCs του παράγοντα του μυελικού στρώματος *Stromal cell-Derived Factor -1* (SDF-1) (Ponomaryov T et al., 2000), μιας χημειοκίνης που σχετίζεται με τη μετανάστευση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (Peled A et al., 1999). Γενικότερα τα MSCs παίζουν σημαντικό επικουρικό ρόλο στη μεταμόσχευση των HSC ο οποίος εκδηλώνεται σε πολλά επίπεδα αλλά τελικά συντελεί στην καλύτερη μετεγχειρητική πορεία του ασθενούς, αυξάνοντας σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης και ανάρρωσης σε μια πολύ δύσκολα αντιμετωπίσιμη κατηγορία νοσημάτων

- *MSCs στη μεταμόσχευση ιστών και οργάνων.*

Η απόρριψη ενός μοσχεύματος από το ανοσοποιητικό σύστημα του λήπτη στηρίζεται σε μηχανισμούς ανάλογους με αυτούς που προκαλούν το GvHD. Είναι λοιπόν λογικό, ένας από τους τομείς όπου η κλινική έρευνα επιχειρεί να εκμεταλλευτεί την εμπειρία της χρήσης MSCs για την

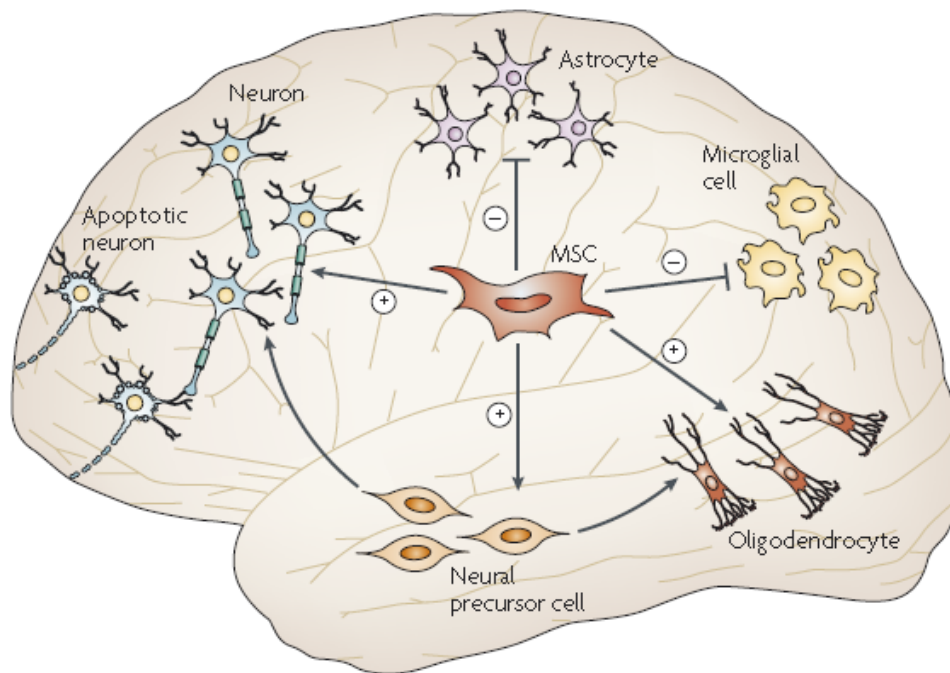
αντιμετώπιση του GnHD, να είναι η μεταμόσχευση ιστών και οργάνων. Έτσι τα τελευταία χρόνια γίνονται πολλές προσπάθειες που αφορούν στη πρόληψη της απόρριψης του μοσχεύματος με συνδυασμούς φαρμακευτικής αγωγής και μεσεγχυματικών κυττάρων. Μέχρι στιγμής οι μεταμοσχευμένοι ασθενείς είναι αναγκασμένοι να παίρνουν δια βίου ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, μια αγωγή αφενός με πολλές δυσάρεστες παρενέργειες και που τους καθιστά ευάλωτους, αφετέρου, σε λοιμώξεις. Επιδίωξη είναι η χρήση MSCs να περιορίσει την ανάγκη για ανοσοκατασταλτικά φάρμακα επιτρέποντας στον οργανισμό του ασθενούς να απαντά στα μικρόβια. Η πιο πρόσφατη εξέλιξη στο συγκεκριμένο τομέα επιτεύχθηκε από την ομάδα του Vanikar όταν χορήγησαν μεσεγχυματικά και HSC ως προφύλαξη σε μεταμοσχεύσεις νεφρού (Vanikar AV et al., 2011).

5.2. Αυτοάνοσες παθήσεις

Από τη στιγμή που παρατηρήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση των MSCs και ο τρόπος με τον οποίο καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος άρχισαν να γίνονται προσπάθειες για την εφαρμογή αυτής της ιδιότητας στη θεραπεία των αυτοάνοσων παθήσεων. Πρόκειται για μια ευρεία κατηγορία νοσημάτων που προκαλούν βλάβες σε πολλούς ιστούς και όργανα και τις περισσότερες φορές δεν έχουν οριστική θεραπεία. Προκαταρκτικές μελέτες σε ζωικά πρότυπα παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα αφού πέρα από τον περιορισμό της φλεγμονής τα MSCs φάνηκαν να βοηθούν, με την έκκριση κυτταροκινών, και στη μερική επιδιόρθωση των κατεστραμμένων ιστών (Εικόνα II-8), όπως για παράδειγμα σε μύες με αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (*Experimental Allergic Encephalitis, EAE*) (Zappia E et al., 2005).

Η μετάβαση από τα πειράματα σε ζώα στον άνθρωπο είναι σταδιακή και τα εργαστηριακά αποτελέσματα δεν επαληθεύονται πάντα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια αυξάνεται ο αριθμός των κλινικών μελετών με MSCs. Ένα παράδειγμα είναι η Πολλαπλή Σκλήρυνση (*Multiple Sclerosis*) (Slavin S et al., 2008) όπου συντελείται μια κοινή Ευρωπαϊκή προσπάθεια προκειμένου να συντονιστούν οι κλινικές μελέτες σε πανευρωπαϊκό επίπεδο. Στόχος είναι να παγιωθούν εργαστηριακά και κλινικά πρωτόκολλα ώστε να λαμβάνονται συγκρίσιμα αποτελέσματα και να διευκολύνεται η ερμηνεία τους. Παράλληλα πολλές ερευνητικές ομάδες εφαρμόζουν πειραματικές θεραπείες με MSCs για την αντιμετώπιση της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (*Amyotrophic Later Sclerosis*) (Mazzini L et al., 2010) το συστηματικό ερυθηματώδη

λύκο (*Systemic Lupus Erythematosus*) (Carrion F et al., 2010) τον αυτοάνοσο διαβήτη τύπου I (*Type I diabetes melitus*) (Fiorina P et al., 2009) το σκληρόδερμα (*Systemic Sclerosis*) και την αγγειίτιδα (*vasculitis*) (Tyndall A and Uccelli A, 2009). Σε αυτές τις περιπτώσεις παρουσιάζεται εξασθένηση της συμπτωματολογίας και επιβράδυνση της νόσου. Παρόλα' αυτά πρόκειται για μελέτες στο αρχικό τους στάδιο και θα χρειαστεί καιρός ώστε να εμφανιστούν αποτελεσματικές θεραπείες που χρησιμοποιούν MSCs είτε σαν μοναδικό θεραπευτικό παράγοντα ή σε συνδυασμό με φαρμακευτική αγωγή.



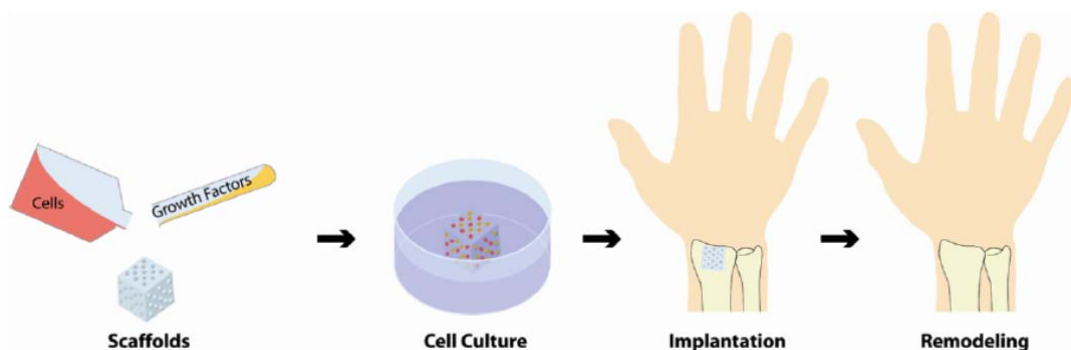
Εικόνα II-8: Τα MSCs χορηγούμενα σε μύες με EAE περιορίζουν τη φλεγμονή καταστέλοντας τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων (*astrocytes*) και της μικρογλοίας (*microglial cells*). Επιπλέον προστατεύουν τα νευρικά κύτταρα (*neuron*) και τα ολιγοδενδροκύτταρα (*oligodendrocytes*) από την απόπτωση ενώ προάγουν τον πολλαπλασιασμό των προγονικών νευρικών κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε νευρώνες και ολιγοδενδροκύτταρα. (Uccelli A et al Nat Rev Immunol 2008, 8:726)

5.3. Ιστική ανάπλαση

Στις αρχές της δεκαετίας του '90 διαπιστώθηκε ότι τα MSCs, έπειτα από τη χορήγησή τους σε έναν οργανισμό, μεταναστεύουν κι εγκαθίστανται στους περισσότερους ιστούς και όργανα (Devine SM et al., 2003; Pereira RF et al., 1995; Pittenger MF et al., 1999). Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με τη μεγάλη δυναμικότητα διαφοροποίησης που τα διακρίνει, έδωσε στους επιστήμονες την

ελπίδα, ότι τα MSCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ευρέως για την ιστική ανάπτυξη. Τα τελευταία χρόνια έγιναν πολλές προσπάθειες για την αντιμετώπιση, με τη χρήση MSCs, μεταβολικών νοσημάτων, γενετικών ανωμαλιών αλλά και σοβαρών τραυματισμών, που προκαλούν βλάβες στο ιστούς. Τις περισσότερες φορές τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα και ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις όπου ο ασθενής παρουσίασε κάποια βελτίωση, δεν αποδείχθηκε ότι η αναγέννηση του ιστού προήλθε από την απευθείας διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η Ατελής Οστεογένεση (*Osteogenesis Imperfecta*). Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρήθηκε εγκατάσταση των MSCs στα οστά και αύξηση της οστικής μάζας (Horwitz EM et al., 2002; Pereira RF et al., 1998). Τα αποτελέσματα μάλιστα ήταν τόσο ενθαρρυντικά που επιχειρήθηκε έγχυση αλλογενών MSCs στο έμβρυο *in utero*, δηλαδή πριν από τον τοκετό (Le Blanc K et al., 2005).

Παρόλο που οι παρατηρήσεις στους ασθενείς που πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο δεν επιβεβαιώνονται σε άλλες εκφυλιστικές παθήσεις, η ιστική ανάπτυξη παραμένει ένας από τους κύριους στόχους των κλινικών εφαρμογών των MSCs. Αφενός η βαθύτερη κατανόηση του τροφικού – εκκριτικού τους ρόλου, αφετέρου δε η εξέλιξη της εμβιομηχανικής ιστών (*tissue engineering*), οδηγούν σε μια νέα αντιμετώπιση αυτής της κατηγορίας νοσημάτων με την ανάπτυξη νέων μεθόδων, την προσαρμογή των κλινικών πρακτικών και την αποτελεσματικότερη χρήση του διαθέσιμου βιολογικού υλικού. Έτσι διευρύνεται το πεδίο της έρευνας και κινείται πλέον παράλληλα σε δύο άξονες: την ανάλυση των διαφορετικών προφίλ έκφρασης κυτταροκινών των MSCs που προέρχονται από διαφορετικές εστίες με σκοπό την



Εικόνα II-9: Σχηματική αναπαράσταση της χρήσης εμβιομηχανικής ιστών στην αναγέννηση του οστού. Αρχικά τα ικρίωματα καλλιεργούνται παρουσία κυττάρων και αυξητικών παραγόντων και στη συνέχεια εμφυτεύονται στον τραυματισμένο ιστό. Ακολουθεί σταδιακή αναγέννηση του ιστού και απορρόφηση του ικρίωματος. (Olivier V et al., Drug Discov Today 2004;9:803–811.)

επιλογή των καταλληλότερων κυττάρων, ανά περίπτωση, και την ανάπτυξη ικριωμάτων (*scaffolds*) ικανών να συντηρήσουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των MSCs που θα εμφυτεύονται απευθείας στον τραυματισμένο ιστό. Ειδικότερα στον κλάδο εμβιομηχανικής των ιστών, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική πρόοδος, με την ανάπτυξη νέων τεχνικών που επιτρέπουν τη διόρθωση βλαβών σε ιστούς όπως οι χόνδροι (Frenkel SR and Di Cesare PE, 2004) ή τα οστά (Olivier V et al., 2004). Η τεχνική βασίζεται στην αντικατάσταση του φθαρμένου ιστού με ικριώματα τα οποία έχουν αποικηθεί από κύτταρα (Εικόνα II-8). Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής είναι ώριμα, διαφοροποιημένα κύτταρα του ίδιου του ασθενούς, ωστόσο τα MSCs θα μπορούσαν να συμβάλουν καθοριστικά στον τομέα αυτό λόγω των ιδιοτήτων τους.

5.4. Προοπτικές των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

Παρόλο που οι μελέτες για τη κλινική χρήση των MSCs επικεντρώνονται κυρίως στους τομείς που προαναφέρθηκαν, δεν αναλώνεται εκεί το ενδιαφέρον των ερευνητών. Η ιδιότητα των κυττάρων αυτών να μεταναστεύουν σε διαφορετικούς ιστούς όταν χορηγούνται σε έναν οργανισμό θα μπορούσε, εκτός των άλλων, να αποτελέσει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στις στοχευμένες θεραπείες. Έχει διαπιστωθεί ότι σε ασθενείς με κακοήθεις όγκους τα MSCs εγκαθίστανται κατά προτίμηση στην περιοχή του όγκου. Παρόλο που σε φυσιολογικές συνθήκες τα μεσεγχυματικά καταστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα, κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις μπορούν να το ενισχύσουν. Έτσι σε μια μελέτη όπου επάχθηκε η παραγωγή IFN- γ από τα MSCs πριν τη χορήγησή τους σε ασθενείς με νεοπλασίες, παρατηρήθηκε συρρίκνωση του όγκου λόγω ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού κατά των κακοηθών κυττάρων (Studeniy M et al., 2002). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί μόνο από την εγκατάστασή των MSCs στην περιοχή του όγκου και διατήρηση της έκκρισης της κυτταροκίνης. Αυτό είναι ένα μόνο παράδειγμα από τις προοπτικές που ανοίγονται για τη χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές. Σε άλλες περιπτώσεις, και έπειτα από κατάλληλη διέγερση, μπορούν να δράσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζοντας μόρια MHC cl II και να ενεργοποιήσουν τα T-λεμφοκύτταρα (Chan JL et al., 2006; Stagg J et al., 2006). Συνοψίζοντας τα MSCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών (Loebinger MR et al., 2009) ή ως κύτταρα που υποβοηθούν το ανοσοποιητικό σύστημα, στην αντικαρκινική θεραπεία, στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και σε πολλές άλλες περιπτώσεις.

6. Περιορισμοί Στη Χρήση Των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι τα MSCs αξιοποιούνται, μέχρι στιγμής, σε συγκεκριμένες κλινικές εφαρμογές παρόλο που υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε ακόμα περισσότερες περιπτώσεις και τα αποτελέσματα της χρήσης τους έχουν μεγάλα περιθώρια βελτίωσης. Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχουν σημαντικοί πρακτικοί λόγοι που περιορίζουν τη χρήση τους ενώ είναι πιθανό βιολογικοί παράγοντες να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους. Φαίνεται ότι το κυριότερο εμπόδιο προκύπτει από το γεγονός ότι σχεδόν αποκλειστική πηγή των MSCs για κλινικές μελέτες είναι ο μυελός των οστών του ασθενούς. Όπως όμως προαναφέρθηκε, τα βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από τους ενήλικες είναι «γηρασμένα», έχουν μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και περιορισμένη δυναμικότητα διαφοροποίησης. Αντίστοιχα αποδείχθηκε ότι και τα MSCs που προέρχονται από το μυελό των οστών ενηλίκων δοτών πολλαπλασιάζονται με βραδύτερους ρυθμούς και έχουν μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης (Mueller SM and Glowacki J, 2001; Roobrouck VD et al., 2008; Stenderup K et al., 2003) συγκριτικά με τα εμβρυικά μεσεγχυματικά κύτταρα ενώ ο αριθμός τους μειώνεται δραστικά με την ηλικία (Haynesworth SE et al., 1994; Nishida S et al., 1999). Στην κλινική πρακτική αυτό μεταφράζεται, συχνά, σε δυσκολία απόκτησης της απαραίτητης θεραπευτικής δόσης κυττάρων. Με τα μέχρι στιγμής δεδομένα θεωρείται ότι απαιτούνται 1×10^6 κύτταρα ανά χιλιόγραμμο βάρους του ασθενούς (Troyer DL and Weiss ML, 2008). Για να εξασφαλιστεί όμως αυτός ο αριθμός, όταν ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι μικρός, πρέπει να παραμένουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα σε καλλιέργεια, και πιθανόν και να χρειάζονται πολλές ανακαλλιέργειες, με δύο σημαντικές επιπτώσεις. Καταρχάς, σε επείγουσες περιπτώσεις, όπου ακόμα και η μικρότερη καθυστέρηση θα μπορούσε να επιβαρύνει την κατάσταση του ασθενούς, η χρήση MSCs του μυελού των οστών καθίσταται αδύνατη. Το δεύτερο πρόβλημα είναι ότι η παρατεταμένη καλλιέργεια και πολλαπλασιασμός μπορεί να επιφέρει επιγενετικές αλλαγές στα κύτταρα μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας ή και να τα καταστήσει ακατάλληλα για κλινική χρήση.

Εκτός από τα πρακτικά προβλήματα που προκύπτουν από την απομόνωση των MSCs από το μυελό των οστών των ασθενών, πολλά είναι και τα αναπάντητα ερωτήματα που αφορούν στη βιολογία τους. Συγκεκριμένα δεν έχει γίνει καμία μελέτη που να εξετάζει αν η νόσος, την οποία η έγχυση των MSCs επιχειρεί να θεραπεύσει, αφήνει ανεπηρέαστα τα ίδια τα κύτταρα. Για παράδειγμα αυτή τη στιγμή χορηγούνται MSCs για την αντιμετώπιση ορισμένων αυτοάνοσων παθήσεων. Αν και

οι μηχανισμοί που τις προκαλούν παραμένουν εν μέρει άγνωστοι, είναι γενικά αποδεκτό ότι σε αυτές τις περιπτώσεις επηρεάζεται η περιφερική ομοιοστασία του οργανισμού και μειώνεται η περιφερική ανοχή. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, στη φυσιολογική λειτουργία τα MSCs συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην περιφερική ομοιοστασία. Μήπως λοιπόν η εμφάνιση κάποιων νοσημάτων οφείλεται στην απώλεια αυτής της ιδιότητας των MSCs; Μπορεί η θεραπευτική ικανότητα των MSCs να περιορίζεται από την ίδια τη νόσο; Όσο αυτά τα καίρια ερωτήματα μένουν αναπάντητα κι όσο δεν ξεπερνιούνται τα υπάρχοντα τεχνικά προβλήματα της απομόνωσης και καλλιέργειας των MSCs οι κλινικές τους εφαρμογές θα είναι περιορισμένες και μεγάλο μέρος των δυνατοτήτων που προσφέρουν θα μένουν ανεκμετάλλετες.

7. Αντιμετώπιση των προβλημάτων στην «πηγή» τους

Αφού τα κύρια προβλήματα, που περιορίζουν τις κλινικές εφαρμογές των MSCs, φαίνεται ότι προκαλούνται σε μεγάλο βαθμό λόγω της απομόνωσής τους από το μυελό των οστών του ασθενούς, η αναζήτηση εναλλακτικών πηγών πιθανόν να αποτελέσει τη λύση. Τα εμβρυικά μεσεγχυματικά κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν όλες τις κύριες ιδιότητες των MSCs αλλά και κάποιες ουσιώδεις διαφορές (Gotherstrom C et al., 2005). Διαφέρει, για παράδειγμα, το προφίλ της πρωτεϊνικής τους έκφρασης καθώς και οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες (Troyer DL and Weiss ML, 2008). Επιπλέον, ενώ μπορούν να διαφοροποιηθούν στις ίδιες κυτταρικές σειρές με αυτά του μυελού, διαφέρουν ως προς την ευκολία με την οποία αυτό συμβαίνει. Για παράδειγμα τα εμβρυικά MSCs σε αντίθεση με αυτά των ενηλίκων διαφοροποιούνται εύκολα σε οστεοκύτταρα αλλά με μεγάλη δυσκολία σε λιποκύτταρα (Baksh D et al., 2007). Ωστόσο τα εμβρυικά πολλαπλασιάζονται ταχύτερα και μπορούν να διατηρηθούν σε καλλιέργεια για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους καθότι είναι «νεαρότερα» και έχουν μακρύτερα τελομερή (Campagnoli C et al., 2001; Guillot PV et al., 2007). Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών μπορεί εύκολα να αποκτηθεί μεγάλος αριθμός εμβρυικών MSCs. Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν ως επί το πλείστον σε κύτταρα που απομονώθηκαν από το εμβρυικό ήπαρ. Για να μπορέσουν όμως κάποια στιγμή τα MSCs εμβρυικής προέλευσης να χρησιμοποιηθούν ευρέως σε κλινικές εφαρμογές θα πρέπει να λαμβάνονται εύκολα και χωρίς κίνδυνο για το έμβρυο. Το αμνιακό υγρό είναι μια από τις πηγές απομόνωσης των εμβρυικών MSCs αλλά η λήψη του δεν είναι ακίνδυνη αφού σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί κατά την αμνιοκέντηση να προκληθεί ακόμα και

αποβολή. Επιπλέον ο όγκος του είναι περιορισμένος και όταν γίνεται λήψη του προέχει η χρήση του για διαγνωστικούς σκοπούς. Αντίθετα το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και ο ομφάλιος λώρος αποτελούν ιδανικές περιπτώσεις αφού μετά τον τοκετό θεωρούνται πλέον άχρηστα βιολογικά υλικά και καταστρέφονται. Η συλλογή τους είναι εύκολη, εξίσου ακίνδυνη για τη μητέρα και για το έμβρυο, και μπορεί να γίνει συστηματικά, όπως αποδείχθηκε, τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη των Τραπεζών ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Σε αυτές τις Τράπεζες, ένας μεγάλος αριθμός μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος κρίνεται ακατάλληλος και καταστρέφεται λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε HSC. Οι μονάδες αυτές, όπως και ο ιστός του ομφαλίου λώρου που τις συνοδεύει θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια σημαντική πηγή MSCs. Τα MSCs αυτά, θα προέρχονται από υγιή οργανισμό και θα μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν *in vitro* και να καταψυχθούν μέχρι να ζητηθούν για χρήση από κάποιο ασθενή. Προκειμένου όμως να γίνει αυτό εφικτό θα πρέπει πρώτα να διαπιστωθεί αν το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και ο ομφάλιος λώρος μπορούν να επιτελέσουν αυτό το ρόλο, αν δηλαδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές MSCs για κλινικές εφαρμογές. Αυτό προϋποθέτει τη διερεύνηση της δυνατότητας συστηματικής απομόνωσης εμβρυικών MSCs καθώς και τη μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων αυτών των κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1. Σκοπός της μελέτης

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός κλινικών δοκιμών με χρήση MSCs καθιστά επιτακτική την ανάγκη για ανεύρεση μιας πηγής των κυττάρων αυτών, η οποία θα επέτρεπε τη συστηματική απομόνωσή τους και την επέκτασή τους σε επαρκή, για κλινικές εφαρμογές, βαθμό. Επιπλέον, η δυνατότητα απομόνωσης εμβρυϊκών κυττάρων, λόγω των ιδιοτήτων τους, θα μπορούσε πιθανότατα να ενισχύσει τις εφαρμογές αυτές, ξεπερνώντας τις δυσκολίες που αντιμετωπίζονται αυτή τη στιγμή με τα MSCs των ενηλίκων δοτών/ασθενών.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή, εστίασε στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα και τον ομφάλιο λώρο ως δυνητικές πηγές εμβρυϊκών MSCs για κλινικές εφαρμογές, βασισμένη στα πλεονεκτήματα των ιστών αυτών και ειδικότερα:

- Το γεγονός ότι τόσο το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, όσο κι ο ομφάλιος λώρος, αποτελούν (μετά τον τοκετό), άχρηστο βιολογικό υλικό, για τη μητέρα και το νεογνό.
- Το γεγονός ύπαρξης μεγάλης διαθεσιμότητας του βιολογικού υλικού, καθότι, ενώ συλλέγεται συστηματικά από τις Τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος με σκοπό τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, μεγάλο ποσοστό κρίνεται ακατάλληλο, λόγω της χαμηλής του περιεκτικότητας σε HSCs, και καταστρέφεται τη στιγμή που θα μπορούσε να χρησιμεύσει για απομόνωση MSCs.
- Το γεγονός ότι πρόκειται για εμβρυϊκούς ιστούς οπότε και θα επέτρεπαν την απομόνωση εμβρυϊκών MSCs.

Σκοπός ήταν να διαπιστωθεί αν το ομφαλοπλακουντιακό αίμα ή/και ο ομφάλιος λώρος πληρούσαν τις απαιτούμενες προϋποθέσεις, που οφείλει να πληροί μία πηγή κυττάρων για κυτταρικές θεραπείες. Αρχικά διερευνήθηκε εάν ήταν δυνατή η συστηματική απομόνωση MSCs από αυτές, διερευνώντας παράλληλα εναλλακτικές μεθόδους εμπλουτισμού και καλλιέργειας των κυττάρων προκειμένου να αυξηθεί η απόδοσή τους. Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα απομονωθέντα κύτταρα, ώστε να διαπιστωθεί αφενός εάν είχαν τα χαρακτηριστικά των MSCs, αφετέρου δε εάν ήταν εφικτή η *in vitro* επέκτασή τους ώστε να λαμβάνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα τουλάχιστον 100×10^6 κύτταρα, ένας αριθμός ικανοποιητικός, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των τρεχουσών κλινικών δοκιμών (Troyer DL et al., 2008). Καθότι ο χαρακτηρισμός των MSCs είναι δυνατός μόνο αν ληφθούν υπόψη τα φαινοτυπικά

τους χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με τις ιδιότητές τους (Horwitz EM et al., 2005 και Dominici M et al., 2006), εξετάστηκαν, η μορφολογία, ο ανοσοφαινότυπος, η γονιδιακή έκφραση και η δυνατότητα ελεγχόμενης διαφοροποίησης των κυττάρων που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και τον ομφάλιο λώρο σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα.

Δεδομένου του γεγονότος ότι στις κλινικές εφαρμογές με κύτταρα, ο χρόνος που μεσολαβεί από την απομόνωση των κυττάρων μέχρι τη χρήση τους μπορεί να είναι αποτρεπτικός για τη διατήρηση των κυττάρων σε καλλιέργειες, σε ένα επόμενο στάδιο μελετήθηκε η δυνατότητα κρυοσυντήρησης των MSCs του ομφαλίου λώρου και κατά πόσο αυτή επηρεάζει τα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Επιπλέον, η επιτυχής κρυοσυντήρηση των κυττάρων, θα αποσυνέδε την πράξη της απομόνωσης των MSCs από τη χορήγησή τους, αφού με μία μόνο φάση απομόνωσης και εξάπλωση των κυττάρων θα μπορούσε να διατηρηθεί ένα κυτταρικό «αποθεματικό» ικανό να χρησιμοποιηθεί σε επαναλαμβανόμενες εφαρμογές.

Τέλος, και προκειμένου να διαπιστωθεί η καταλληλότητα των MSCs του ομφαλίου λώρου για κλινικές εφαρμογές ιστικής ανάπλασης, επιχειρήθηκε ο αποικισμός, από αυτά, ικριωμάτων. Ο συνδυασμός κυττάρων με βιοσυμβατά ικριώματα θα επέτρεπε τη στοχευμένη χορήγηση των MSCs στον ανθρώπινο οργανισμό, σε παθολογικούς ή τραυματισμένους ιστούς, και τη διατήρησή τους στο σημείο ενδιαφέροντος, σε αντίθεση με την απευθείας έγχυση κυττάρων που οδηγεί στη διασπορά τους σε όλους τους ιστούς (Pittenger et al., 1999).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Εξοπλισμός

- Ανάστροφο μικροσκόπιο [LEICA- DMIL]
- Αντλία αναρρόφησης [GILSON Aspiration station]
- Αυτόματος μικροτόμος παραφίνης [LEICA RM2255]
- Αυτόκαυστο [TECNO-GAZ]
- Δοχείο σταδιακής κατάψυξης, Mr. Frosty® [Nalgene]
- Επωαστικός κλίβανος αερίου CO₂ [THERMO Forma]
- Ζυγός [METTLER TOLEDO AE285]
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II [NUAIRE]
- Θερμαινόμενη πλάκα [Bioline]
- Καταψύκτης -80°C [KRYOTEC]
- Κυτταρομετρητής ροής [Coulter Beckman EPICS XL-MCL]
- Μικροφυγόκεντρος [Eppendorf- Refrigerated Microcentrifuge 5417R]
- Σύστημα απεικόνισης πηκτωμάτων αгарόξης [Uvitec FIREREADER - Gel documentation system]
- Ορθό μικροσκόπιο [LEICA- DM L52]
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων αгарόξης [Olerup - Gel complete system]
- Υδατόλουτρο [Memmert]
- Φυγόκεντρος [Eppendorf-Centrifuge 5804]
- Φωτόμετρο [General Electric – NanoVue Plus]
- Ψυγείο 4°C [HELMER]

2. Συλλογή και μεταφορά βιολογικού υλικού

2.1. Υλικά

- Ασκός συλλογής ομφαλοπλακουντιακού αίματος με αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών, φωσφορικών αλάτων και δεξτρόξης (CPD) [Macopharma SA, Mousseaux, France]

- ο Σύσταση CPD (για 1000ml με τελικό pH 5,6 και 285mM Na):
 - ένυδρο κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7 \cdot 1H_2O$): 3,27gr
 - δίδυδρο κιτρικό νάτριο ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$): 26,3gr
 - δίδυδρο φωσφορικό νάτριο ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$): 2,51gr
 - ένυδρη δεξτρόζη ($C_6H_{12}O_6 \cdot 1H_2O$): 25,5gr
 - Απιονοσμένο νερό (dH_2O) μέχρι τελικό όγκο 1000ml
- Εργαλεία:
 - ο Χειρουργικές λαβίδες
 - ο Χειρουργικό ψαλίδι
- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Αποστειρωμένες γάζες
 - ο Αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες με καπάκι, χωρητικότητας 50ml (Falcon – 50ml) [Becton Dickinson]
 - ο Σύριγγα 60ml [Becton Dickinson]
 - ο Ισοθερμική τσάντα μεταφοράς βιολογικού υλικού της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος
 - ο Παγοκύστες
- Διαλύματα - Αντιδραστήρια:
 - ο Τοπικό αντισηπτικό διάλυμα χειρουργικού τύπου - (Betadine solution)

2.2. Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος για απομόνωση κυττάρων

Οι συλλογές ομφαλοπλακουντιακού αίματος έγιναν από νοσηλεύτριες της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος από τελειόμηνους τοκετούς και έπειτα από γραπτή συναίνεση της μητέρας. Κάθε συλλογή πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση του τοκετού, την απολίνωση του ομφαλίου λώρου και προτού αφαιρεθεί ο πλακούντας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Με μία γάζα με Betadine, αποστειρώθηκαν περί τα 10cm στο άκρο του ομφαλίου λώρου και όσο το δυνατό πλησιέστερα στην αιμοστατική λαβίδα που είχε τοποθετήσει ο μαιευτήρας για την απολίνωση του ομφαλίου λώρου

- Με τη μία βελόνα του ασκού συλλογής έγινε φλεβοκέντηση στην ομφαλική φλέβα
- Ο ασκός συλλογής τοποθετήθηκε χαμηλότερα από τη βελόνα ώστε να επιτραπεί η ροή του αίματος
- Ο ασκός αναδευόταν συνεχώς ώστε να αναμιγνύεται το αίμα με το αντιπηκτικό για την αποφυγή δημιουργίας θρόμβων
- Σε περίπτωση διακοπής της ροής του αίματος λόγω θρόμβων στην ομφαλική φλέβα, επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία σε σημείο του ομφαλίου λώρου πλησιέστερα στον πλακούντα, με τη βοήθεια της δεύτερης βελόνας του ασκού συλλογής
- Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας ασφαλιζονταν οι βελόνες, καταγράφονταν η ημερομηνία και η ώρα συλλογής στον ασκό και στη συνέχεια φυλασσόταν σε ψυγείο 4°C μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο.

2.3. Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την παρασκευή ορού

Για τη συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την παρασκευή ορού αρχικά αφαιρέθηκε από τον ασκό συλλογής, με τη βοήθεια σύριγγας 50ml το αντιπηκτικό. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην §2.2.

2.4. Συλλογή ομφαλίου λώρου

Η συλλογή ομφαλίου λώρου ακολουθούσε χρονικά τη συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Μετά την αφαίρεση του ομφαλίου λώρου και του πλακούντα από το μαιευτήρα, η νοσηλεύτρια της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος έκοβε με ένα αποστειρωμένο χειρουργικό ψαλίδι 10cm ομφαλίου λώρου και το τοποθετούσε με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας σε κωνικό σωλήνα 50ml, με βιδωτό πώμα τύπου Falcon. Η φύλαξη του ομφαλίου λώρου, μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο, γινόταν σε ψυγείο 4°C.

2.5. Μεταφορά βιολογικού υλικού στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος

Για τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, οι ασκοί με το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και τα Falcon με τα ιστοτεμάχια ομφαλίου λώρου, τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικές τσάντες της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, μαζί με μία παγοκύστη, ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία κατά τη μεταφορά στους 4°C.

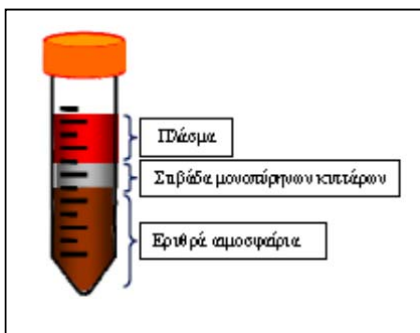
Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε από προσωπικό της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος.

3. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα

3.1. Υλικά

- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Falcon – 50ml [Becton Dickinson]
 - ο Σύριγγες 60ml [Becton Dickinson]
 - ο Ορολογικές πιπέτες 5, 10 και 20ml, μιας χρήσης [Sarstedt, Nümbrecht, Germany]
- Διαλύματα - Αντιδραστήρια
 - ο Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, (pH 7,2) – *Phosphate Buffered Saline (PBS) solution* [Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA]
 - ο Διάλυμα φικόλης πυκνότητας 1,077g/ml – *Ficoll-Paque Plus* [Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA]
 - ο RosetteSep® [StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada]

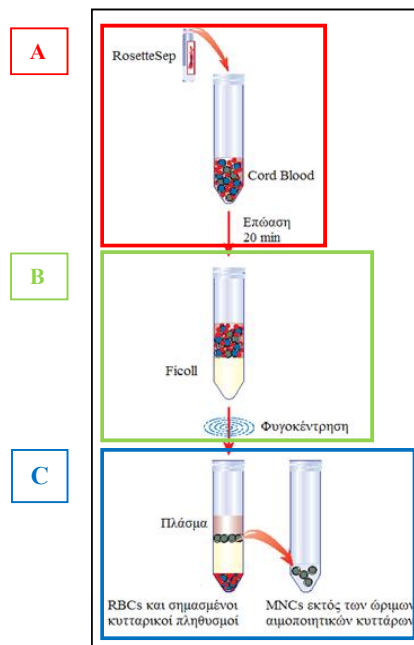
3.2. Απομόνωση χωρίς εμπλουτισμό



Εικόνα IV-1: Τρεις στιβάδες ήταν ορατές έπειτα από φυγοκέντρηση του ομφαλοπλακουντιακού αίματος σε διάλυμα φικόλης. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια βρίσκονταν στη κατώτερη στιβάδα ανακατεμένα με τη φικόλη, ενώ στην ανώτερη στιβάδα ήταν το πλάσμα. Η στιβάδα ενδιαφέροντος ήταν η μεσαία που περιείχε όλα τα μονοπύρηνια κύτταρα.

Για την απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα απομονώθηκε αρχικά και καλλιεργήθηκε ο συνολικός πληθυσμός μονοπύρηνων κυττάρων (*Mononucleated Cells, MNCs*). Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκε επιστίβαση του ομφαλοπλακουντιακού αίματος σε διάλυμα φικόλης και όλη η διαδικασία έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής προκειμένου να εξασφαλιστεί η στειρότητα του δείγματος. Αρχικά με μία σύριγγα 60ml αφαιρέθηκε από τον ασκό συλλογής το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και μοιράστηκε όλος

ο όγκος, ανά 17,5ml, σε κωνικούς σωλήνες Falcon 50ml. Στη συνέχεια το ομφαλοπλακουντιακό αίμα αραιώθηκε με ίσο όγκο (17,5ml) ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Παράλληλα ετοιμάστηκαν ισάριθμοι νέοι κωνικοί σωλήνες Falcon 50ml, στους οποίους τοποθετήθηκαν 15ml διαλύματος φικόλης. Με τη βοήθεια ορολογικής πιπέτας 20ml τοποθετήθηκαν 35ml αραιωμένου ομφαλοπλακουντιακού αίματος στην επιφάνεια της φικόλης, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην αναμιχθούν τα δύο υγρά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 400 x g για 25 λεπτά, χωρίς φρένα και με ήπια επιτάχυνση. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης και με τη βοήθεια ορολογικής πιπέτας 10ml αφαιρέθηκε η στιβάδα των εμπύρηνων κυττάρων (Εικόνα IV-1) και τοποθετήθηκαν σε νέο Falcon των 50ml (έως 25ml κυττάρων ανά κωνικό σωλήνα Falcon). Στη συνέχεια προστέθηκαν 25ml PBS και πραγματοποιήθηκε νέα φυγοκέντρηση στα 500 x g για 5 λεπτά στο τέλος της οποίας απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα με τα κύτταρα ανασυστάθηκε σε 2ml θρεπτικού υλικού.



Εικόνα IV-2: Τα στάδια απομόνωσης MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος με RosetteSep®:

A) Προσθήκη μίγματος RosetteSep® στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα
 B) Φυγοκέντρηση
 Γ) Λήψη της στιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων που έχουν εμπλουτιστεί με την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων πληθυσμών

3.3. Εμπλουτισμός με RosetteSep®

Ο εμπλουτισμός των MNCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος σε MSCs με RosetteSep® απαιτούσε ένα επιπλέον στάδιο σε σχέση με την προηγούμενη διαδικασία. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα μοιράστηκε ανά 17,5ml, σε κωνικούς σωλήνες Falcon 50ml όπου είχε ήδη προστεθεί 1ml RosetteSep®. Έπειτα από επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε η αραιώση με PBS και η υπόλοιπη προαναφερθείσα διαδικασία βήμα προς βήμα (Εικόνα IV-2).

4. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο

4.1. Υλικά

- Εργαλεία:
 - ο Χειρουργικά ψαλίδια και λαβίδες, αποστειρωμένα
- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Falcon – 50ml [Becton Dickinson]
 - ο Πλαστικές πλάκες καλλιέργειας 6 οπών - *6 well tissue culture plates* –[Costar , Corning Life Sciences Inc., Amsterdam, Netherlands]
 - ο Τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 150mm [Costar]
 - ο Ορολογικές πιπέτες 5, 10 και 20ml, μιας χρήσης [Sarstedt]
 - ο Σύστημα φιλτραρίσματος υγρών με φίλτρο νιτροκυτταρίνης (*nitocellulose*) με πόρους 40μm [Costar]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων του Earl, (pH 7,2) – *Earl's Balanced Salt Solution* (EBSS) [Gibco]
 - ο Medium 199 [Gibco]
 - ο Κολλαγενάση - *collagenase* [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland]
 - ο Υαλουρονιδάση - *hyaluronidase* [Sigma-Aldrich]
 - ο Διάλυμα θρυψίνης 0,05% και 0,02% 2,2',2'',2'''-(αιθυλο-1,2-διάμινο)-τετραοξικού οξέως - *trypsin - EDTA solution* [Sigma-Aldrich]
 - ο Θρεπτικό υλικό α-MEM με ριβονουκλεοσίδια, δεοξυριβονουκλεοσίδια, L-γλουταμίνη, γλυκόζη 1000mg/L και δείκτη ερυθρό της φαινόλης (pH 7,2) (*Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification, low glucose with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, L-glutamine and phenol red*) [Gibco]
 - ο Ορός εμβρύου βοός – *Foetal Bovine Serum* (FBS) [Gibco]
 - ο L-γλουταμίνη 200mM [Gibco]

- ο Διάλυμα 10.000U/ml πενικιλίνης και 10.000μg/ml στρεπτομυκίνης – *penicilin – streptomycin* [Gibco]

4.2. Παρασκευή διαλυμάτων

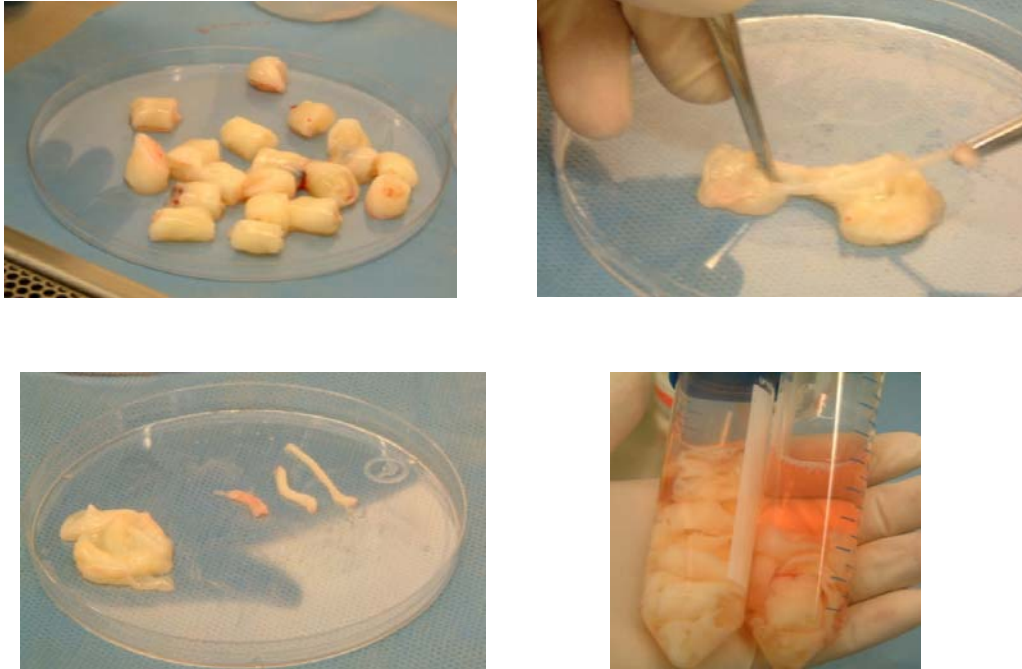
- Διάλυμα κολλαγενάσης – υαλουρονιδάσης 10x
 - ο Σε 100ml Medium 199 διαλύθηκαν 2gr κολλαγενάσης και 1gr υαλουρονιδάσης
 - ο Το διάλυμα φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια φίλτρου διήθησης υγρών για να στερηθεί
- Θρεπτικό υλικό ιστοκαλλιέργειας α-MEM με 15% FBS, 2mM L-γλουταμίνης και 100U/ml πενικιλίνης/ 100μg/ml (pH 7,2)
 - ο Σε 415ml α-MEM προστέθηκαν:
 - 75ml FBS
 - 5ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200mM
 - 5ml διαλύματος 10.000U/ml πενικιλίνης και 10.000μg/ml στρεπτομυκίνης

4.3. Προετοιμασία ομφαλίου λώρου για την απομόνωση κυττάρων

Οι ομφάλιοι λώροι, ανεξαρτήτως της μεθόδου με την οποία επρόκειτο να επεξεργαστούν, τοποθετήθηκαν, αρχικά, σε τρυβλία καλλιέργειας 150mm διαμέτρου (Εικόνα IV-3Α), όπου με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων, αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι δύο ομφαλικές αρτηρίες και η ομφαλική φλέβα (Εικόνα IV-3Β και 3C). Στη συνέχεια ο συνδετικός ιστός (πηκτή του Wharton) τοποθετήθηκε σε κλειστό Falcon 50ml με 25ml διαλύματος EBSS και ανακινήθηκε με δύναμη προκειμένου να πλυθεί από υπολείμματα αίματος ή θρόμβων (Εικόνα IV-3D). Η διαδικασία επαναλήφθηκε τοποθετώντας των ιστό σε νέο Falcon με 25ml EBSS. Μετά την πλύση ελήφθησαν καθαρά ιστοτεμάχια για την απομόνωση κυττάρων.

4.4. Μέθοδος απομόνωσης με ενζυματική πέψη

Τα ιστοτεμάχια της πηκτής του Wharton που ελήφθησαν από την προετοιμασία του ομφαλίου λώρου τοποθετήθηκαν σε Falcon 50ml που περιείχε 1ml διαλύματος κολλαγενάσης – υαλουρονιδάσης 10x και 9ml θρεπτικού υλικού Medium 199 όπου και παρέμειναν σε συνεχή ανάδευση επί 18 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 500 x g για 10 λεπτά και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Η ανασύσταση του ιζήματος έγινε σε 10ml διαλύματος θρυψίνης 0,05% και 0,02%

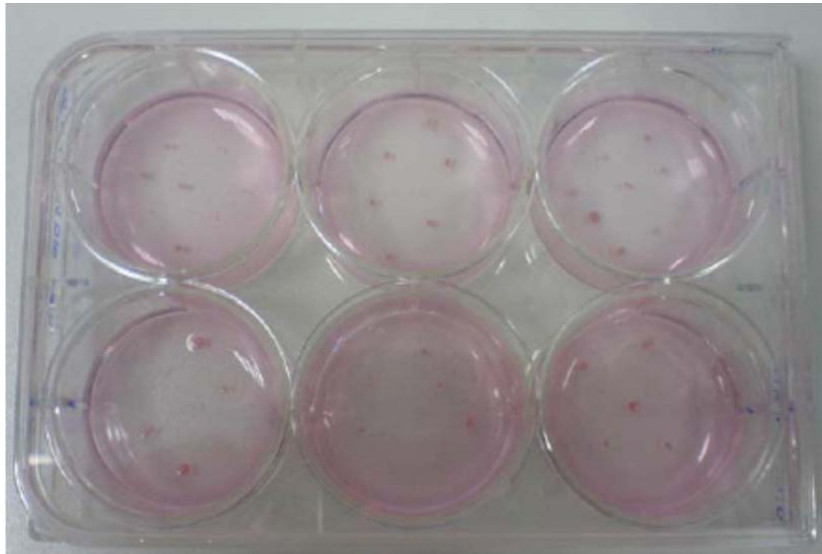


Εικόνα IV-3: Η προετοιμασία των ομφαλίων λώρων για την απομόνωση MSCs: Αρχικά ο ομφάλιος λώρος κοβόταν σε μικρότερα ιστοτεμάχια (Α) από τα οποία με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων (Β) αφαιρούταν τα αγγεία (C). Στη συνέχεια τα τεμάχια πηκτής του Wharton πλένονταν με EBSS προκειμένου να χρησιμοποιηθούν (D).

EDTA και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα. Τελικά τα κύτταρα ελήφθησαν έπειτα από φυγοκέντρηση στα 500 x g για 6 λεπτά.

4.5. Μέθοδος απομόνωσης με ιστοκαλλιέργειες

Τα ιστοτεμάχια της πηκτής του Wharton τοποθετήθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας 150mm διαμέτρου, όπου με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων, κόπηκαν σε μικρότερα τμήματα ιστού, μεγέθους 1-3mm³. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ανατομικής λαβίδας 12cm, τοποθετήθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 6 οπών και σε απόσταση το ένα ιστοτεμάχιο από το άλλο (Εικόνα IV-4). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας προστέθηκαν 2ml θρεπτικό υλικό ιστοκαλλιέργειας α-MEM με 15% FBS, 2mM L-γλουταμίνης και 100U/ml πενικιλίνης/ 100μg/ml σε κάθε θέση της πλάκας και οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C. Την 3^η ημέρα καλλιέργειας αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό και την 10^η αφαιρέθηκαν τα ιστοτεμάχια και το θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα που είχαν μεταναστεύσει στο πλαστικό υπόστρωμα της πλάκας αποκολλήθηκαν με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης – EDTA όπως περιγράφεται στην §6.4.



Εικόνα IV-4: Ιστοκαλλιέργειες πηκτής του Wharton ομφαλίου λόφου

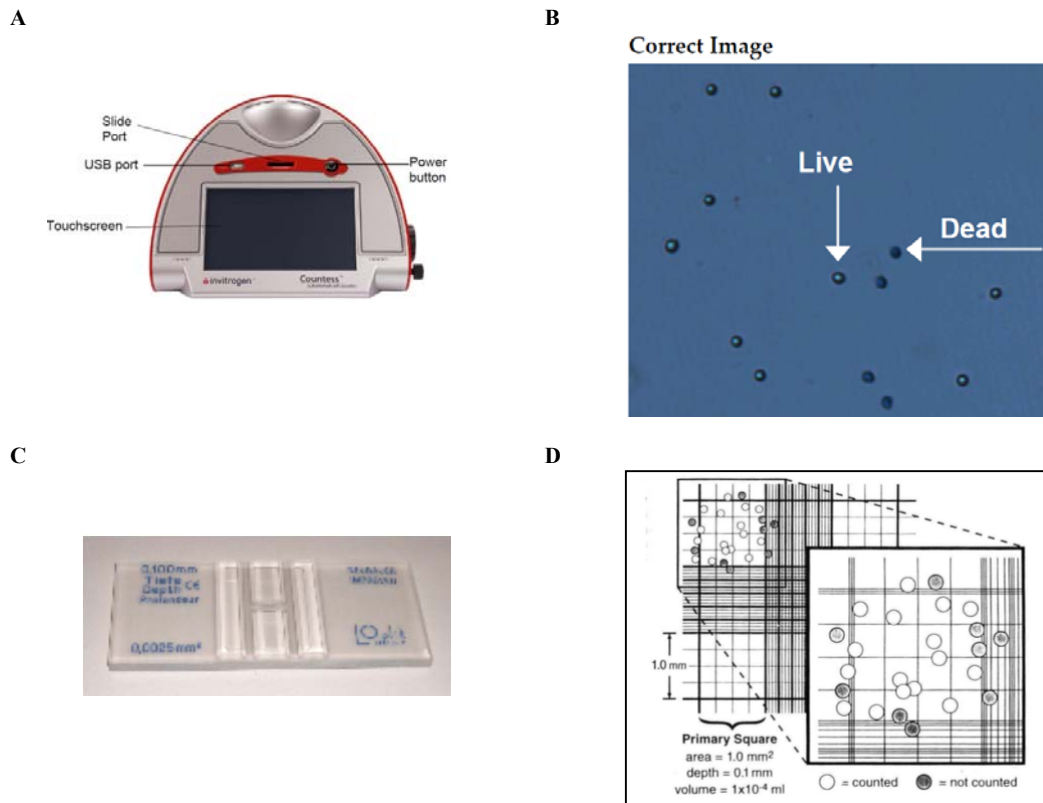
5. Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας

5.1. Υλικά

- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer – *Improved Neubauer chamber*
 - ο Πλάκες αυτόματης μέτρησης – *Countess® cell counting chamber slides* [Invitrogen]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο Διάλυμα χρωστικής *trypan blue* 0,4% [Molecular probes, Invitrogen]
 - ο PBS (pH 7,2) [Gibco]

5.2. Αυτόματη μέτρηση

Για να μετρηθούν κύτταρα με την αυτόματη συσκευή μέτρησης *Countess®* (Εικόνα IV-5A), αρχικά αραιώθηκαν 1:1 σε διάλυμα χρωστικής *trypan blue* 0,4%. Στη συνέχεια 10μl κεχρωσμένων κυττάρων τοποθετήθηκαν σε κάθε θέση της πλάκας μέτρησης *Countess®* και η πλάκα «διαβάστηκε» από τη συσκευή. Μετά από διόρθωση της εστίασης κατά τέτοιο τρόπο ώστε το περίγραμμα των κυττάρων να είναι ευδιάκριτο (Εικόνα IV-5B) πραγματοποιήθηκε η μέτρηση. Η συγκέντρωση των κυττάρων και η βιωσιμότητα υπολογίστηκαν αυτόματα από τη συσκευή.



Εικόνα IV-5: Η αυτόματη συσκευή μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων *Countess*® (A) και η εικόνα που προκύπτει στην οθόνη της (B), όπου διακρίνονται τα ζωντανά (Live) και τα νεκρά (Dead) κύτταρα. Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer (C) και σχηματική αναπαράσταση των περιοχών μέτρησης όπου προσμετρώνται τα κύτταρα (D)
(Οι εικόνες είναι από τα αντίστοιχα manuals των συσκευών)

5.3. Μέτρηση με οπτικό μικροσκόπιο

Η μέτρηση των κυττάρων με οπτικό μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου Neubauer (Εικόνα IV-5C). Ελήφθησαν 10μl εναιωρήματος κυττάρων σε 990μl PBS (αραίωση 1:100). Από αυτό το διάλυμα 10μl αραιώθηκαν 1:1 σε χρωστική *trypan blue* 0,4% και έπειτα τοποθετήθηκαν στο αιματοκυτταρόμετρο. Σε τέσσερις περιοχές (Εικόνα IV-5D) μετρήθηκαν τα ζωντανά (έντονη κυτταρική μεμβράνη, διαυγές κυτταρόπλασμα) και τα νεκρά (κύτταρα με χρωματισμένο κυτταρόπλασμα) κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο έπρεπε να μετρηθούν τουλάχιστον 200 κύτταρα, σε αντίθετη περίπτωση επαναλαμβανόταν η μέτρηση έπειτα από προσαρμογή της αραιώσης. Τελικά ο υπολογισμός της συγκέντρωσης στο εναιώρημα έγινε με τον ακόλουθο τύπο: $C = M \times A \times 10^4$ όπου C η συγκέντρωση ανά ml, M ο μέσος όρος των κυττάρων που μετρήθηκαν στις 4 περιοχές, A ο συντελεστής αραιώσης (π.χ. 100 η αρχική αραιώση στο PBS x 2 η αραιώση στο *trypan blue* =200).

6. Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων ομφαλοπλακουντιακού αίματος και ομφαλίου λώρου

6.1. Υλικά

- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Falcon 50ml [Becton Dickinson]
 - ο Falcon 15ml [Becton Dickinson]
 - ο Αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας, επιφανείας 75cm² με κεκαμένο λαιμό και αεριζόμενο πώμα [Costar]
 - ο Ορολογικές πιπέτες 5, 10 και 20ml, μιας χρήσης [Sarstedt]
 - ο Σύριγγες 60ml [Becton Dickinson]
 - ο Σύστημα φιλτραρίσματος υγρών με φίλτρο νιτροκυτταρίνης (*nitocellulose*) με πόρους 40μm [Costar]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο PBS (pH 7,2) [Gibco]
 - ο Διάλυμα θρυψίνης 0,05% και 0,02% *EDTA* [Sigma-Aldrich]
 - ο Θρεπτικό υλικό α-MEM [Gibco]
 - ο Θρεπτικό υλικό *Mesencult MSC Basal Medium (Human)* [StemCell Technologies]
 - ο Πρόσθετα καλλιεργητικού υλικού (*Mesenchymal Stem Cells Stimulatory Supplements (Human)*) [StemCell Technologies]
 - ο FBS [Gibco]
 - ο L-γλουταμίνη 200mM [Gibco]
 - ο Διάλυμα πενικιλίνης - στρεπτομυκίνης [Gibco]

6.2. Παρασκευή διαλυμάτων

- Ορός ομφαλοπλακουντιακού αίματος – *Cord Blood Serum (CBS)*
 - ο Για την παρασκευή ορού χρησιμοποιήθηκαν μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος που είχαν συλλεχθεί σε ασκούς συλλογής χωρίς αντιπηκτικό.
 - ο Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα μεταφέρθηκε σε Falcon 50ml και φυγοκεντρήθηκε στα 500 x g για 10 λεπτά

- ο Ο ορός (υπερκείμενο) συγκεντρώθηκε με τη βοήθεια ορολογικής πιπέτας σε σύστημα φιλτραρίσματος υγρών όπου και διηθήθηκε προκειμένου να αποστειρωθεί
 - ο Το συμπλήρωμα αδρανοποιήθηκε με θέρμανση του ορού σε υδατόλουτρο στους 57°C για μία ώρα
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 10% FBS, 2mM L-γλουταμίνης και 100U/ml πενικιλίνης/ 100μg/ml (pH 7,2)
 - ο Σε 440ml α-MEM προστέθηκαν:
 - 50ml FBS
 - 5ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200mM
 - 5ml διαλύματος 10.000U/ml πενικιλίνης και 10.000μg/ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 15% FBS, 2mM L-γλουταμίνης και 100U/ml πενικιλίνης/ 100μg/ml (pH 7,2)
 - ο Σε 415ml α-MEM προστέθηκαν:
 - 75ml FBS
 - 5ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200mM
 - 5ml διαλύματος 10.000U/ml πενικιλίνης και 10.000μg/ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 20% FBS, 2mM L-γλουταμίνης και 100U/ml πενικιλίνης/ 100μg/ml (pH 7,2)
 - ο Σε 400ml α-MEM προστέθηκαν:
 - 100ml FBS
 - 5ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200mM
 - 5ml διαλύματος 10.000U/ml πενικιλίνης και 10.000μg/ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 20% CBS, 2mM L-γλουταμίνης και 100U/ml πενικιλίνης/ 100μg/ml (pH 7,2)
 - ο Σε 415ml α-MEM προστέθηκαν:
 - 75ml FBS
 - 5ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200mM

- 5ml διαλύματος 10.000U/ml πενικιλίνης και 10.000μg/ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας Mesencult Complete Medium (MCM) με 2mM L-γλουταμίνης και 100U/ml πενικιλίνης/ 100μg/ml (pH 7,2)
 - ο Στα 440ml Mesencult MSC Basal Medium προστέθηκαν:
 - 50ml *Mesenchymal Stem Cells Stimulatory Supplements*
 - 5ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200mM
 - 5ml διαλύματος 10.000U/ml πενικιλίνης και 10.000μg/ml στρεπτομυκίνης

6.3. Κυτταροκαλλιέργεια

Περίπου 7.500.000 MNCs ομφαλοπλακουντιακού αίματος ή 750.000 MSCs ομφαλίου λώρου τοποθετήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας επιφάνειας 75cm² (1x10⁵ και 1x10⁴ κύτταρα/cm² αντίστοιχα) που περιείχαν 30ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας (ανάλογα με το πείραμα το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν MCM, α-MEM με 10%,15%, 20% FBS ή α-MEM με 20% CBS). Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε κορεσμένο από υδρατμούς περιβάλλον, μέσα σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C με ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5% σε CO₂. Εικοσιτέσσερις ώρες έπειτα από την έναρξη της καλλιέργειας, αφαιρέθηκε πλήρως το θρεπτικό υλικό και οι φλάσκες πλύθηκαν με 15ml PBS δύο φορές, προκειμένου να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν, και προστέθηκαν 30ml φρέσκου θρεπτικού υλικού. Οι καλλιέργειες παρέμειναν στον επωαστικό κλίβανο μέχρις ότου η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας ξεπέρασε το 80%. Στο διάστημα αυτό ελέγχονταν δύο φορές την εβδομάδα ενώ σε εβδομαδιαία βάση αφαιρούνταν 15ml θρεπτικού υλικού το οποίο αναπληρωνόταν με 17ml φρέσκου θρεπτικού υλικού (προκειμένου να αντισταθμιστεί η εξάτμισή του).

6.4. Αποκόλληση κυττάρων και ανακαλλιέργεια

Όταν η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας έφτασε το 80% τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης 0,05% και 0,02% EDTA. Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και η επιφάνεια του δοχείου της καλλιέργειας (πλάκα 6 οπών ή φλάσκα καλλιέργειας) ξεπλύθηκε με 20ml διαλύματος PBS δύο φορές προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως πιθανά υπολείμματα θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια προστέθηκε 1ml θρυψίνης/EDTA σε κάθε οπή της πλάκας (ή 10ml ανά φλάσκα 75cm²) και οι καλλιέργειες επωάστηκαν με το ένζυμο σε κλίβανο στους 37°C.

Περίπου 10 έως 15 λεπτά μετά την έναρξη της πέψης ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί η αποκόλληση των κυττάρων με μικροσκοπικό έλεγχο ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ελαφριά ανακίνηση ή χτύπημα του δοχείου ήταν απαραίτητα. Με την ολοκλήρωση της αποκόλλησης των κυττάρων η θρυψίνη αδρανοποιήθηκε με προσθήκη 200μl FBS (ή 2ml για τις φλάσκες 75cm²). Τα αποκολλημένα κύτταρα συλλέχθηκαν με ορολογική πιπέτα και τοποθετήθηκαν σε κωνικό σωλήνα Falcon των 15 ή 50ml με ίση ποσότητα PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 500 x g για 5min. Τελικά το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα ανασυστάθηκαν στην απαραίτητη ποσότητα θρεπτικού υλικού (ή PBS) ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζονταν.

6.5. Υπολογισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Ως μέτρο σύγκρισης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καλλιιεργημένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος διπλασιασμού των πληθυσμών (*Population Doubling Time – PDT*). Για τον υπολογισμό του χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$PDT = \frac{\log_{10}(N/N_0)}{\log_{10}(2)} \times t$$

όπου:

- N : ο αριθμός των κυττάρων στο τέλος της καλλιέργειας
- N_0 : ο αριθμός των κυττάρων που καλλιιεργήθηκαν
- t : Η συνολική διάρκεια της καλλιέργειας σε ώρες

7. Κατάψυξη ιστοτεμαχίων ομφαλίου λώρου και Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου

Προκειμένου να αποφευχθεί η οξειδωτική δράση του DMSO στα κύτταρα όλες οι προπαρασκευαστικές διαδικασίες της κρυοκατάψυξης έγιναν πάνω σε πάγο, ενώ το μέσο κρυσυντήρησης αλλά και τα *MrFrosty*[®] είχαν προ-ψυχθεί στους 4°C πριν τη χρήση τους.

7.1. Υλικά

- Δοχεία βαθμιαίας κατάψυξης *MrFrosty*[®] [Nalgene]
- Εργαλεία:
 - ο Χειρουργικά ψαλίδια και λαβίδες, αποστειρωμένα

- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Falcon – 50ml [Becton Dickinson]
 - ο Τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 150mm [Costar]
 - ο Ορολογικές πιπέτες 5, 10 και 20ml, μιας χρήσης [Sarstedt]
 - ο Φίλτρα διήθησης, προσαρμοζόμενα σε σύρριγγες, με μεμβράνη nylon, για χημικούς διαλύτες και πόρους 20μm [Nalgene]
 - ο Σύριγγα 10ml [Becton Dickinson]
 - ο Κρυοσωληνάρια χωρητικότητας 1,8ml με βιδωτό πώμα [Sarstedt]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο PBS (pH 7,2) [Gibco]
 - ο Θρεπτικό υλικό α-MEM [Gibco]
 - ο FBS [Gibco]
 - ο Κρυοπροστατευτικό διμεθυλοσουλφοξείδιο καθαρότητας $\geq 99,9\%$ (*dimethylsulfoxide*, *DMSO*) [Sigma-Aldrich]
 - ο Διάλυμα πενικιλίνης - στρεπτομυκίνης [Gibco]

7.2. Παρασκευή διαλυμάτων

- Θρεπτικό υλικό κρυοκατάψυξης
 - ο Σε 70ml α-MEM προστέθηκαν:
 - 20ml FBS
 - 10ml DMSO τα οποία είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί με διήθηση, με τη βοήθεια σύρριγγας 10ml στο άκρο της οποίας είχε προσαρμοστεί ένα φίλτρο αποστείρωσης για διαλύτες

7.3. Κατάψυξη ιστοτεμαχίων

Ιστοτεμάχια πηκτής του Wharton, που ελήφθησαν όπως περιγράφηκε στην §4.3, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας 150mm διαμέτρου, όπου με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων, κόπηκαν σε μικρότερα τμήματα ιστού, μεγέθους 1-3mm³. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε κρυοσωληνάρια χωρητικότητας 1,8ml κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει επαρκής χώρος για την προσθήκη 1,5ml μέσου



Εικόνα IV-6: Δοχείο βαθμιαίας κατάψυξης Mr Frosty. Διακρίνονται 3 κρυοσωληνάρια στις ειδικές θέσεις

κρυοσυντήρησης η οποία και ακολούθησε. Έπειτα τα κρυοσωληνάρια αναδεύτηκαν με τη βοήθεια *vortex* ώστε το περιεχόμενό τους να ομογενοποιηθεί και τοποθετήθηκαν μέσα στα *MrFrosty*[®] (Εικόνα IV-6) και στους -80°C. Τα δοχεία αυτά περιείχαν ισοπροπανόλη ώστε να επιτυγχάνεται η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας του περιεχομένου τους κατά 1°C/min. Μετά από χρονικό διάστημα 1 ώρας τα κρυοσωληνάρια απομακρύνθηκαν από τα *MrFrosty*[®] και μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο για τη συντήρησή του στους -196°C.

7.4. Κατάψυξη κυττάρων

Κύτταρα προς κρυοκατάψυξη ελήφθησαν είτε αμέσως μετά την απομόνωσή τους με ενζυματική πέψη, είτε έπειτα από καλλιέργεια και αφού αποκολλήθηκαν με χρήση διαλύμματος θρυψίνης 0,05% και 0,02% EDTA. Αρχικά τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κωνικούς σωλήνες Falcon χωρητικότητας 50ml όπου πλύθηκαν με προσθήκη 25ml PBS και φυγοκέντρωση στα 500 x *g* για 5min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου τα κύτταρα ανασυστάθηκαν σε 1,8ml μέσου κρυοσυντήρησης, μετρήθηκαν και η συγκέντρωσή τους ρυθμίστηκε μεταξύ $1,0 \times 10^6$ και $2,0 \times 10^6$ κυττάρων ανά ml, με προσθήκη επιπλέον μέσου κρυοσυντήρησης όπου ήταν αναγκαίο. Στη συνέχεια το εναιώρημα των κυττάρων μοιράστηκε σε κρυοσωληνάρια 1,8ml τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε *MrFrosty*[®] και στους -80°C. Έπειτα από μία ώρα παραμονής στους -80°C τα κρυοσωληνάρια μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο για διατήρηση των κυττάρων στους -196°C.

8. Απόψυξη ιστοτεμαχίων ομφαλίου λώρου και Μεσεγχυματικών Βλαστικών

Κυττάρων του ομφαλίου λώρου

8.1. Υλικά

- Εργαλεία:
 - ο Χειρουργικές λαβίδες, αποστειρωμένες
- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Falcon – 50ml [Becton Dickinson]
 - ο Falcon – 15ml [Becton Dickinson]

- ο Μεταλλικά πλέγματα διήθησης με πόρους 100μm [Becton Dickinson]
 - ο Ορολογικές πιπέτες 5, 10 και 20ml, μιας χρήσης [Sarstedt]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο Θρεπτικό υλικό α-MEM [Gibco]
 - ο PBS (pH 7,2) [Gibco]

8.2. Απόψυξη και πλύση ιστοτεμαχίων

Τα κρυοσωληνάρια που περιείχαν τα ιστοτεμάχια πηκτής του Wharton απομακρύνθηκαν από το υγρό άζωτο και αποψύχθηκαν σε υδατόλουτρο 36°C. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το περιεχόμενό τους σε διηθητικό μεταλλικό φίλτρο, που ήταν προσαρμοσμένο σε κωνικό σωλήνα Falcon των 50ml, όπου τα ιστοτεμάχια πλύθηκαν με PBS (το PBS περνούσε μέσω των πόρων του φίλτρου στο Falcon, απομακρύνοντας το μέσο κρυοσυντήρησης ενώ τα ιστοτεμάχια διατηρήθηκαν πάνω στο φίλτρο). Με το πέρας της διαδικασίας ελήφθησαν τα αποψυγμένα ιστοτεμάχια από το φίλτρο.

8.3. Απόψυξη και πλύση των κυττάρων

Τα κρυοσωληνάρια με κρυοσυντηρημένα MSCs αποψύχθηκαν γρήγορα σε υδατόλουτρο 36°C. Στη συνέχεια το περιεχόμενό τους μεταφέρθηκε σε κωνικούς σωλήνες Falcon 50ml (μέχρι 10 κρυοσωληνάρια ανά Falcon) και προστέθηκαν 30ml PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5min στα 500 x g με απομάκρυνση του υπερκείμενου και επανάληψη της διαδικασίας με 40ml νέου PBS. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση τα κύτταρα ανασυστάθηκαν σε 1ml θρεπτικού υλικού α-MEM (χωρίς πρόσθετα) και μετρήθηκαν προκειμένου να αραιωθούν στην κατάλληλη, για τη μετέπειτα χρήση τους, συγκέντρωση.

Πίνακας IV-1: Συγκεντρωτική αναλυτική περιγραφή των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα. Αναφέρονται μεταξύ άλλων ο κλώνος από τον οποίο προήλθαν και ο επίτοπος στον οποίο προσδένονται. Στην τελευταία στήλη σε παρένθεση εμφανίζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί στους οποίους εντοπίζονται συνήθως (αλλά όχι αποκλειστικά) αυτοί οι επίτοποι.

<i>Μono-κλωνικά αντισώματα</i>	<i>Συζευγμένη χρωστική</i>	<i>Κλώνος</i>	<i>Κατασκευαστής</i>	<i>Επίτοπος στόχος (κυτταρική κατανομή)</i>
CD45	PC-5	J.33	Beckman Coulter	Κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (αιμοποιητική σειρά)
CD64	FITC	22	Beckman Coulter	Υποδοχέας FcγRI (μονοκύτταρα, μακροφάγα)
CD1a	FITC	BL6	Beckman Coulter	Ένα αντιγονοπαρουσιαστικό μόριο που συνδέεται με τη β2-μικροσφαιρίνη (δενδριτικά, Langerhans κ.α.)
CD3	PE	UCHT1	Beckman Coulter	TCR υποδοχέας (T-λεμφοκύτταρα)
CD34	FITC	581	Beckman Coulter	Συνδέτης της L-σελεκτίνης (Βλαστ. αιμοποιητικά, ενδοθηλιακά)
CD133	PE	AC133	Miltenyi Biotech	Επίτοπος AC133 (Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα)
HLA cl I	FITC	B9.12.1	Beckman Coulter	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I (όλα τα κύτταρα)
HLA-DR	PC-5	Immu-357	Beckman Coulter	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II (αντιγονοπαρουσιαστικά)
CD31	FITC	5.6E	Beckman Coulter	PECAM-1 υποδοχέας λευκοκυτταρικής - ενδοθηλιακής πρόσδεσης (ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά)
CD117 (c-kit)	PE	104D2D1	Beckman Coulter	Υποδοχέας Stem Cell Factor (Βλαστικά αιμοποιητικά)
CD58	FITC	AICD58	Beckman Coulter	LFA-3 λευκοκυτταρικός υποδοχέας (διάφορα κύτταρα)
CD51	FITC	RMV-7	BD Pharmigen	Ιντεγκρίνη-α (αιμοπετάλια και μεγακαρυοκύτταρα)
CD105	FITC	1G2	Beckman Coulter	Ενδογλίνη, συνδέτης του TGF-β (Πληθυσμοί του μυελού των οστών)
CD73	PE	AD2	BD Pharmigen	έξω-5'-νουκλεοτιδάση (B και T-λεμφ., MSCs)
CD90 (Thy-1)	PE	Thy1/310	Beckman Coulter	Thy-1 (Αιμοποιητικά βλαστικά, θυμοκύτταρα, MSCs)
CD44	FITC	J.173	Beckman Coulter	Υποδοχέας υαλουρονικού οξέος (αιμοποιητικά κύτταρα, MSCs, κ.α.)
CD29	FITC	K20	Beckman Coulter	Ιντεγκρίνη β1, μόριο πρόσδεσης (Λεμφοκύτταρα, MSCs, κ.α.)
CD62L	PE	DREG56	Beckman Coulter	L-σελεκτίνη, μόριο πρόσδεσης (B και T-λεμφ., NK, μονοκύτταρα)

9. Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

9.1. Υλικά

- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Αιμολυτικά σωληνάρια Falcon χωρητικότητας 5ml [Becton Dickinson]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο PBS (pH 7,2) [Gibco]
 - ο Μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα (Πίνακας IV-1)

9.2. Σήμανση των κυττάρων

Για να σημανθούν τα MSCs που επρόκειτο να μετρηθούν με κυτταρομετρία ροής, με μονοκλωνικά αντισώματα, τοποθετήθηκαν από 1×10^5 κύτταρα σε αιμολυτικά σωληνάρια των 5ml. Στη συνέχεια σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 10μl από ένα, ή δύο διαλύματα μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένων με τα φθοριοχρώματα ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (*Fluoresceine isothiocyanate* - FITC) ή FITC και φυκοερυθρίνη (*Phycoerythrine* – PE) αντίστοιχα (Τα μονοκλωνικά αντισώματα που επιλέχθηκαν, οι συζευγμένες χρωστικές καθώς και ο αντιγονικός επίτοπος που στόχευαν περιγράφονται στον Πίνακα IV-1). Σε ορισμένες περιπτώσεις αντί της PE χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά με φυκοερυθρίνη/κυανίνη (*Phycoerythrine Cyanine 5* – PC-5). Ακολούθησε επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου, μετά το πέρας της οποίας, προστέθηκαν 2ml PBS και φυγοκεντρήθηκαν στα 500 x g για 5min ώστε να απομακρυνθούν τα ασύνδετα μονοκλωνικά αντισώματα με το υπερκείμενο. Στη συνέχεια τα σεσημασμένα κύτταρα ανασυστάθηκαν σε 500μl PBS και αφού ανακινήθηκαν σε *vortex* τοποθετήθηκαν στο κυτταρόμετρο για τη λήψη των αποτελεσμάτων.

9.3. Λήψη και ανάλυση αποτελεσμάτων

Μετά τη σήμανση τα αιμολυτικά σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε κυτταρόμετρο Beckman Coulter EPICS-XL MCL. Από κάθε δείγμα μετρήθηκαν κατ' ελάχιστο 50.000 κύτταρα για τα οποία αποθηκεύτηκαν όλες οι παράμετροι συμπεριλαμβανομένων του πρόσθιου σκεδασμού (*forward scatter*), πλάγιου

σκεδασμού (*side scatter*) και φθορισμού. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό XL2.

10. Επαγόμενη διαφοροποίηση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

10.1. Υλικά

- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Αντικειμενοφόροι πλάκες με θάλαμο καλλιέργειας (*chambered slides*) [Nalgene]
 - ο Falcon - 15ml [Becton Dickinson]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο *Mesencult MSC Basal Medium* [StemCell Technologies]
 - ο Πρόσθετα οστεογένεσης (*Osteogenic Stimulatory Supplements (Human)*) [StemCell Technologies]
 - ο Δεξαμεθαζόνη (*dexamethasone*) [StemCell Technologies]
 - ο Ασκορβικό οξύ (*ascorbic acid*) [StemCell Technologies]
 - ο β-γλυκεροφωσφορικό οξύ (*β-glycerophosphate*) [StemCell Technologies]
 - ο Πρόσθετα λιπογένεσης (*Adipogenic Stimulatory Supplements (Human)*) [StemCell Technologies]
 - ο Τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM*) με 4,5g/L γλυκόζη και 0,11g/L πυροφωσφορικό νάτριο της Gibco)
 - ο διάλυμα 0,625mg/ml ινσουλίνης, 0,625mg/ml τρανσφερίνης, 0,625μg/ml σεληνιώδους οξέος, 2,5g/ml αλβουμίνης ορού βοός και 0,535mg/ml λινολεϊκού οξέος, με την εμπορική ονομασία *ITS+* [Sigma – Aldrich]
 - ο Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β1 (*Transforming Growth Factor, TGF-β1*) [Invitrogen]
 - ο Αλβουμίνη ορού βοός (*Bovine serum albumin, BSA*) [Invitrogen]
 - ο Αιθανόλη 100% [Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland]

10.2. Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Διάλυμα *stock* δεξαμεθαζόνης (10^{-4} M):
 - ο 1mg δεξαμεθαζόνης διαλύθηκε σε μικρή ποσότητα απόλυτης αιθανόλης
 - ο Προστέθηκε απόλυτη αιθανόλη μέχρι συμπλήρωσης όγκου των 25,5ml
- Διάλυμα *stock* ασκορβικού οξέος (10mg/ml):
 - ο Σε 10ml *Mesencult MSC Basal Medium* διαλύθηκαν:
 - 100mg ασκορβικού οξέος
- Διάλυμα *stock* TGF- β 1 (50 μ g/ml)
 - ο Σε 9,9ml dH₂O προστέθηκαν
 - 100 μ g BSA
 - 100 μ g TGF- β 1

10.3. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών διαφοροποίησης

- Θρεπτικό υλικό οστεογένεσης:
 - ο Σε 42,5ml *Mesencult MSC Basal Medium* προστέθηκαν:
 - 7,5ml *Osteogenic Stimulatory Supplements*
 - 5 μ l *stock* διαλύματος δεξαμεθαζόνης (τελική συγκέντρωση 0,01 μ M)
 - 250 μ l *stock* διαλύματος ασκορβικού οξέος (τελική συγκέντρωση 50 μ g/ml)
 - 175 μ l β-γλυκεροφωσφορικού οξέος (μόνο όταν παρατηρούνταν σχηματισμός δεύτερης στιβάδας κυττάρων)
- Θρεπτικό υλικό λιπογένεσης:
 - ο Σε 45ml *Mesencult MSC Basal Medium* προστέθηκαν:
 - 5ml *Adipogenic Stimulatory Supplements*
- Θρεπτικό υλικό χονδρογένεσης:
 - ο Σε 9,835ml DMEM προστέθηκαν:

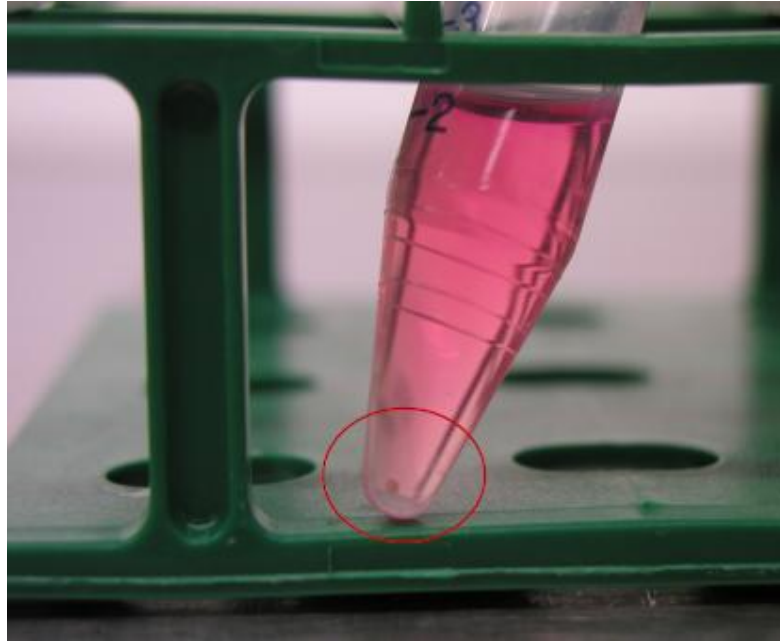
- 10μl *stock* διαλύματος δεξαμεθαζόνης (τελική συγκέντρωση 0,1μM)
- 35μl *stock* διαλύματος ασκορβικού οξέος (τελική συγκέντρωση 3,5μg/ml)
- 20μl *stock* διαλύματος TGF-β1 (τελική συγκέντρωση 10ng/ml)
- 100μl *ITS+*

10.4. Οστεογενής και λιπογενής διαφοροποίηση

Για την οστεογενή και λιπογενή διαφοροποίηση, εναιώρημα 1×10^5 MSCs σε 2,5ml θρεπτικού υλικού α-MEM με 15% FBS (βλ. § 6.2) τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες με θάλαμο καλλιέργειας και επιφάνεια 10cm^2 . Έπειτα από 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO_2 , το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε πλήρως. Τα κύτταρα παρέμειναν στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας έως ότου η κάλυψη της επιφάνειας της πλάκας να φτάσει το 60-70%. Τότε αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και αντικαταστάθηκε με 3ml καλλιεργητικού μέσου οστεογένεσης ή λιπογένεσης, ανάλογα με την περίπτωση. Η επαγωγή της διαφοροποίησης διήρκεσε για 21 συνεχόμενες ημέρες. Σε αυτό το διάστημα οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο και κάθε τρεις ημέρες ανανεωνόταν το καλλιεργητικό μέσο και ελεγχόταν η πορεία τους.

10.5. Χονδρογενής διαφοροποίηση

Η διαφοροποίηση των MSCs σε χονδροκύτταρα έγινε με τη μέθοδο της κυτταρικής μικρομάζας. Περίπου 1×10^6 MSCs τοποθετήθηκαν σε κωνικό σωλήνα Falcon 15ml και φυγοκεντρήθηκαν στα $500 \times g$ για 15min ώστε να σχηματιστεί ένα σχεδόν συμπαγές ίζημα. Με μεγάλη προσοχή, ώστε να μη διαταραχθεί το ίζημα, το υπερκείμενο αντικαταστάθηκε με 3ml καλλιεργητικού μέσου χονδρογένεσης (Εικόνα IV-7). Το Falcon σκεπάστηκε με το πώμα του, χωρίς όμως αυτό να βιδωθεί, προκειμένου να επιτρέπεται η ανταλλαγή αερίων. Τοποθετήθηκε δε σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα περιεκτικότητας CO_2 5%. Η καλλιέργεια διατηρήθηκε σε αυτές τις συνθήκες για 21 ημέρες με παρακολούθηση και αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού δύο φορές την εβδομάδα. Την 21^η ημέρα, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και η κυτταρική μικρομάζα μονιμοποιήθηκε προκειμένου να εγκλειστεί σε παραφίνη και να μελετηθεί.



Εικόνα IV-7: Μικρομάζα MSCs κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους σε θρεπτικό υλικό επαγωγής της χονδρογένεσης

11. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

11.1. Υλικά

- Κιτ απομόνωσης RNA, *RNeasy Mini kit*[®] [Qiagen GmbH, Hilden, D] το οποίο περιείχε:
 - ο Στήλες φυγοκέντρησης “*RNeasy Mini Spin Columns*”
 - ο Ανοιχτά σωληνάρια συλλογής υγρών χωρητικότητας 2ml (*Collection tubes*)
 - ο Ανοιχτά σωληνάρια συλλογής υγρών χωρητικότητας 1,5ml
 - ο *Buffer RLT*
 - ο *Buffer RW1*
 - ο *Buffer RPE* (συμπυκνωμένο)
 - ο dH₂O χωρίς RNase/DNase (*RNase-Free Water*)
- Κιτ αντίστροφης μεταγραφής (*reverse transcription – RT*), “*Omniscript*[®] *Reverse Transcription kit*” [Qiagen] που αποτελείτο από:
 - ο Αντίστροφη μεταγραφάση (*Omniscript*[®] *Reverse Transcriptase*)

- ο *Buffer RT*
 - ο Μίγμα τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (*dNTPs*) συγκέντρωσης 5 mM (για το καθένα)
 - ο dH₂O χωρίς RNase/DNase
- Κιτ αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) “*HotstartTaq Master Mix Kit*” [Qiagen] που περιείχε:
 - ο Προπαρασκευασμένο μείγμα DNA πολυμεράσης, ρυθμιστικού διαλύματος PCR με MgCl₂ και dNTPs: *HotStarTaq Master Mix*
 - ο dH₂O χωρίς RNase/DNase
- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Σωληνάκια τύπου Eppendorf των 200μl
 - ο PCR strips των 100μl
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο Τυχαίοι εκκινητές για την αντίστροφη μεταγραφή RNA “*Random primers*” [Invitrogen]
 - ο Ένζυμο DNase I με ρυθμιστικό διάλυμα *Buffer RDD*, “*RNase-Free DNase Set*” [Qiagen]
 - ο Αιθανόλη 70%
 - ο Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 0,5x [Qiagen]
 - ο Αγαρόζη [Cambrex Bio Sciences, Copenhagen, DK]
 - ο Βρωμιούχο αιθίδιο (*ethidium bromide*) [Invitrogen]
 - ο Κλίμακα νουκλεοτιδίων, “*Gelpilot 100bp Plus*” [Invitrogen]

11.2. Προετοιμασία διαλυμάτων

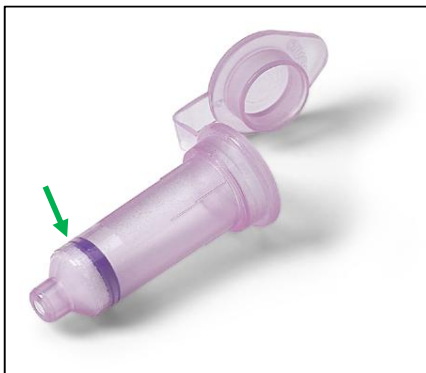
- Buffer RPE
 - ο Στο συμπυκνωμένο *Buffer RPE* προστέθηκαν 4 όγκοι αιθανόλης 70%
- Διάλυμα *stock* DNase

- ο 1500U DNase διαλύθηκαν σε 550 μ l dH₂O χωρίς RNase/DNase (το οποίο προστέθηκε με σύριγγα στο φιαλίδιο του ενζύμου)
- ο Το διάλυμα αναμείχθηκε με πολύ ελαφριά ανάδευση
- ο Τελικά μοιράστηκαν κλάσματα (*aliquots*) των 10 μ l σε PCR strips των 100 μ l, σκεπάστηκαν και φυλάχθηκαν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.

11.3. Προετοιμασία πηκτωμάτων αγαρόζης

Η παρασκευή πηκτωμάτων αγαρόζης 2% έγινε με διάλυση 2gr του σακχάρου σε 105ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 0,5x (οι απώλειες διαλύτη λόγω εξάτμισης είχαν υπολογιστεί στα 5ml γι αυτό κι η αρχική ποσότητα ήταν 105ml και όχι 100ml). Προκειμένου να λιώσει η αγαρόζη το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού κι εν συνεχεία αναδεύτηκε για αρκετό χρονικό διάστημα ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων αγαρόζης και το υγρό να είναι απολύτως διαυγές. Αφού αφέθηκε να κρυώσει και ενόσω ήταν ακόμα χλιαρό, προστέθηκαν δύο σταγόνες βρωμιούχου αιθιδίου και αφού αναδεύτηκε το διάλυμα μεταφέρθηκε σε βάση πηκτώματος με τα κατάλληλα «χτενάκια», όπου αφέθηκε να πήξει.

11.4. Εξαγωγή ολικού κυτταρικού RNA



Εικόνα IV-8: Στήλη φυγοκέντρησης RNeasy spin column. Διακρίνεται το φίλτρο (βέλος) όπου συγκεντρώνεται το RNA

Για την απομόνωση του κυτταρικού RNA των MSCs χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit *RNeasy Mini*. Η αρχή της μεθόδου με το συγκεκριμένο προϊόν βασίζεται σε ειδικές στήλες φυγοκέντρησης με φίλτρο στο οποίο συγκρατείται το RNA λυμένων κυττάρων (Εικόνα IV-8). Σταδιακά το RNA αυτό καθαρίζεται από ανεπιθύμητα κυτταρικά συστατικά (μεμβράνες, πρωτεΐνες, DNA κτλ) με τη βοήθεια διαλυμάτων τα οποία εκκρέουν διαπερνώντας το φίλτρο κατά τη διάρκεια φυγοκέντρησης σε υψηλές στροφές. Παράλληλα πιθανά υπολείμματα DNA απομακρύνονται με ενζυματική πέψη. Τελικά το RNA εκλύεται σε H₂O χωρίς RNase/DNase. Η εκτέλεση της διαδικασίας απομόνωσης ήταν η εξής:

- Ελήφθησαν έως 5×10^6 κύτταρα με φυγοκέντρηση στα $500 \times g$ για 5min.
- Προστέθηκαν 350μl διαλύματος RTL και με τη βοήθεια σύριγγας με βελόνα 24G προκλήθηκε ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών.
- Προστέθηκαν 350μl αιθανόλης 70% και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη φυγοκέντρησης.
- Η στήλη φυγοκέντρησης προσαρμόστηκε σε ανοιχτό σωληνάριο συλλογής υγρών χωρητικότητας 2ml, φυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στα $8000 \times g$ για 15sec και απορρίφθηκε το εκρέον διάλυμα από το σωληνάριο των 2ml.
- Προστέθηκαν 350μl *Buffer RW1* και το εκκρέον διάλυμα απορρίφθηκε έπειτα από νέα φυγοκέντρηση στα $8000 \times g$ για 15sec
- Ακολούθησε ενζυματική πέψη του DNA με 10μl *stock* διαλύματος *DNase I* και 70μl *Buffer RDD*. Η επώαση με το ένζυμο έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($20-30^\circ\text{C}$) για 15min.
- Προστέθηκαν 350μl *Buffer RW1* και το εκκρέον διάλυμα απορρίφθηκε έπειτα από νέα φυγοκέντρηση στα $8000 \times g$ για 15sec
- Στη συνέχεια έγινε πλύση με προσθήκη 500 μl *Buffer RPE* και φυγοκέντρηση στα $8000 \times g$ για 15sec την οποία ακολούθησε νέα πλύση με 500 μl *Buffer RPE* και φυγοκέντρηση στα $8000 \times g$ για 2min.
- Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο 2ml και φυγοκεντρήθηκε για 1min στα $15000 \times g$ ώστε να αποστραγγισθούν πλήρως υπολειμματικά διαλύματα.
- Τελικά η στήλη τοποθετήθηκε σε σωλήνα τύπου Eppendorf των 200μl, προστέθηκαν 50μl H_2O χωρίς RNase/DNase και το RNA εκλούστηκε από το φίλτρο με φυγοκέντρηση για 1min στα $15000 \times g$. Πριν χρησιμοποιηθεί RNA φωτομετρήθηκε προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του

11.5. Σύνθεση cDNA από το κυτταρικό RNA

Την απομόνωση κυτταρικού RNA ακολούθησε η αντίστροφη μεταγραφή του, επωάζοντας το με την αντίστροφη μεταγραφάση *Omniscript*[®] στους 37°C για μία ώρα και με τη χρήση τυχαίων εκκινητών. Οι τυχαίοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εξαμερή δεοξυριβονουκλεοτιδίων, ικανά να πολυμερίσουν mRNAs χωρίς

πολυαδενοσινικό άκρο (polyA), σχηματίζοντας τμήματα Klenow (Klenow fragments). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής ήταν 20μl τα οποία αποτελούνταν από:

- 2μl *Buffer RT*
- 2μl μίγματος dNTPs (τελική συγκέντρωση για κάθε dNTP 0,5mM)
- 2 μl τυχαίων εκκινητών (τελική συγκέντρωση 1μM)
- 1 μl *Omniscript*[®] (τελική συγκέντρωση 4U)
- Όγκο διαλύματος απομονωμένου RNA που αντιστοιχούσε σε 2μg
- Την απαραίτητη ποσότητα dH₂O χωρίς RNase/DNase για συμπλήρωση του όγκου

Πίνακας IV-2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο έκφρασης κάθε γονιδίου με RT-PCR καθώς και τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους.

<i>Εκκινητές</i>				
<i>Γονίδια</i>	<i>Κωδικός (5' -> 3')</i>	<i>Αντικωδικός (5' -> 3')</i>	<i>Μήκος προϊόντος (pb)</i>	<i>T° Υβριδισμού</i>
β-actin	TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC	GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC	396	58°C
Oct-4	CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTA	CAAGGGCCGCAGCTTACACATGTTC	247	
NANOG	CAGCTGTGTGTACTCAATGATAGATT	ACACCATTGCTATTCTTCGCCAGTTG	179	
LIF	AACAACCTCATGAACCAGATCAGGAGC	ATCCTTACCCGAGGTGTCAGGGCC	405	
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452	52 °C
FGF2	GTGTGCTAACCGTTACCTGGCTAT	AGGTAAGCTTCACTGGGTAACAGC	415	

11.6. Ενίσχυση cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

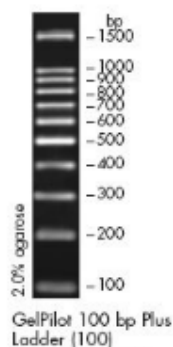
Η έκφραση των γονιδίων *Oct-4*, *Nanog*, *LIF* και *FGF-2* (βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας, *basic fibroblast growth factor*) μελετήθηκε με PCR. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το kit πολυμεράσης HotstartTaq MasterMix Kit και οι αντίστοιχοι εκκινητές για κάθε γονίδιο όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα IV-2. Συγκεκριμένα τοποθετήθηκαν σε PCR *strips* των 100μl:

- 25μl *HotstartTaq MasterMix* (τελική συγκέντρωση 2,5U *HotstartTaq* και 200μM από κάθε dNTP)
- 5μl από κάθε εκκινητή (τελική συγκέντρωση 0,1μM)
- 10μl μητρικού (*matrix*) cDNA (που αντιστοιχούσαν σε περίπου 1μg DNA)
- 10μl H₂O χωρίς RNase/DNase

Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η β-ακτίνη και το *GAPDH*. Οι ρυθμίσεις του θερμοκυκλοποιητή ήταν οι ακόλουθες: 10 λεπτά στους 95°C για την ενεργοποίηση του ενζύμου, τριάντα κύκλοι των: 30sec στους 94°C, 30sec στους 52°C ή 58°C (ανάλογα με το σετ εκκινητών) και 1min στους 72°C. Μετά το πέρας των 30 κύκλων ακολούθησε ένα στάδιο επιμήκυνσης των αλυσίδων για 5min στους 72°C και το τελικό προϊόν διατηρήθηκε στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

11.7. Ηλεκτροφόρηση cDNA και ανάγνωση αποτελεσμάτων

Για την ανίχνευση του προϊόντος πολυμερισμού έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο. Ως δείκτης αναφοράς για το μέγεθος των cDNAs, χρησιμοποιήθηκε κλίμακα νουκλεοτιδίων μεγέθους 100 έως 1500bp (Εικόνα IV-9) ενώ η τάση του ρεύματος ήταν 15V/cm πηκτώματος. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες ενισχυμένων ακολουθιών παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.



Εικόνα IV-9: Κλίμακα νουκλεοτιδίων αναφοράς

12. Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λόρου σε ικρίωματα

12.1. Υλικά

- Ικρίωμα κολλαγόνου [Costar]
- Εργαλεία
 - ο Αποστειρωμένη λαβίδα
- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Πλάκες των 96 οπών [Costar]
 - ο Falcon 50 ml [Becton Dickinson]
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο Θρεπτικό υλικό α-MEM με 20% FBS

12.2. Στατική καλλιέργεια

Αρχικά τα ικρίωματα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 96 οπών. Για την στατική ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1×10^5 έως 5×10^5 κυττάρων διαλυμένων σε 100μl θρεπτικού μέσου α-MEM με 20% FBS. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C και στην συνέχεια προστέθηκαν 150 μl θρεπτικού μέσου. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 28 ημέρες. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γινόταν κάθε τρεις ημέρες για τη διάρκεια της καλλιέργειας.

12.3. Δυναμική καλλιέργεια

Στην συγκεκριμένη τεχνική ενισχύθηκε η κινητικότητα των κυττάρων στο ικρίωμα. Συγκεκριμένα, το ικρίωμα τοποθετήθηκε μέσα σε κωνικό σωλήνα των 50ml και προστέθηκαν 250μl θρεπτικού υλικού με 5×10^4 έως $2,5 \times 10^5$ κύτταρα. Ακολούθησε επώαση του ικρίωματος υπό συνεχή ανάδευση (50-100 rpm) στους 37°C για 2 έως 4 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης τα ικρίωματα τοποθετήθηκαν, με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, σε πλάκα των 96 οπών, προστέθηκαν 250 μl θρεπτικού μέσου και ακολούθησε καλλιέργεια υπό τις ίδιες συνθήκες όπως και τα ικρίωματα στατικής καλλιέργειας.

13. Κυτταροϊστοχημικές μέθοδοι

13.1. Υλικά

- Πλαστικά – Αναλώσιμα:
 - ο Πλάκες καλλιέργειας των 6 οπών [Costar]
 - ο Αντικειμενοφόροι πλάκες με επικάλυψη πολύ-L-λυσίνης (*Biocoat poly-L-lysine slides*) [Becton Dickinson]
 - ο Καλυπτρίδες πλάκες [Becton Dickinson]
 - ο Falcon 50 ml [Becton Dickinson]
 - ο Falcon 15 ml [Becton Dickinson]
 - ο Θήκες βιοψίας (*biopsy processing/embedding cassettes*) [Nalgene]
 - ο Καλούπια για εγκλεισμό σε *block* παραφίνης
- Διαλύματα – Αντιδραστήρια:
 - ο PBS (pH 7,2) [Gibco]
 - ο Αιθανόλη 100% [Fluka]
 - ο Ισοπροπανόλη [Fluka]
 - ο Υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% (*Formalin 10%*) [Fluka]
 - ο Άνυδρο (παγόμορφο) οξικό οξύ (*glacial acetic acid*) [Fluka]
 - ο Ξυλόλη για ιστολογικές εφαρμογές (*Xylenes histological grade*) [Sigma-Aldrich]
 - ο Παραφίνη με σημείο τήξης 56-58°C
 - ο Υδατικό διάλυμα νιτρικού αργύρου 1% (*silver nitrate 1%*) [Sigma – Aldrich]
 - ο Υδατικό διάλυμα θειώδους νατρίου 3% (*sodium thiosulfate 3%*) [Sigma – Aldrich]
 - ο Αιματοξυλίνη (κατά Hill) (*Hematoxylin*) [Sigma – Aldrich]
 - ο Αιματοξυλίνη Mayer's σε υδατικό διάλυμα 1% (*Mayer's hematoxylin*) [Sigma – Aldrich]
 - ο *Alizarin red -S* [Sigma – Aldrich]

- ο Διάλυμα όξινης φουξίνης Van Gieson (*van Gieson solution acid fuchsin*) [Sigma – Aldrich]
- ο Αλκοολικό διάλυμα ηωσίνης Υ, 5% κ.β. (*Eosin Y alcoholic solution*) [Sigma – Aldrich]
- ο Διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου 1M [Fulka]
- ο *Oil-red-O* [Sigma – Aldrich]
- ο *Sudan IV* [Sigma – Aldrich]
- ο *Toluidine blue* [Sigma – Aldrich]
- ο *Alcian blue* [Sigma – Aldrich]
- ο *Giemsa stain* [Sigma – Aldrich]
- ο Ρητίνη για επικάλυψη ιστολογικών παρασκευασμάτων (*DPX mounting medium*) [Sigma – Aldrich]

13.2. Εγκλεισμός σε παραφίνη

Προκειμένου να μελετηθούν οι κυτταρικές μικρομάζες που ελήφθησαν κατά την χονδρογενή διαφοροποίηση των MSCs αλλά και τα ικριώματα κολλαγόνου με MSCs, ήταν απαραίτητος ο εγκλεισμός τους σε παραφίνη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τέσσερα στάδια (μονιμοποίηση, αφυδάτωση, διαφανοποίηση, εγκλεισμός) ενώ η διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτήθηκε από το μέγεθος του βιολογικού υλικού.

- *Μονιμοποίηση:*

Το προς μονιμοποίηση υλικό, τοποθετήθηκε σε θήκες βιοψίας και ξεπλύθηκε με PBS προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα του θρεπτικού υλικού. Οι θήκες βιοψίας με το βιολογικό υλικό τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% για 1 έως 4 ώρες.

Στη συνέχεια πλύθηκαν με τρεχούμενο νερό και τοποθετήθηκαν σε αιθανόλη καθαρότητας 70% μέχρι την έναρξη της επόμενης φάσης.

- *Αφυδάτωση:*

Οι θήκες βιοψίας με το βιολογικό υλικό τοποθετήθηκαν κατά σειρά σε αιθανόλη 70%, αιθανόλη 80%, αιθανόλη 95% και τελικά αιθανόλη 100% (απόλυτη αιθανόλη). Σε κάθε υλικό παρέμειναν για 30min έως 3 ώρες.

- *Διαφανοποίηση:*

Η αιθανόλη αντικαταστάθηκε από ξυλόλη για 30min έως 3 ώρες και αυτή με τη σειρά της από νέα, καθαρή ξυλόλη για το ίδιο χρονικό διάστημα.

- *Εγκλεισμός:*

Αρχικά οι θήκες βιοψίας εμβαπτίστηκαν σε δοχείο ζέσεως με υγρή παραφίνη στους 58⁰C για 30min έως 3 ώρες και στη συνέχεια σε νέα παραφίνη για το ίδιο χρονικό διάστημα. Τελικά το διαφανοποιημένο βιολογικό υλικό μεταφέρθηκε σε εκμαγείο το οποίο συμπληρώθηκε με υγρή παραφίνη η οποία αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα IV-10: Αυτόματος μικροτόμος παραφίνης Leica RM2255

13.3. Τομές παραφίνης και αποπαραφίνωση

Με τη βοήθεια μικροτόμου, ελήφθησαν τομές πάχους 5μm από block παραφίνης. Ειδικά για τα εγκλεισμένα ικρίωματα πραγματοποιήθηκαν επιφανειακές (150μm) και εν τω βάθει (650μm) τομές, χάρη στη δυνατότητα μέτρησης του βάθους κοπής που παρείχε ο αυτόματος μικροτόμος (Εικόνα IV-10). Όλες οι τομές μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες επικαλυμμένες με πολύ-L-λυσίνη (*poly-L-Lysine*) μέσα σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 40°C, ώστε να αποφευχθεί

η δημιουργία πτυχώσεων. Η επικάλυψη με πολυ-L-λυσίνη επέτρεπε τη δημιουργία ηλεκτροστατικών δεσμών με το παρασκεύασμα και τη, κατά συνέπεια, καλύτερη πρόσδεση αυτού στην επιφάνεια της πλάκας.

Η αποπαραφίνωση που ακολούθησε επιτεύχθηκε, αρχικά, με εφίδρωση των τομών πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C και στη συνέχεια με εμβάπτισή τους σε ξυλόλη για 20min. Πριν τη χρώση οι τομές ενυδατώθηκαν με διαδοχική μεταφορά τους σε απόλυτη αιθανόλη για 5min και από 2min σε αιθανόλη 95%, σε αιθανόλη 80%, σε αιθανόλη 50% και τρεις φορές σε dH₂O.

13.4. Χρώση von Kossa

Η χρώση von Kossa είναι μια μη ειδική χρώση των ιόντων ασβεστίου. Ο νιτρικός άργυρος αντιδρά με το ανιοντικό μέρος των αλάτων ασβεστίου (π.χ. φωσφορικά ιόντα) και υπό την επίδραση φωτός ο άργυρος καθιζάνει, δημιουργώντας μαύρα αποθέματα στις περιοχές που υπάρχουν ιόντα ασβεστίου.

13.4.1. Μέθοδος χρώσης

Τα κύτταρα που επρόκειτο να χρωματιστούν με von Kossa μονιμοποιήθηκαν με ουδέτερο υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης 10%. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου 1% και οι πλάκες με τα κύτταρα τοποθετήθηκαν κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας για 1 ώρα. Μετά το διάστημα αυτό, ξεβγάλθηκαν με dH₂O τρεις φορές και προστέθηκε διάλυμα θειώδους νατρίου 3% για 5min. Τέλος οι πυρήνες των κυττάρων χρώστηκαν με Van Gieson για 5min προτού ξεβγαλθούν/αφυδατωθούν οι πλάκες με αιθανόλη. Αφού στέγνωσε, μια σταγόνα DPX και η τοποθέτηση της καλυπτρίδας, μονιμοποίησαν το παρασκεύασμα προστατεύοντάς το για το μικροσκοπικό έλεγχο.

13.5. Χρώση Alizarin Red S

Σε αντίθεση με τη von Kossa η Alizarin red S είναι μια ειδική χρώση τόσο των ιόντων ελεύθερων ασβεστίου (Ca²⁺) όσο και των χημικών ενώσεών του. Δημιουργεί ερυθρά ιζήματα τα οποία είναι ορατά στις περιοχές όπου υπάρχουν αποθέματα ασβεστίου.

13.5.1. Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής

- Για την παρασκευή διαλύματος Alizarin red S ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:
 - ο σε 90ml dH₂O διαλύθηκε 1gr χρωστικής
 - ο το pH ρυθμίστηκε στο 4,1 – 4,3 με υδροξείδιο του αμμωνίου

- ο συμπληρώθηκε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 100ml
- ο το διάλυμα αναδεύτηκε ώστε να διαλυθεί πλήρως η Alizarin red S και διηθήθηκε με χαρτί Whatman πριν τη χρήση του

13.5.2. Μέθοδος χρώσης

Για καλύτερη μονιμοποίηση των ιόντων Ca²⁺ τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν για 5min σε αιθανόλη 80% στους 4°C. Ακολούθησε χρώση για 10 έως 15min και ξέβγαλμα με αιθανόλη. Προκειμένου να διατηρηθούν τα παρασκευάσματα χωρίς αλλοίωση της χρώσης, επικαλύφθηκαν με μια σταγόνα DPX πάνω στην οποία στερεώθηκε η καλυπτρίδα.

13.6. Χρώση Oil-Red-O

Η χρώση Oil-Red-O χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό λιπιδικών εγκλείστων στα κύτταρα και βασίζεται στη μεγαλύτερη διαλυτότητα της χρωστικής σε αυτά απ' ότι στο διαλύτη της (κατά συνέπεια παρατηρείται μεταφορά της Oil-Red-O από το διαλύτη της προς τα λιπιδικά έγκλειστα).

13.6.1. Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής

- Για την παρασκευή διαλύματος *stock* Oil-Red-O
 - ο Σε 500ml ισοπροπανόλης διαλύθηκαν 0,5gr χρωστικής
 - ο το διάλυμα θερμάνθηκε στους 56°C για 1 ώρα
- Διάλυμα εργασίας (*working solution*) Oil-Red-O:
 - ο 6 μέρη διαλύματος *stock* Oil-Red-O αναμείχθηκαν με 4 μέρη dH₂O.
 - ο Το μίγμα αναδεύτηκε και αφέθηκε να ηρεμήσει για 10min
 - ο Η χρωστική διηθήθηκε με χαρτί Whatman πριν τη χρήση της

13.6.2. Μέθοδος χρώσης

Οι καλλιέργειες που επρόκειτο να χρωματιστούν με Oil-Red-O μονιμοποιήθηκαν με ουδέτερο υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% για 10min. Έπειτα ξεβγάλθηκαν με dH₂O και τοποθετήθηκαν σε 65% ισοπροπανόλη για 3min. Ακολούθησε η χρώση με Oil-Red-O για 15min, ξέβγαλμα με ισοπροπανόλη και χρώση των πυρήνων με αιματοξυλίνη του Mayers για 1 λεπτό. Οι πλάκες ξεβγάλθηκαν με νερό βρύσης προτού καλυφθούν με DPX και την καλυπτρίδα.

13.7. Χρώση Sudan IV

Η χρωστική Sudan IV βάφει μαύρα τα λιποσώματα εντός των κυττάρων, λειτουργώντας κατ' αντίστοιχο τρόπο με την Oil-Red-O. Διαχέεται δηλαδή από το διαλύτη της στα λιποσώματα λόγω μεγαλύτερης διαλυτότητας σε αυτά.

13.7.1. Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής

- Η Sudan IV διαλύθηκε σε αιθανόλη 70% μέχρι κορεσμού
 - ο πριν τη χρήση διηθήθηκε με φίλτρο Whatman

13.7.2. Μέθοδος χρώσης

Οι αντικειμενοφόροι πλακες με τα κύτταρα αρχικά πλύθηκαν με dH_2O και στη συνέχεια με αιθανόλη 70%. Ακολούθησε δεκάλεπτη χρώση με Sudan IV και σύντομη διαφοροποίηση με αιθανόλη 70%. Τελικά ξεβγάλθηκαν με dH_2O για να καλυφθούν με DPX και καλυπτρίδα προκειμένου να διατηρηθούν.

13.8. Χρώση Toluidine Blue

Η Toluidine blue μπορεί να χρώσει τις πρωτεογλυκάνες και τις γλυκοζαμινογλυκάνες στους χόνδρους. Ο όξινος χαρακτήρας των μακρομορίων αυτών οδηγεί στη μερική αλλαγή χρώματος της χρωστικής σε κόκκινο, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη χρώση τους σε μωβ χρώμα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μεταχρωματικό.

13.8.1. Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής

- Για την προετοιμασία της χρωστικής
 - ο 1gr Toluidine blue διαλύθηκε σε
 - ο 100ml διαλύματος ισοπροπανόλης – PBS 1:1 (v/v)
 - ο αναδεύτηκε και πριν τη χρήση διηθήθηκε σε φίλτρο Whatman

13.8.2. Μέθοδος χρώσης

Οι αποπαραφινωμένες και ενυδατωμένες τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Toluidine blue 1% για 1 ώρα στους $37^{\circ}C$. Έπειτα ξεβγάλθηκαν με dH_2O και αφυδατώθηκαν τοποθετούμενες σε αιθανόλη 100%. Τελικά καλύφθηκαν με DPX και καλυπτρίδα.

13.9. Χρώση Alcian Blue

Η Alcian blue είναι μη κατιονική χρωστική που χρησιμοποιείται ευρέως για τη χρώση των όξινων μυκοπολυσακχαριτών και γλυκοζαμινογλυκανών. Βάφει τις

γλυκοζαμινογλυκάνες στην εξωκυττάρια ουσία του υαλώδους χόνδρου σε μπλε, μπλε-πράσινο.

13.9.1. Προετοιμασία διαλύματος χρωστικής

- Για την προετοιμασία υδατικού διαλύματος Alcian blue 1% με pH 2,5 προστέθηκαν:
 - ο σε 97ml dH₂O:
 - 1gr Alcian Blue
 - 3ml άνυδρο οξικό οξύ (*glacial acetic acid*)
 - ο Το διάλυμα αναδεύτηκε καλά ώστε να διαλυθεί πλήρως η χρωστική και διηθήθηκε πριν από τη χρήση του με φίλτρο Whatman.

13.9.2. Μέθοδος χρώσης

Αρχικά οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις αποπαραφινωμένες και ενυδατωμένες τομές ξεβγάλθηκαν με υδατικό διάλυμα 3% (v/v) άνυδρου οξικού οξέος. Ακολούθησε η χρώση με Alcian blue 1% (pH 2,5) για 5min. Μετά το διάστημα αυτό οι πλάκες απομακρύνθηκαν από τη χρωστική, στραγγίχθηκαν με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού και τοποθετήθηκαν σε αιματοξυλίνη van Gieson για 1min. Τελικά αφυδατώθηκαν με ένα γρήγορο ξέβγαλμα σε απόλυτη αιθανόλη και μόλις στέγνωσαν προστέθηκε μια σταγόνα DPX και η καλυπτρίδα.

13.10. Αιματοξυλίνη ηωσίνη

13.10.1. Μέθοδος χρώσης

Οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν για 30sec σε διάλυμα αιματοξυλίνης. Στη συνέχεια και αφού ξεβγάλθηκαν 3 φορές με dH₂O τοποθετήθηκαν για άλλα 30sec σε διάλυμα ηωσίνης. Έπειτα πλύθηκαν με dH₂O και αφυδατώθηκαν με αιθανόλη προτού επικαλυφθούν με DPX και καλυπτρίδα.

13.10.2. Χρώση Giemsa

Η χρώση Giemsa χρησιμοποιήθηκε για να αναδείξει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των MSCs. Έχει την ιδιότητα να βάφει τους πυρήνες μωβ – μαύρους και να χρωματίζει δομές του κυτταροπλάσματος.

13.10.3. Μέθοδος χρώσης

Τα MSCs αρχικά μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% για 10min. Ακολούθησε χρώση με Giemsa για 5 min, ξέβγαλμα με dH₂O και τελικά τα κύτταρα αφέθηκαν να στεγνώσουν προτού επικαλυφθούν με DPX και καλυπτρίδα.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΜΦΑΛΟ-ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

1. Συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Συλλέχθηκαν συνολικά 321 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος και αντίστοιχος αριθμός ομφαλίων λώρων. Από αυτές 172 χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των μεθόδων απομόνωσης των MSC (Παράρτημα II) και 96 για τη σύγκριση των θρεπτικών υλικών (Παράρτημα III). Οι συλλογές έγιναν από τελειόμηνους τοκετούς και κατόπιν έγγραφης συναίνεσης της μητέρας. Η θερμοκρασία κατά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο ήταν 4°C και η επεξεργασία τους, για την απομόνωση των κυττάρων, ξεκίνησε σε λιγότερο από 24 ώρες από τη συλλογή. Στις 45 από τις 321 μονάδες (ποσοστό 14,0%) σχηματίστηκαν θρόμβοι και απορρίφθηκαν ενώ 8 (2,49%), είχαν βακτηριακή επιμόλυνση με αποτέλεσμα να καταστραφούν οι πρωτογενείς καλλιέργειες των κυττάρων. Ο μέσος όγκος συλλογής του υπόλοιπου 172 μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος (χωρίς το αντιπηκτικό) ήταν 63,2±24,8 ml. Η περιεκτικότητά τους σε MNC, ανερχόταν κατά μέσον όρο σε 541±136x10⁶ και η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν, σε όλες τις περιπτώσεις, μεγαλύτερη του 90% (Πίνακας V-1).

Πίνακας V-1: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος που συλλέχθηκαν σε ασκούς συλλογής με αντιπηκτικό, με σκοπό την απομόνωση MSCs και χωρίς αντιπηκτικό, για την παραγωγή ορού ομφαλοπλακουντιακού αίματος

	Συλλογές Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος	
	Με CPD	Χωρίς CPD
n	321	42
Μέση θερμοκρασία μεταφοράς	4 ± 2,3 °C	25 ± 4,2 °C
Μέσος χρόνος μεταφοράς	19 ± 3h	19 ± 3h
Απόρριψη λόγω πηγμάτων στον ασκό	45 (14,0%)	0
Απόρριψη λόγω επιμόλυνσης	8 (2,49%)	0
Μονάδες που χρησιμοποιήθηκαν		24
Μέσος όγκος συλλογής	63,2 ± 24,8ml	73,8 ± 36,4
Μέσος αριθμός MNC (x10 ⁶)	541 ± 136	δεν μετρήθηκε
Βιωσιμότητα κυττάρων	97 ± 3 %	δεν μετρήθηκε

Παράλληλα, έγινε συλλογή 42 μονάδων (Παράρτημα IV) σε ασκούς χωρίς αντιπηκτικό (Πίνακας V.1), με σκοπό την παραγωγή CBS. Οι μονάδες αυτές μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκαν, στο σύνολό τους, εντός 24 ωρών.

2. Απομόνωση Μεσεγγυματικών Βλαστικών Κυττάρων

2.1. Απομόνωση χωρίς εμπλουτισμό

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 172 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την απομόνωση MSC (Παράρτημα II). Στις 92 από αυτές διαχωρίστηκαν τα MNC χωρίς πρότερη επεξεργασία. Από το συνολικό αριθμό των εμπύρηνων κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος με την επιστίβαση ανακτήθηκε το $23,1 \pm 9,5\%$. Όταν αυτά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν, παρατηρήθηκε ένας μικτός πληθυσμός από αιμοποιητικά κύτταρα, σφαιρικού σχήματος με μεγάλο πυρήνα και περιορισμένο κυτταρόπλασμα, καθώς και MSC με τη χαρακτηριστική μορφολογία ινοβλαστών σε ποσοστό μόλις $8 \pm 3\%$ (Εικόνα V-1A).

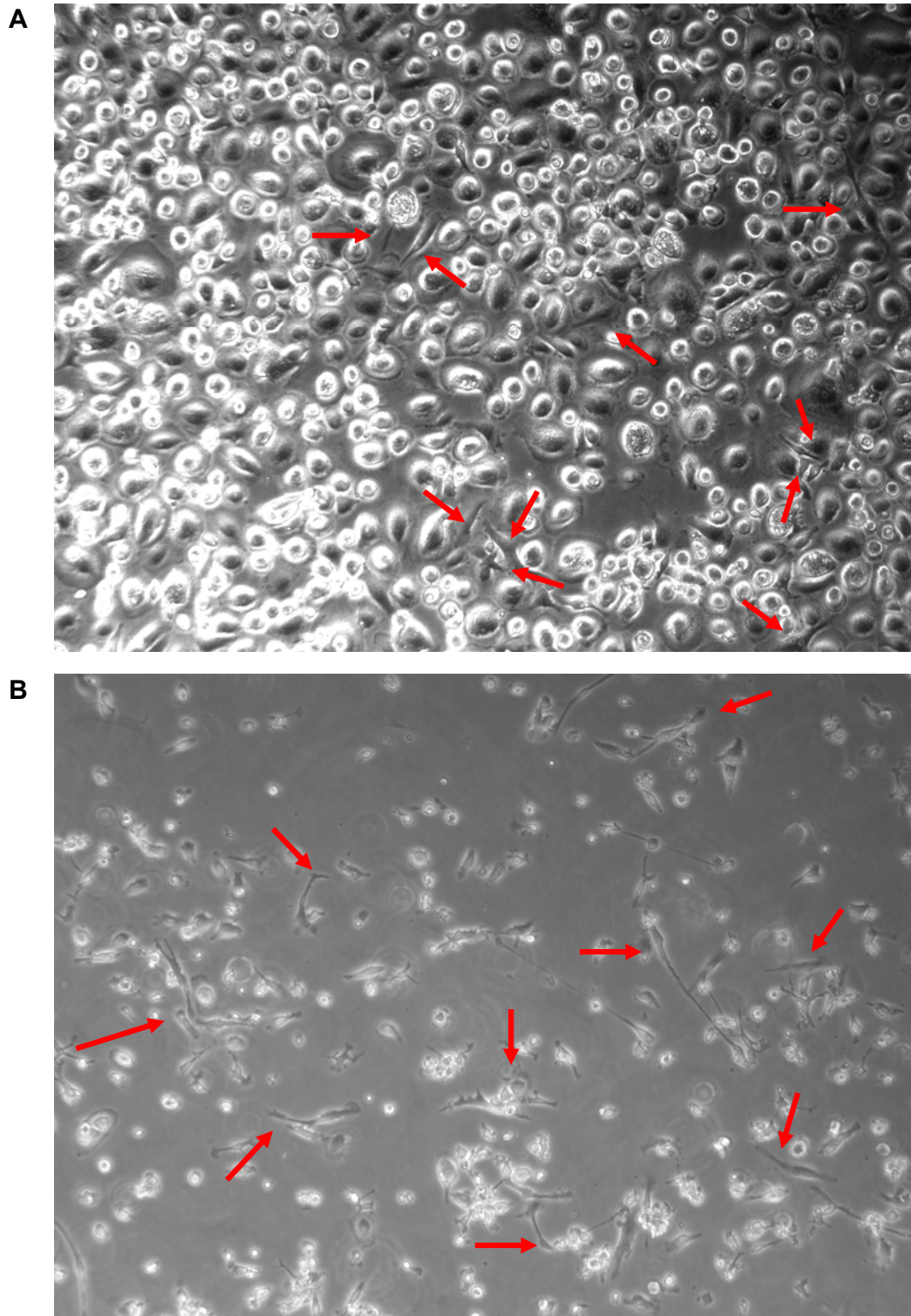
2.2. Εμπλουτισμός με RosetteSep®

Από 80 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος τα κύτταρα απομονώθηκαν με τη χρήση *RosetteSep*® (Παράρτημα II). Σε αυτήν την περίπτωση και λόγω του εμπλουτισμού που προηγήθηκε της επιστίβασης, το ποσοστό ανάκτησης των MNC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος ήταν μόλις $1,3 \pm 1,1\%$. Αντίθετα όμως από τη μέθοδο απομόνωσης χωρίς εμπλουτισμό, ενώ στις πρωτογενείς καλλιέργειες παρατηρήθηκαν κύτταρα με τη μορφολογία αιμοποιητικών κυττάρων, τα MSC αποτελούσαν το $47 \pm 5\%$ του συνολικού πληθυσμού (Εικόνα V-1B).

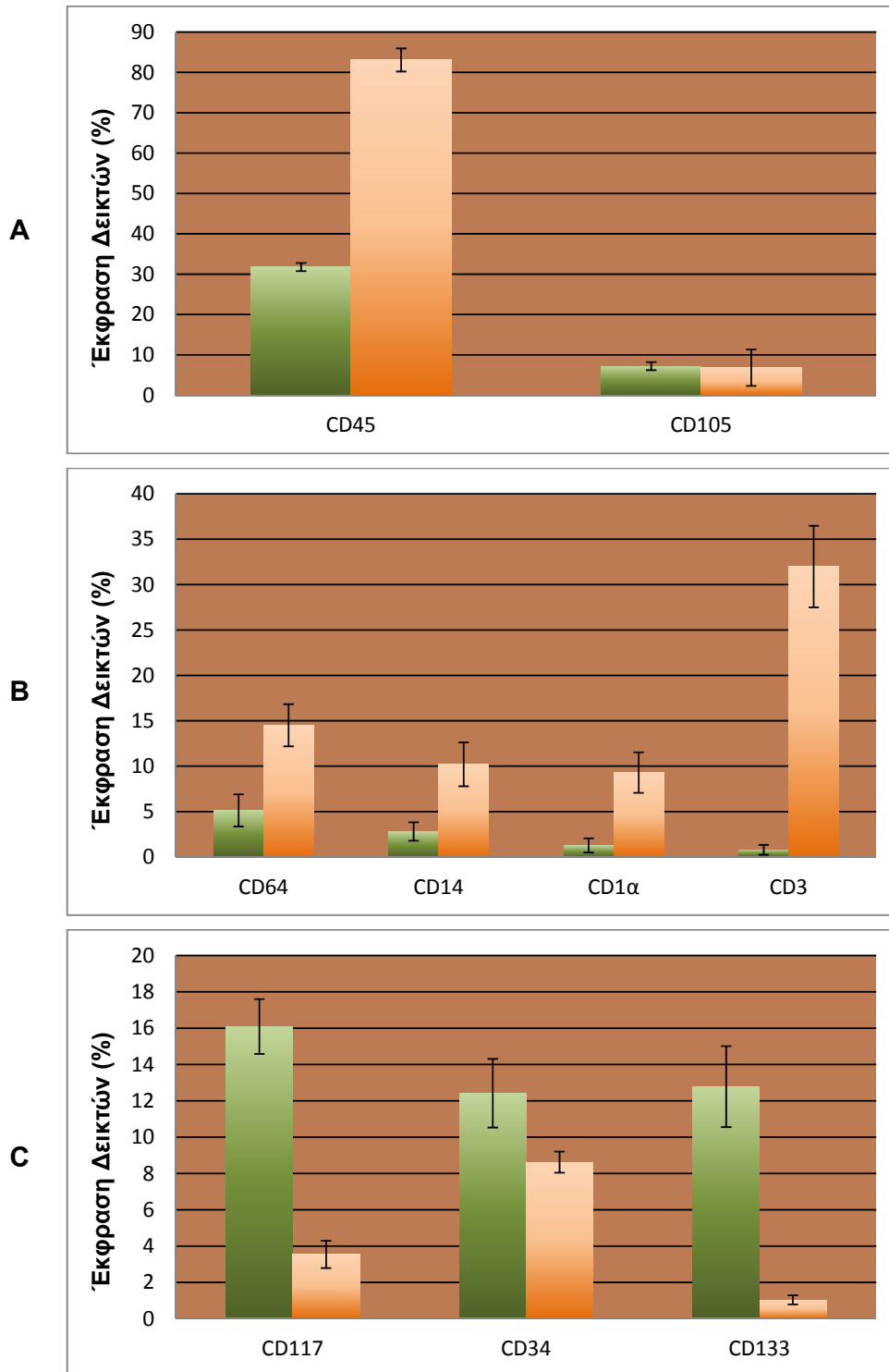
2.3. Ποιοτική σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης

Όπως προαναφέρθηκε, ο μικροσκοπικός έλεγχος των πρωτογενών καλλιιεργειών του ομφαλοπλακουντιακού αίματος έδειξε ότι, όταν δεν προηγήθηκε εμπλουτισμός με *RosetteSep*®, αυτές αποτελούσαν κατά $8 \pm 3\%$ από MSC ενώ με τη χρήση του *RosetteSep*® το ποσοστό αυτό ανέβηκε στο $47 \pm 5\%$ (Εικόνα V-1A και B). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από τον κυτταρομετρικό έλεγχο των απομονωμένων κυττάρων. Μονοπύρηνια κύτταρα που ελήφθησαν αμέσως μετά από την επιστίβαση σήμάνθηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα προκειμένου να διαπιστωθεί ο ανοσοφαινότυπός τους. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 25 δείγματα

κυττάρων απομονωμένων με εμπλουτισμό και 25 δείγματα χωρίς εμπλουτισμό. Διαπιστώθηκε δε ότι, παρόλο που το ποσοστό έκφρασης του μεσεγχυματικού δείκτη CD105 ήταν χαμηλό και για τις δύο μεθόδους απομόνωσης των κυττάρων ($7,2\pm 3,4\%$ στα εμπλουτισμένα με *RosetteSep*[®] κύτταρα και $6,8\pm 4,5\%$ στα μη εμπλουτισμένα), ο πληθυσμός αιμοποιητικών κυττάρων ήταν συνολικά μειωμένος όταν χρησιμοποιήθηκε *RosetteSep*[®] όπως φάνηκε από τη μέση έκφραση του λευκοκυτταρικού δείκτη CD45 που μετρήθηκε $31,75\pm 3,25\%$ έναντι του $83,07\pm 2,87\%$ όταν δεν έγινε εμπλουτισμός (Εικόνα V-2A). Ποιοτικά η διαφορά ερμηνεύθηκε από τη μείωση των ώριμων αιμοποιητικών πληθυσμών με τη χρήση του *RosetteSep*[®], αφού τα ποσοστά έκφρασης των μονοκυτταρικών δεικτών CD64 και CD14 ($5,12\pm 1,77\%$ και $2,79\pm 1,02\%$ αντιστοίχως) καθώς και τα ποσοστά $1,27\pm 0,78\%$ του CD1α δείκτη των δενδριτικών κυττάρων και $0,79\pm 0,54\%$ του CD3 δείκτη των T-λεμφοκυττάρων ήταν σαφώς χαμηλότερα από τα $14,51\pm 2,32\%$ για το CD64, $10,20\pm 2,41\%$ για το CD14, $9,29\pm 2,23\%$ για το CD1α και $31,99\pm 4,49\%$ για το CD3 που μετρήθηκαν όταν αυτό δε χρησιμοποιήθηκε (Εικόνα V-2B). Το αντίστροφο συνέβη με τους προγονικούς αιμοποιητικούς δείκτες CD117, CD34 και CD133 που παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά έκφρασης ($16,09\pm 1,51\%$, $12,42\pm 1,89\%$ και $12,78\pm 2,23\%$ αντίστοιχα) στον εμπλουτισμό σε αντίθεση με τα αντίστοιχα ποσοστά ($3,54\pm 0,75\%$, $8,62\pm 0,58\%$ και $1,04\pm 0,25\%$) στις περιπτώσεις που έγινε απλή επιστίβαση (Εικόνα V-2C).



Εικόνα V-1.: Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων απομονωμένων από ομφαλοπλακουντιακό αίμα χωρίς εμπλουτισμό (Α) ή έπειτα από εμπλουτισμό με *RosetteSep*® (Β). Παρατηρούνται τα αιμοποιητικά κύτταρα που σχηματίζουν χαρακτηριστικές αποικίες σε μορφή «λιθόστρωτου» (cobblestone) και τα διπολικά – ατρακτοειδή MSCs με μορφολογία ινοβλαστών (κόκκινα βέλη). (Μεγέθυνση 100x)

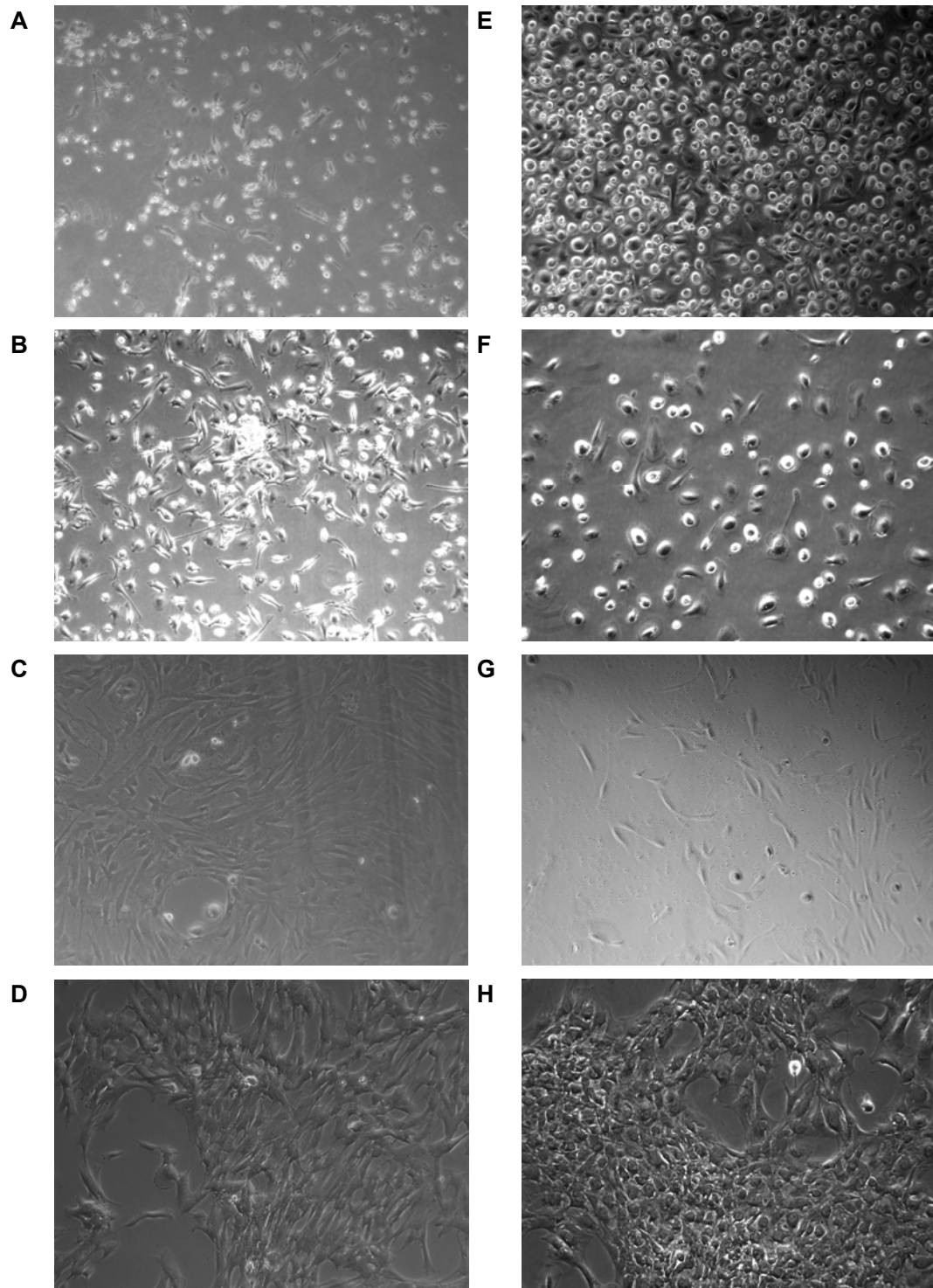


Εικόνα V-2.: Σύγκριση των μέσων όρων έκφρασης των δεικτών επιφανείας (στα 25 δείγματα) των κυττάρων που απομονώνονται με χρήση *RosetteSep*® (πράσινο) και χωρίς (πορτοκαλί). Μαζί με τα MSC λαμβάνονται και CD45+ κύτταρα (A). Ωστόσο η έκφραση ώριμων αιμοποιητικών δεικτών είναι περιορισμένη στην περίπτωση του *RosetteSep*® (B). Το αντίστροφο συμβαίνει για τους προγονικούς αιμοποιητικούς δείκτες (C).

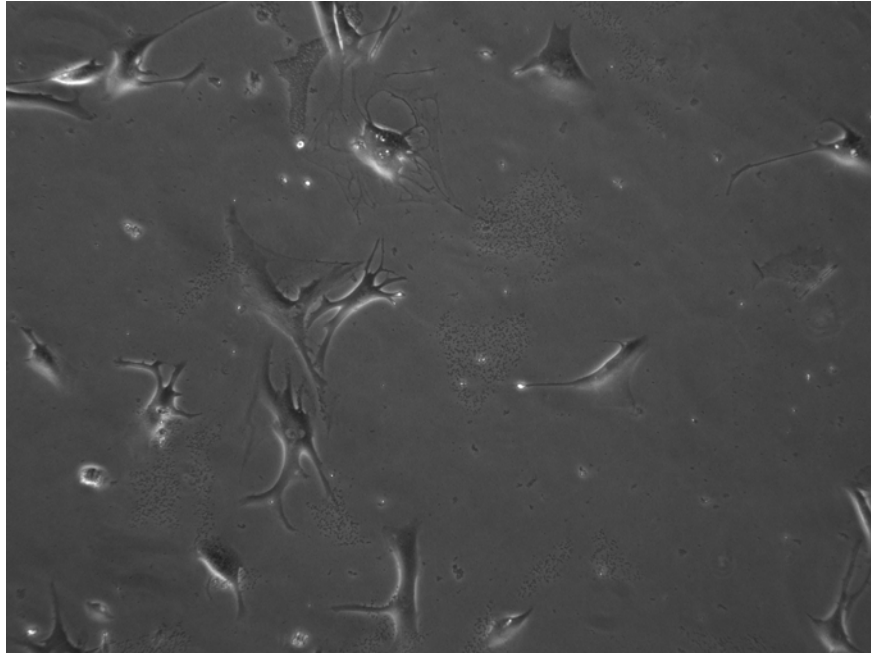
3. Καλλιέργειες Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

Τα κύτταρα που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό α -MEM με 10% FBS (Εικόνα V-3A και E). Όταν οι καλλιέργειες έφταναν σε ποσοστό κάλυψης της φλάσκας 80% τα κύτταρα (μπερίπου 4×10^6 ανά φλάσκα) αποκολλούνταν με τη χρήση θρυψίνης, χωρίζονταν σε δύο ίσες ποσότητες και τοποθετούνταν σε δύο νέες φλάσκες. Επιπλέον στην 3^η ανακαλλιέργεια (*passage*) ελήφθησαν 4×10^6 τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για φαινοτυπικούς ελέγχους (2×10^6 κύτταρα) και δοκιμασίες διαφοροποίησης (2×10^6 κύτταρα) ενώ στην 5^η ανακαλλιέργεια ελήφθησαν 1×10^6 κύτταρα για ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό. Με αυτόν τον τρόπο, σε κάθε ανακαλλιέργεια αυξανόταν το ποσοστό MBK στο συνολικό πληθυσμό (Εικόνα V-3B, C, F και G). Τελικά χρειάστηκαν 3 ανακαλλιέργειες (Εικόνα V-3D και H) ώστε στην καλλιέργεια να υπάρχουν μόνο MSC, ανεξάρτητα από τον τρόπο απομόνωσης. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις, παρατηρήθηκε μεγάλη δυσκολία προκειμένου τα κύτταρα να ξεπεράσουν το στάδιο της 1^{ης} ανακαλλιέργειας. Το σημαντικότερο πρόβλημα ήταν ότι σταματούσε ο πολλαπλασιασμός τους μετά την ανακαλλιέργεια. Μόλις 2 καλλιέργειες από τις 80 (CB001 και CB162) που ξεκίνησαν με κύτταρα απομονωμένα με το *RosetteSep*[®] έφτασαν στο στάδιο της 3^{ης} ανακαλλιέργειας και οδήγησαν σε καθαρό πληθυσμό MSC, γεγονός που μεταφράζεται σε ένα ποσοστό επιτυχίας της απομόνωσης της τάξης του 1,6%. Αντίστοιχο ήταν και το ποσοστό επιτυχίας της απομόνωσης (1,84%) όταν δεν έγινε εμπλουτισμός των κυττάρων αφού και σε αυτή την περίπτωση μόνο 2 από τα 92 δείγματα (CB097 και CB117) ξεπέρασαν το στάδιο της 3^{ης} ανακαλλιέργειας ώστε να καταστεί δυνατή η απομόνωση MSC.

Στις περιπτώσεις όπου η απομόνωση MSC ήταν επιτυχής μελετήθηκε η πολλαπλασιαστική δυνατότητα των κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες. Η μέθοδος απομόνωσης δε φάνηκε να επηρεάζει την κινητική των καλλιιεργειών των MSCs. Η μέγιστη διάρκεια διατήρησης των κυττάρων στις συνθήκες της μελέτης ήταν για 120 ημέρες, που αντιστοιχούσαν σε 6 ανακαλλιέργειες. Μετά από αυτό το διάστημα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σταμάτησε και παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία τους (Εικόνα V-4). Συγκεκριμένα εμφάνιζαν ένα ακανόνιστο, ή αστεροειδές σχήμα με εξασθενημένο κυτταρόπλασμα και πολύλοβους πυρήνες. Οι καλλιέργειες αυτές κατέληξαν με τη σταδιακή νέκρωση και αποκόλληση των MSC. Μέχρι τη 5^η ανακαλλιέργεια (που αντιστοιχούσε σε 100 ημέρες καλλιέργειας) οπότε και παρατηρήθηκε η τελευταία αύξησή του, ο πληθυσμός των



Εικόνα V-3.: Η ανομοιογένεια που παρατηρήθηκε στην αρχική καλλιέργεια των MSC απομονωμένων με (A) και χωρίς (E) *RosetteSep®* περιορίστηκε σταδιακά στη 1^η ανακαλλιέργεια (B και F αντίστοιχα) και στη 2^η (C και G) για να καταλήξει σε ομοιογενή πληθυσμό MSC στη 3^η ανακαλλιέργεια (D και H αντίστοιχα). (μεγέθυνση 100x)



Εικόνα V-4.: Τα MSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος μετά από 100 ημέρες σε καλλιέργεια σταμάτησαν να πολλαπλασιάζονται, μεταβλήθηκε η μορφολογία τους και τελικά νεκρώθηκαν και αποκολλήθηκαν (μεγέθυνση 200x)

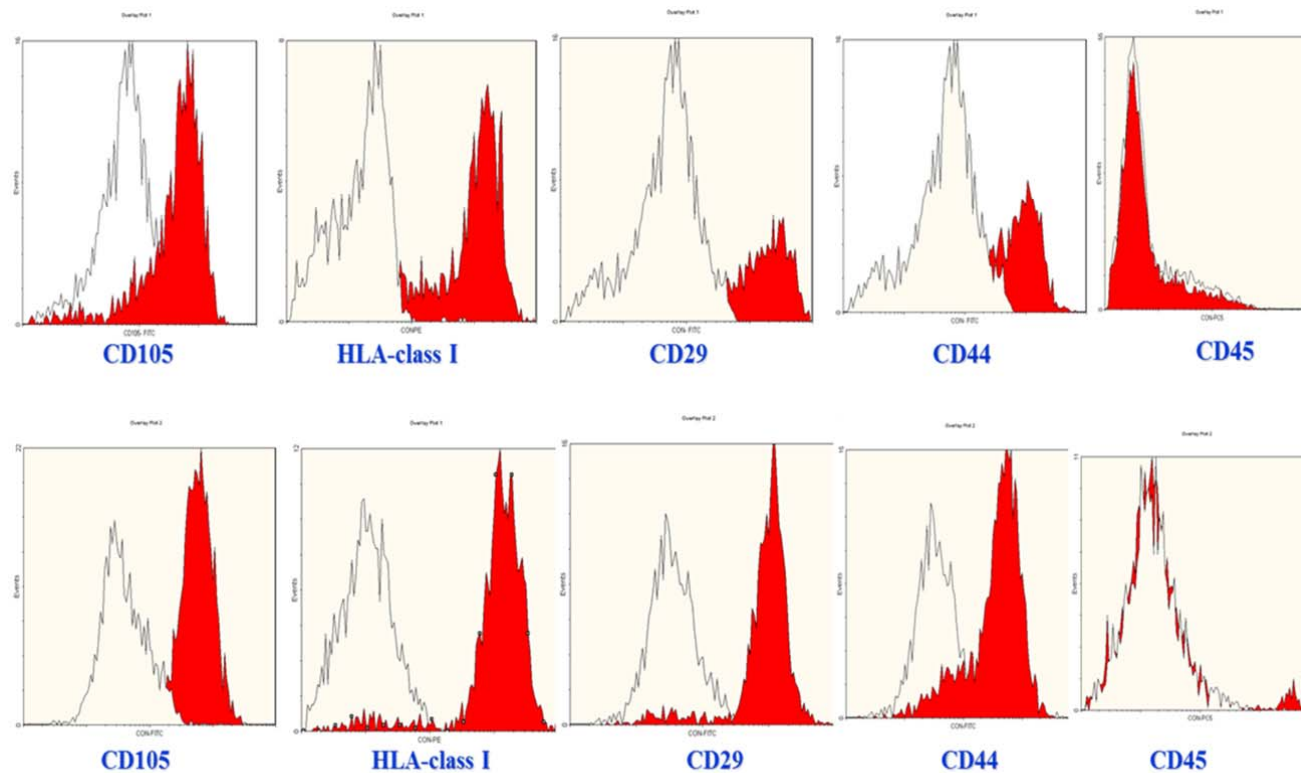
MSC υπέστη κατά μέσον όρο $23,18 \pm 1,78$ διπλασιασμούς δηλαδή έναν διπλασιασμό κάθε $104 \pm 8,12$ ώρες.

4. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Από τα 4 δείγματα που ξεπέρασαν την 3^η ανακαλλιέργεια (2 δείγματα για κάθε μέθοδο απομόνωσης) 2×10^6 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να χαρακτηριστούν φαινοτυπικά με δύο μεθόδους. Κατ' αρχάς πραγματοποιήθηκε μελέτη έκφρασης των δεικτών επιφανείας με κυτταρομετρία ροής ενώ παράλληλα, εξετάστηκε η γονιδιακή έκφραση με αντίστροφη μεταγραφή του κυτταρικού *mRNA* με σκοπό την ανίχνευση ενεργών γονιδίων, χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων. Για κάθε έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν 1×10^6 κύτταρα. Ειδικά για τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό, χρησιμοποιήθηκε άλλο 1×10^6 κύτταρα, από τα ίδια δείγματα, αλλά αυτή τη φορά από την 5^η ανακαλλιέργεια.

4.1. Ανοσοφαινότυπος

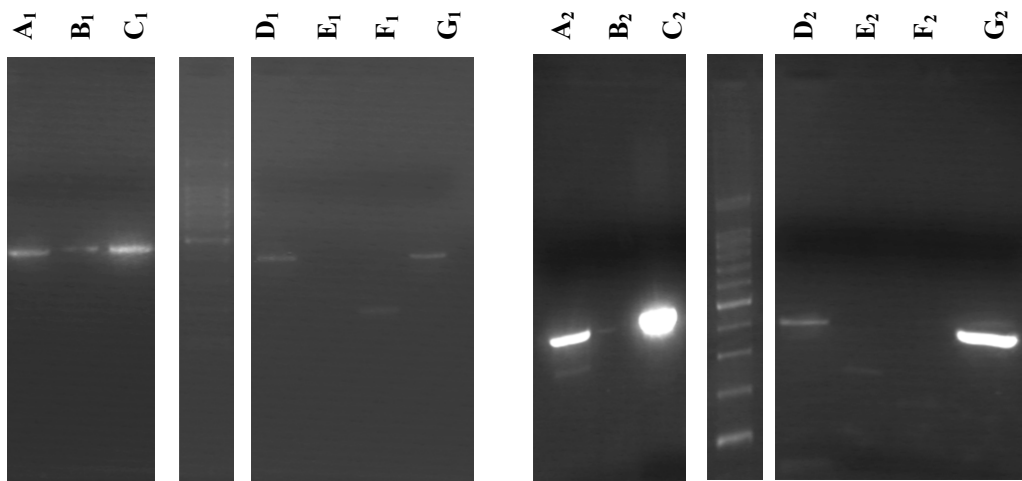
Για τη πραγματοποίηση της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που ελήφθησαν στο τέλος της 3^{ης} ανακαλλιέργειας όταν δηλαδή διαπιστώθηκε κατά το μικροσκοπικό έλεγχο η παρουσία μοναδικού ομοιογενούς πληθυσμού. Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν την απουσία του αιμοποιητικού δείκτη CD45 (ποσοτό έκφρασης μικρότερο του 1%) τόσο στα MSC που είχαν απομονωθεί με *RosetteSep*® όσο και σε αυτά που απομονώθηκαν απευθείας, χωρίς δηλαδή να έχει προηγηθεί εμπλουτισμός. Αντιθέτως οι χαρακτηριστικοί των MSC δείκτες που εξετάστηκαν δηλαδή το CD105, CD29,CD44 αλλά και το τάξης I αντιγόνο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (*HLA class I*), βρέθηκαν θετικοί και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα V-5) με ποσοστό έκφρασης μεγαλύτερο του 95%. Τα χαρακτηριστικά αυτά διατηρήθηκαν αμετάβλητα έως και την τελευταία ανακαλλιέργεια (5^η) όπου συνεχίστηκε ο πολλαπλασιασμός των MSCs, προτού τελικά νεκρωθούν τα κύτταρα.



Εικόνα V-5: Τόσο τα MSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος που απομονώθηκαν με *RosetteSep*® (A) όσο και αυτά που απομονώθηκαν απευθείας (B) εξέφραζαν τους χαρακτηριστικούς για τα μεσεγχυματικά κύτταρα δείκτες CD105x, CD29 και CD44. Ήταν επίσης θετικά για το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I ενώ δεν εξέφραζαν τον αιμοποιητικό δείκτη CD45. (Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από κάθε κατηγορία)

4.2. Γονιδιακή έκφραση

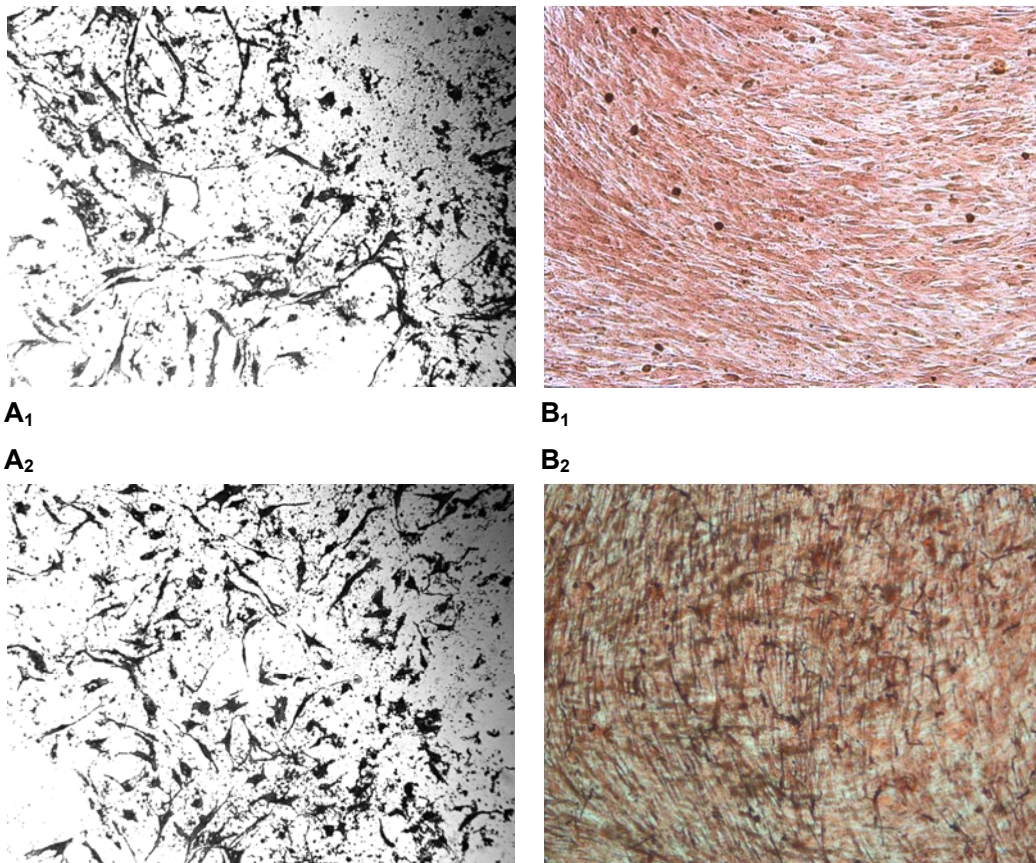
Για την περεταίρω διερεύνηση του φαινοτύπου των MSC έγινε απομόνωση των αγγελιαφόρων *RNA* τους και αντίστροφη μεταγραφή. Ακολούθησε *PCR* με εκκινητές κατάλληλους για τον εντοπισμό των, χαρακτηριστικών των πολυδύναμων κυττάρων, γονιδίων *Oct-4*, *Nanog*, *Rex-1*, *FGF-2* και *LIF* και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Όπως φάνηκε από την παρουσία ζωνών των ενισχυμένων αλληλουχιών, *GAPDH* και β-ακτίνης τόσο στα απομονωμένα με *RosetteSep*® κύτταρα (Εικόνα V-6A₁ και D₁ αντίστοιχα) όσο και στα κύτταρα χωρίς *RosetteSep*® (Εικόνα V-6A₂ και D₂ αντίστοιχα) η εξαγωγή του *mRNA* και η αντίστροφη μεταγραφή ήταν επιτυχείς. Παράλληλα η παρουσία ενισχυμένων αλληλουχιών των γονιδίων *Rex-1*, *FGF-2*, *Nanog* και *LIF* στα δείγματα των εμπλουτισμένων (Εικόνα V-6B₁, C₁, F₁ και G₁) και μη εμπλουτισμένων MSC (Εικόνα V-6B₂, C₂, F₂ και G₂) απέδειξε την έκφρασή τους στις καλλιέργειες αυτών των κυττάρων. Τέλος και ενώ για τα μη εμπλουτισμένα κύτταρα το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *Oct-4* ήταν ορατό χωρίς πρόβλημα (Εικόνα V-6E₂) στη περίπτωση των κυττάρων που απομονώθηκαν με *RosetteSep*® υπήρχε μια ζώνη στην αναμενόμενη θέση αλλά ήταν πολύ αδύναμη και ορατή μόνο κάτω από τη λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και όχι στη φωτογραφία (Εικόνα V-6E₁).



Εικόνα V-6: Τα MSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος που απομονώθηκαν με *RosetteSep*® μελετήθηκαν με RT-PCR για την έκφραση των γονιδίων *Rex-1* (B1), *FGF-2* (C1), *Oct-4* (E1), *Nanog* (F1) και *LIF* (G1) όπως έγινε και για τα MSC που απομονώθηκαν χωρίς εμπλουτισμό (B2, C2, E2, F2, και G2 αντίστοιχως). Οι ζώνες A1-2 αντιστοιχούν στο γονίδιο αναφοράς *GAPDH* και οι D1-2 στη β-ακτίνη. (Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από κάθε κατηγορία)

4.3. Ελεγχόμενη *in vitro* διαφοροποίηση

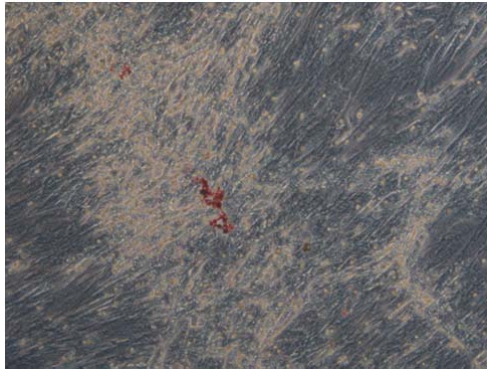
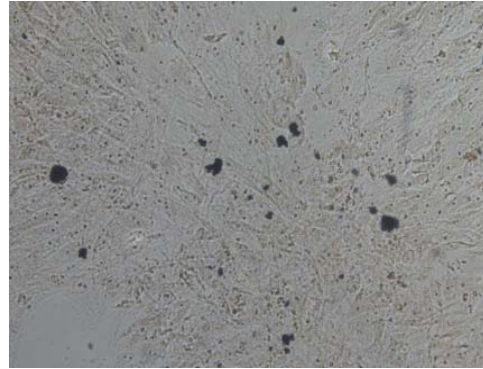
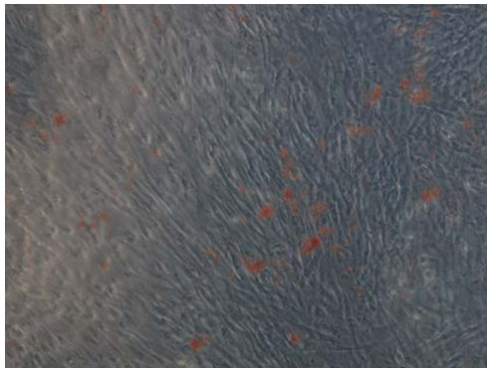
Για τον έλεγχο της ιδιότητας διαφοροποίησης των καλλιεργημένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε καθαρός πληθυσμός MSC. Από καθένα από τα 4 δείγματα ανακαλλιέργεια (2 δείγματα για κάθε μέθοδο απομόνωσης) που έφτασαν στο τέλος της 3^{ης} ανακαλλιέργειας ελήφθησαν 1×10^6 κύτταρα και τοποθετήθηκαν στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό οστεογένεσης ($2,5 \times 10^5$ MSC), λιπογένεσης ($2,5 \times 10^5$ MSC) και χονδρογένεσης (5×10^5 MSC). Μετά από 21, 30 και 21 ημέρες καλλιέργειας αντίστοιχα έγινε χρώση των κυττάρων για να διαπιστωθεί η διαφοροποίησή τους.



Εικόνα V-7: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα χρώσης von Kossa διαφοροποιημένων MSC που απομονώθηκαν με RosetteSep (A1) ή χωρίς (B1). Τα ίδια κύτταρα με χρώση των ιόντων Ca^{++} με Alizarin Red S (B1 και B2 αντίστοιχα) (μεγέθυνση 100x)

Η παραμονή των απομονωμένων με *RosetteSep*® MSC σε υλικό οστεογένεσης για 21 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή της μορφολογίας τους και αλλαγή στο μεταβολισμό του ασβεστίου. Με τη χρώση von Kossa αλλά και με τη χρώση Alizarin Red S διαπιστώθηκε τόσο η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ιόντων Ca^{++} όσο και η δημιουργία ιζημάτων ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνα V-7A₁ και B₁). Στο ίδιο χρονικό διάστημα διαπιστώθηκε και η

διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες και των MSC που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα χωρίς να προηγηθεί το στάδιο εμπλουτισμού τους (Εικόνα V-7A₂ και B₂).

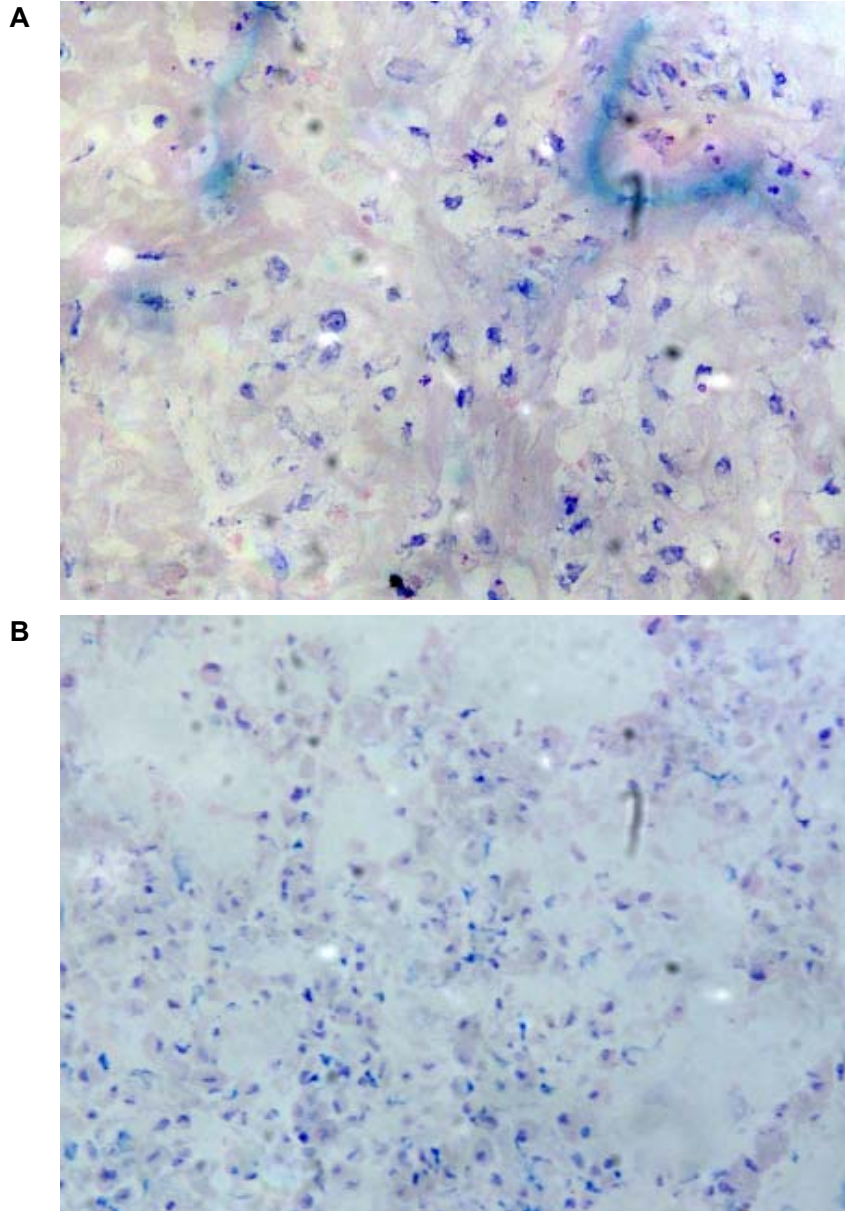
**A1****A2****B1****B2**

Εικόνα V-8: Μετά την επαγωγή λιπογένεσης στα MSC απομονωμένα με *RosetteSep*® τα λιπίδια χρωματίστηκαν με Oil-Red-O (A1) και με Sudan IV (B1). Το ίδιο συνέβη και με τα κύτταρα που απομονώθηκαν χωρίς εμπλουτισμό (A2, και B2 αντίστοιχα) (μεγέθυνση 100x)

Για την πλήρη διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα δεν ήταν αρκετές οι 30 ημέρες κατά τις οποίες τα MSC παρέμειναν στο υλικό λιπογένεσης. Αυτό απεδείχθη από τις χρώσεις Oil-Red-O (Εικόνα V-8A₁ για τα MSC από *RosetteSep*® και A₂ για τα MSC χωρίς *RosetteSep*®) αλλά και Sudan Black (Εικόνα V-8B₁ και B₂ αντίστοιχα) που έδειξαν περιορισμένη παραγωγή λιπιδίων από τα κύτταρα. Ωστόσο παρουσίασαν αλλαγή στη μορφολογία τους που και αντί για τη χαρακτηριστική ομοιότητά τους με τους ινοβλάστες απέκτησαν μια πιο πεπλατυσμένη και σφαιρική μορφή.

Σφαιρική μορφή είχαν και τα χονδροκύτταρα στα οποία διαφοροποιήθηκαν τα MSC που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα με ή χωρίς *RosetteSep*® μετά από 21 ημέρες επαγωγής τους σε θρεπτικό υλικό χονδρογένεσης.

Η χρώση με Toluidine blue έβαψε επιτυχώς τις πρωτεογλυκάνες του μεσοκυττάριου χώρου μωβ (μεταχρωματικό φαινόμενο) και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα V-9Α και Β).



Εικόνα V-9: Μεταχρωματικό φαινόμενο έπειτα από χρώση με toluidine blue Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 21 ημέρες στο θρεπτικό υλικό επαγωγής της χονδρογένεσης έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή και η μεσοκυττάρια ουσία βάφεται μωβ, ενδεικτικά της διαφοροποίησης σε χονδροκύτταρα. Αυτό αληθεύει τόσο για τα MSCs που απομονώθηκαν έπειτα από εμπλουτισμό με *RosetteSep*® (A) (μεγέθυνση 400x), όσο και για τα MSCs που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα χωρίς εμπλουτισμό (B) (μεγέθυνση 200x),

5. Επίδραση του θρεπτικού υλικού

5.1. Στις καλλιέργειες Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος

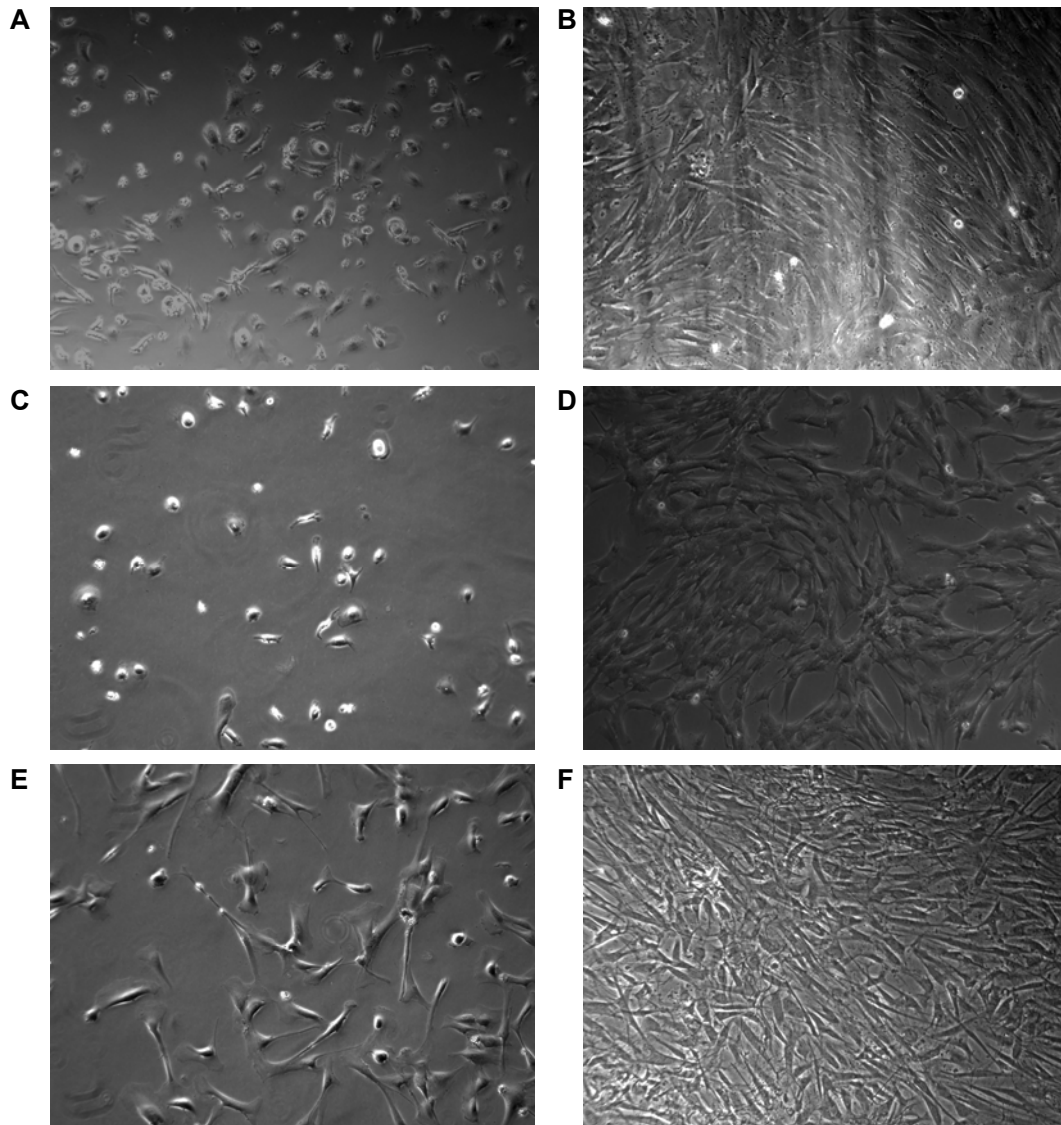
Σε ένα δεύτερο χρόνο συλλέχθηκαν 96 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος (Παράρτημα ΙΙΙ) που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των τριών θρεπτικών υλικών. Τα μονοκύτταρα που απομονώθηκαν από κάθε μονάδα (μέθοδος απομόνωσης χωρίς εμπλουτισμό) χωρίστηκαν, ανάλογα με τον αριθμό τους σε ένα, δύο ή τρία κλάσματα. Καθένα από αυτά τα κλάσματα καλλιεργήθηκε σε φλάσκες καλλιέργειας επιφάνειας 75cm² με ένα από τα παρακάτω θρεπτικά υλικά: MCM (n=96), α-MEM με 20% FBS (n=76) και α-MEM με 20% CBS (n=56) προκειμένου να μελετηθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού του αλλά και η επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας στα χαρακτηριστικά τους (Πίνακας V-2).

Πίνακας V-2: Χαρακτηριστικά καλλιιεργειών MSC του ομφαλοπλακουντιακού αίματος ανάλογα με το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε

	<i>Θρεπτικό υλικό</i>		
	<i>MCM</i>	<i>FBS</i>	<i>CBS</i>
MSC στις πρωτογενείς καλλιέργειες	Ναι (95% των καλ/ιών)	Ναι (95% των καλ/ιών)	Όχι (96.4% των καλ/ιών)
Ποσοστό MSC στις πρωτογενείς καλλιέργειες (μ.ο, εύρος)	26% (1% - 40%)	43% (15% - 60%)	0% (96.4% των καλ/ιών) 100%(3.6% των καλ/ιών)
Καλλιέργειες με επιτυχή απομόνωση MSC	2.1%	2.6%	3.6%
Ελάχιστος χρόνος για την απομόνωση καθαρού πληθυσμού MSC	30 ημέρες	30 ημέρες	0 μέρες
Passage απομόνωσης καθαρού πληθυσμού MSC (μ.ο, εύρος)	1.5 (1-3)	1.5 (1-2)	0 (καθαρός πληθυσμός MSC από την πρωτογενή καλ/ια)
Μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (PDT) σε ώρες	123,7 ± 22,3	138,5 ± 35,9	187,5±8,9
Μέγιστη διάρκεια καλλιέργειας	80 ημέρες	120 ημέρες	>150 ημέρες

Κύτταρα με μορφολογία χαρακτηριστική των MSCs παρατηρήθηκαν στο 95% των πρωτογενών καλλιιεργειών σε MCM και σε ποσοστό 26% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού (Εικόνα V-10A). Ωστόσο μόλις στο 2,1% των περιπτώσεων

(CB315 και CB343) κατέστη δυνατή η απομόνωσή τους (Εικόνα V-10B) και αυτό έπειτα από 30 ημέρες καλλιέργειας ή 1.5 ανακαλλιέργειες κατά μ.ο. Επιπλέον τα MSCs μπόρεσαν να διατηρηθούν σε MCM μέχρι 80 ημέρες. Ο μέσος χρόνος διπλασιασμού (*Population Doubling Time* – PDT) τους ήταν, για αυτό το διάστημα, $123,7 \pm 22,3$ ώρες γεγονός που μεταφράστηκε σε 15 διπλασιαμούς του πληθυσμού προτού επέλθει νέκρωση των κυττάρων.



Εικόνα V-10: Πρωτογενείς καλλιέργειες MSCs σε MCM, α-MEM με 20% FBS και α-MEM με 20% CBS (A, C και E αντίστοιχα) και οι πληθυσμοί MSCs που προέρχονται από αυτές (B, D και F αντίστοιχως). Στο τελικό στάδιο δεν παρατηρούνται μορφολογικές διαφορές στα κύτταρα. (μεγέθυνση 100x)

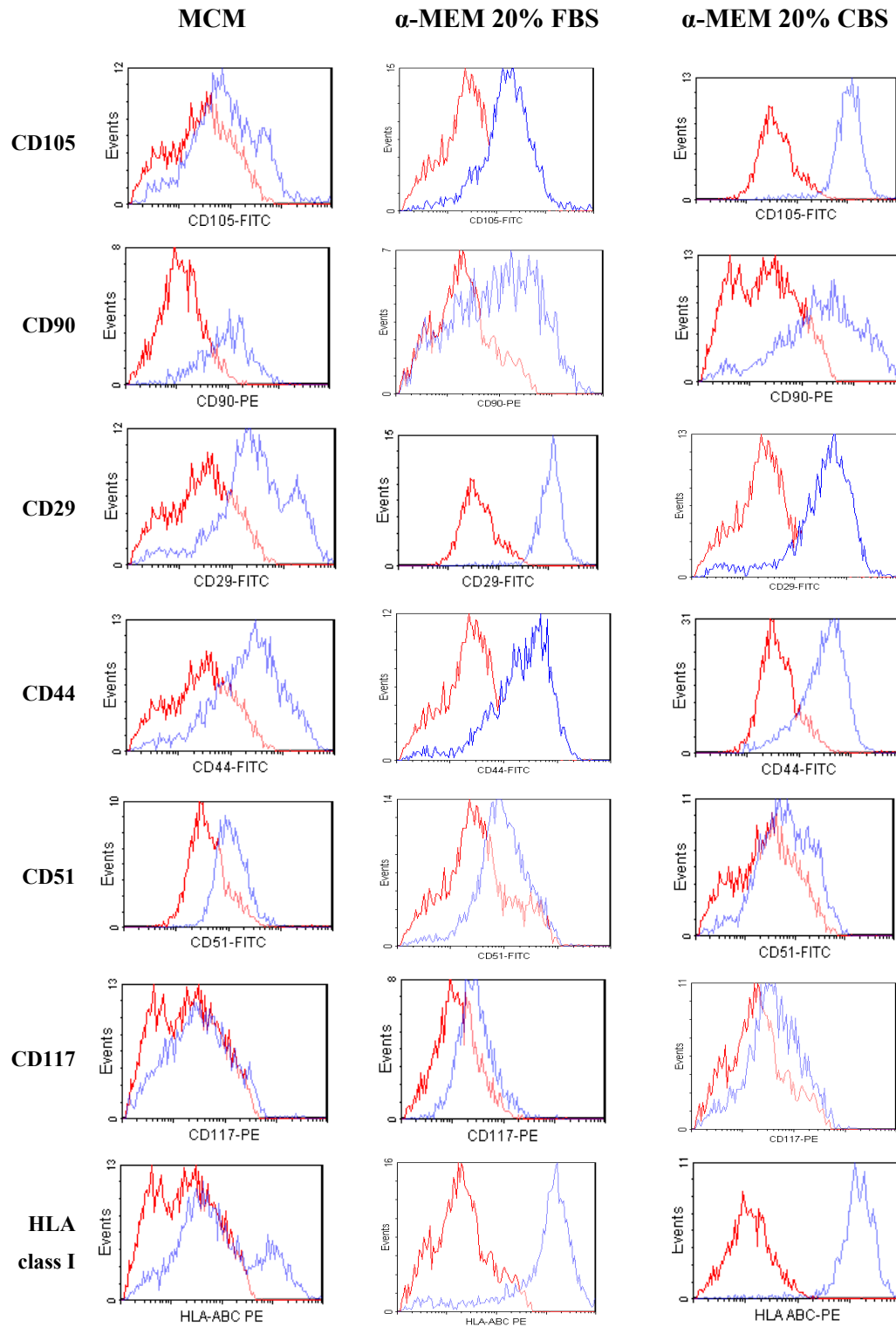
Αντίστοιχα στις πρωτογενείς καλλιέργειες σε α-MEM - 20% FBS, το 43%, κατά μέσον όρο, των κυττάρων είχε μορφολογία MSC στο 95% των περιπτώσεων (Εικόνα V-10C). Χρειάστηκε το ίδιο διάστημα με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε MCM για την απόκτηση καθαρού πληθυσμού MSC (Εικόνα V-10D) σε δύο δείγματα (CB301 και CB355), δηλαδή 30 ημέρες ή 1.5 (μ.ο.) ανακαλλιέργειες. Σε αντίθεση όμως με τις καλλιέργειες σε MCM, αυτές σε α-MEM - 20% FBS διατηρήθηκαν για μεγαλύτερο διάστημα (120 ημέρες) πριν επέλθει κυτταρικός θάνατος και το μέσο PDT των κυττάρων ήταν $138,5 \pm 35,9$ ώρες. Ο πληθυσμός των κυττάρων υπέστη κατά μέσον όρο 20 διπλασιασμούς στις 120 ημέρες.

Από την άλλη πλευρά οι πρωτογενείς καλλιέργειες σε α-MEM με 20% CBS παρουσίασαν τις μεγαλύτερες διαφορές σε σχέση με τις προηγούμενες. Πράγματι μόλις σε δύο (CB326 και CB389) από τις 56 καλλιέργειες (ποσοστό 3,6%) παρατηρήθηκαν MSC. Ωστόσο ο πληθυσμός αυτός ήταν καθαρός από την έναρξή τους (Εικόνα V-10E) και κατέστη δυνατή η διατήρησή του για πλέον των 150 ημερών (Εικόνα V-10F) παρόλο που ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων, ήταν ο μεγαλύτερος απ' όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν με $187,5 \pm 8,9$ ώρες. Ανεξάρτητα από τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, τα MSCs που καλλιεργήθηκαν σε α-MEM - 20% CBS υπέστησαν και αυτά 20 διπλασιασμούς του πληθυσμού τους μέχρι να νεκρωθούν.

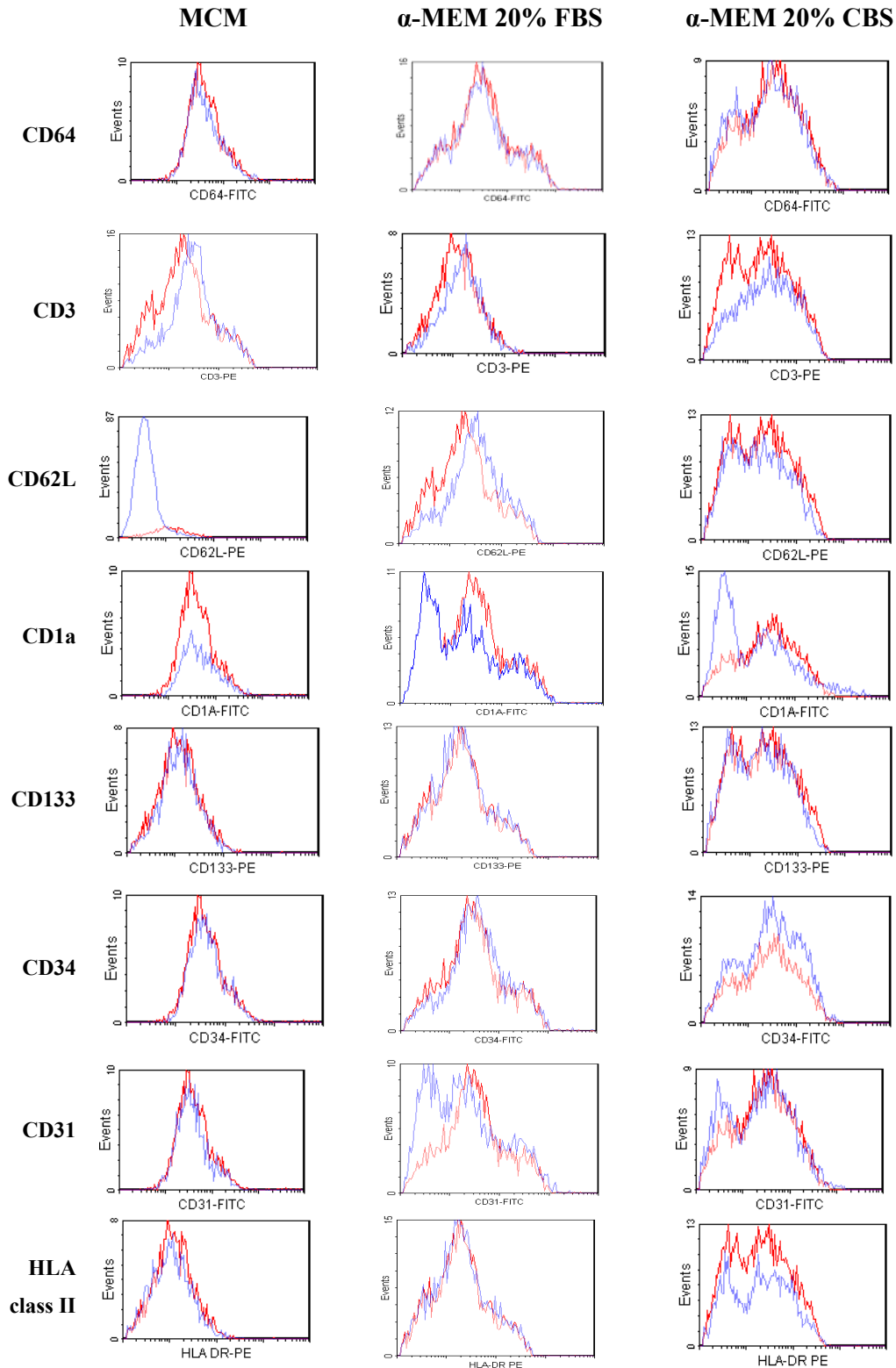
5.2. Στα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων

Περεταίρω ανάλυση των MSC την 30^η ημέρα από την έναρξη της καλλιέργειας, όταν δηλαδή καθαρός πληθυσμός με μορφολογία MSC είχε ληφθεί ανεξαρτήτως του θρεπτικού υλικού, περιελάμβανε τον φαινοτυπικό τους έλεγχο με κυτταρομετρία ροής. Από τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων προέκυψε ότι το θρεπτικό υλικό στο οποίο αυτά καλλιεργήθηκαν είχε μικρή ή καθόλου επίδραση στην έκφραση των δεικτών επιφανείας. Γενικότερα όλα τα κύτταρα ήταν θετικά για τους χαρακτηριστικούς των MSCs δείκτες, CD105, CD 90, CD29, CD44, CD51, CD117 (Εικόνα V-12) καθώς και για τα μόρια του τάξης I μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA class I) ενώ παράλληλα δεν εξέφραζαν αντιγόνα της αιμοποιητικής ή ενδοθηλιακής σειράς (CD64, CD3, CD62L, CD1a, CD133, CD34) αλλά ούτε και τα μόρια του τάξης II μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA class II) (Εικόνα V-13). Παρατηρήθηκαν ωστόσο διαφορές στα ποσοστά έκφρασης κάποιων από τους θετικούς δείκτες αφού τα καλλιεργημένα σε MCM MSCs εξέφραζαν το CD105 σε ποσοστό μόλις 47,75% σε αντίθεση με τα κύτταρα που διατηρήθηκαν σε α-MEM – 20% FBS και σε α-MEM – 20% CBS όπου

το ποσοστό έκφρασης του αντιγόνου ήταν 71,75% και 82,1% αντίστοιχα. Επίσης μειωμένη παρατηρήθηκε η έκφραση του αντιγόνου HLA class I στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε MCM (18,4% θετικά κύτταρα) έναντι των α-MEM – 20% FBS (87,2%) και σε α-MEM – 20% CBS(89,1%). Τέλος διαφορά εμφάνισε το ποσοστό έκφρασης του CD117 ανάλογα με το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε. Με το MCM η έκφρασή του έφτασε το 11,67% ενώ με το α-MEM – 20% FBS και το α-MEM – 20% CBS μετρήθηκε 23,6% και 24,1% αντίστοιχα.



Εικόνα V-12: Σύγκριση των χαρακτηριστικών MSC δεικτών στα MSCs που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, καλλιεργημένων σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά (Οι κόκκινες καμπύλες αντιπροσωπεύουν τον ισοτυπικό έλεγχο)



Εικόνα V-13: Σύγκριση των χαρακτηριστικών αιμοποιητικών δεικτών στα MSCs που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, καλλιεργμένων σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά (Οι κόκκινες καμπύλες αντιπροσωπεύουν τον ισοτυπικό έλεγχο)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ

1. Συλλογή ομφαλίου λώρου

Η συλλογή των ομφαλίων λώρων έγινε παράλληλα με τη συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Συλλέχθηκαν συνολικά 321 ιστοτεμάχια μεγέθους 5cm και τοποθετήθηκαν, το κάθε ένα, σε ξεχωριστό, αποστειρωμένο δοχείο Falcon 50ml. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο έγινε μέσα σε ισοθερμική τσάντα και σε θερμοκρασία 4°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία διατηρήθηκαν μέχρι την επεξεργασία τους, η οποία ξεκίνησε σε λιγότερο από 24 ώρες από τη συλλογή. Τελικά επελέγησαν 20 ομφάλιοι λώροι για την απομόνωση MSCs.

2. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

2.1. Απομόνωση με ενζυματική πέψη του ομφαλίου λώρου

Συνολικά 20 ομφάλιοι λώροι χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυματική απομόνωση MSC (Παράρτημα V). Έπειτα από αφαίρεση των ομφαλικών αγγείων και την ενζυματική πέψη της WJ, απομονώθηκαν κατά μέσον όρο $1,75 \pm 0,94 \times 10^5$ κύτταρα ανά 1cm Ο.Λ. με βιωσιμότητα $83 \pm 17\%$. Τα MSCs χωρίστηκαν σε τέσσερα ίσα μέρη και καλλιεργήθηκαν το καθένα με διαφορετικό θρεπτικό υλικό (εις διπλούν) ώστε να διευκρινιστούν οι ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν το MCM, α-MEM με 10% FBS, α-MEM με 20% FBS και α-MEM με 20% CBS.

2.1.1. Επιλογή θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφαλίου λώρου

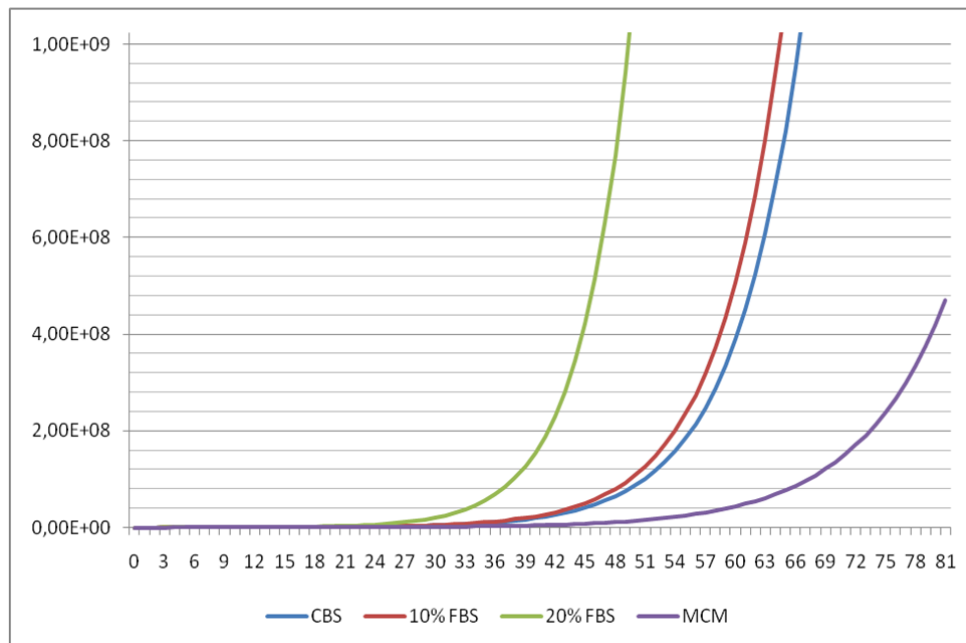
Από τη μελέτη της επίδρασης των θρεπτικών υλικών στην καλλιέργεια MSCs που απομονώθηκαν από τον Ο.Λ. με ενζυματική πέψη προέκυψαν ουσιώδεις διαφορές οι οποίες διακρίνονται στον Πίνακα VI-1. Η σημαντικότερη διαφορά ανάμεσα στα τέσσερα θρεπτικά υλικά που μελετήθηκαν ήταν το ποσοστό επιτυχίας των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα με τη χρήση του MCM καλλιεργήθηκαν επιτυχώς MSCs της WJ (WJ-MSCs) μόνο από το 70% των ομφαλίων λώρων, με το α-MEM με 20% CBS από το 80% των Ο.Λ. ενώ με το α-MEM με 10% ή 20% FBS από το 85% και το 90% των Ο.Λ. αντίστοιχα. Επιπλέον, στις περιπτώσεις όπου κατέστη δυνατή η αρχική καλλιέργεια των WJ-MSCs, η μετέπειτα εξέλιξή τους επηρεάστηκε σε σημαντικό ποσοστό από την επιλογή του θρεπτικού υλικού.

Πίνακας VI-1: Τα κύρια χαρακτηριστικά των καλλιιεργειών WJ-MSCs του Ο.Λ. ανάλογα με το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε.

	Θρεπτικό υλικό			
	MCM	10% FBS	20% FBS	20% CBS
Επιτυχείς καλλιέργειες	70%	85%	90%	80%
Μέση διάρκεια της πρωτογενούς καλλιέργειας	8.5 ημ.	22 ημ.	11 ημ.	17.4 ημ.
Μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (PDT, σε ώρες) στην πρωτογενή καλλιέργεια	116.1±81.2	186.2±80.6	84.4±12.3	121.3±66.6
Μέγιστη διάρκεια καλλιέργειας	26 ημ.	62 ημ.	>90 ημ.	>90 ημ.
Μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (PDT, σε ώρες) μέχρι τη λήξη της καλλιέργειας	147.3±44.1	108.2±52.2	82.48±14.5	111.4±26.8

Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε MCM πολλαπλασιάζονταν με μέσο χρόνο διπλασιασμού τις 116,1±81,2 ώρες στην πρωτογενή καλλιέργεια. Συνολικά μπόρεσαν να διατηρηθούν *in vitro* για 26 μόλις ημέρες πριν επέλθει αναστολή του πολλαπλασιασμού λόγω κυτταρικής γήρανσης. Στο διάστημα αυτό ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού τους ήταν 147,3±44,1 ώρες δηλαδή παρατηρήθηκε επιβράδυνση κατά την εξέλιξη της καλλιέργειας. Το αντίθετο παρατηρήθηκε στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε α-MEM με 10% FBS. Ενώ στις πρωτογενείς καλλιέργειες διπλασιάζονταν κατά μέσον όρο κάθε 186,2.3±80,6 ώρες στη συνέχεια ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους επιταχύνθηκε σημαντικά ώστε στις 62 ημέρες που διήρκησε η καλλιέργειά τους το μέσο PDT ήταν 108,2±52,2. Πιο σταθερός ήταν ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των WJ-MSCs στο α-MEM με 20% FBS. Τόσο στις πρωτογενείς καλλιέργειες, όσο και για το συνολικό διάστημα που τα κύτταρα διατηρήθηκαν *in vitro* (πλέον των τριών μηνών) πολλαπλασιάζονταν με ταχείς ρυθμούς και μέσα PDT 84,4±12,3 και 82,48±14,5 ώρες αντίστοιχα. Τέλος οι καλλιέργειες WJ-MSCs σε α-MEM με 20% CBS παρουσίασαν, βραδύτερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού σε σχέση με αυτές σε α-MEM με 20% FBS, αφού τα PDT στις πρωτογενείς καλλιέργειες και στη συνολική διάρκεια της επέκτασης των

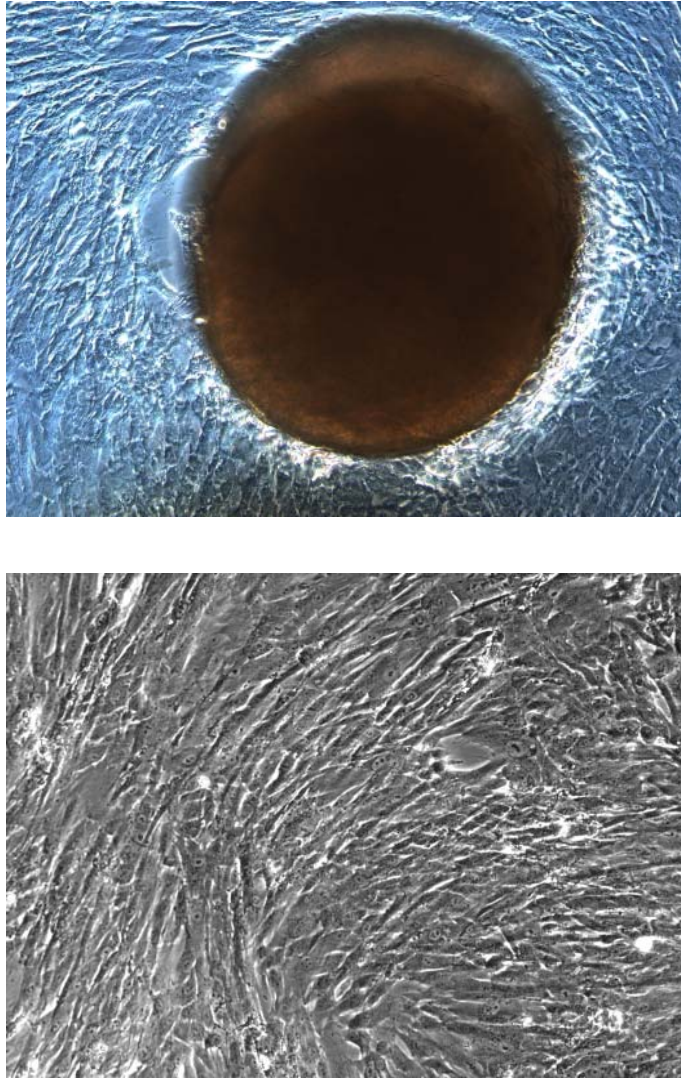
κυττάρων ήταν $121,3 \pm 66,6$ και $111,4 \pm 26,8$ αντίστοιχα αλλά μπόρεσαν και αυτές να διατηρηθούν για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών. Με βάση τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη την ταχύτητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων διαπιστώθηκε ότι, αν είχαν ξεκινήσει όλες οι καλλιέργειες με τον ίδιο αρχικό πληθυσμό (50.000 κύτταρα,) μόνο αυτές που πραγματοποιήθηκαν σε FBS θα μπορούσαν να αποδώσουν μεγάλο αριθμό κυττάρων σε σχετικά γρήγορο χρονικό



Εικόνα VI-1: Θεωρητικές καμπύλες αύξησης του αριθμού των κυττάρων ανάλογα με το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε. Θεωρήθηκε ότι όλες οι καλλιέργειες ξεκίνησαν με τον ίδιο αρχικό αριθμό MSCs (50.000) και οι καμπύλες υπολογίστηκαν βάση του μέσου ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PDT) όπως μετρήθηκε στη διάρκεια των πειραμάτων. (Στον άξονα των y ο αριθμός των κυττάρων και στον x ο χρόνος σε ημέρες)

διάστημα με το 10% FBS να είναι οριακά καλύτερο από το CBS (Εικόνα VI-1).

Σε μια προσπάθεια να διατηρηθούν αφενός τα πλεονεκτήματα των καλλιεργειών σε α-MEM με 20% FBS, δηλαδή ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η δυνατότητα διατήρησής τους σε καλλιέργεια για μεγάλα χρονικά διαστήματα, αλλά να περιοριστεί, αφετέρου η έκθεσή τους σε ζωικό ορό στο ελάχιστο δυνατόν, για τη συνέχεια των πειραμάτων επελέγη η χρήση θρεπτικού υλικού α-MEM με 15% FBS.



Εικόνα VI-2: Α. (επάνω) Ιστοκαλλιέργεια ιστοτεμαχίου Ο.Λ. Διακρίνονται τα κύτταρα που μεταναστεύουν στο πλαστικό υπόστρωμα Β. (κάτω) WJ- MSCs από τις ιστοκαλλιέργειες μετά τη μεταφορά τους σε φλάσκα (Μεγέθυνση 100x).

2.2. Απομόνωση με ιστοκαλλιέργειες του ομφαλίου λώρου

Αφού διαπιστώθηκε η δυνατότητα απομόνωσης των MSC από τον Ο.Λ. με ενζυματική πέψη και ελέγχθηκε η καταλληλότητα διάφορων θρεπτικών υλικών, στη συνέχεια, μελετήθηκε και εναλλακτικός τρόπος απομόνωσης με σκοπό, αφενός τη μείωση του κόστους, αφετέρου τη βελτίωση της ποιότητας των λαμβανομένων κυττάρων. Για την απομόνωση WJ-MSC μέσω των ιστοκαλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκαν ιστοτεμάχια μεγέθους 2-3 mm³ της WJ από 10 διαφορετικούς Ο.Λ. (Παράρτημα V). Μετά από 12 ημέρες τα κύτταρα που είχαν προσκολληθεί στο πλαστικό υπόστρωμα (Εικόνα VI-2Α) αποκολλήθηκαν και μετρήθηκαν προκειμένου

να καλλιεργηθούν. Με αυτόν τον τρόπο $3,02 \pm 0,66 \times 10^5$ MSC, μέσης βιωσιμότητας $93 \pm 5\%$ απομονώθηκαν ανά cm O.Λ. τα οποία καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας με α-MEM με 15% FBS (Εικόνα VI-2B).

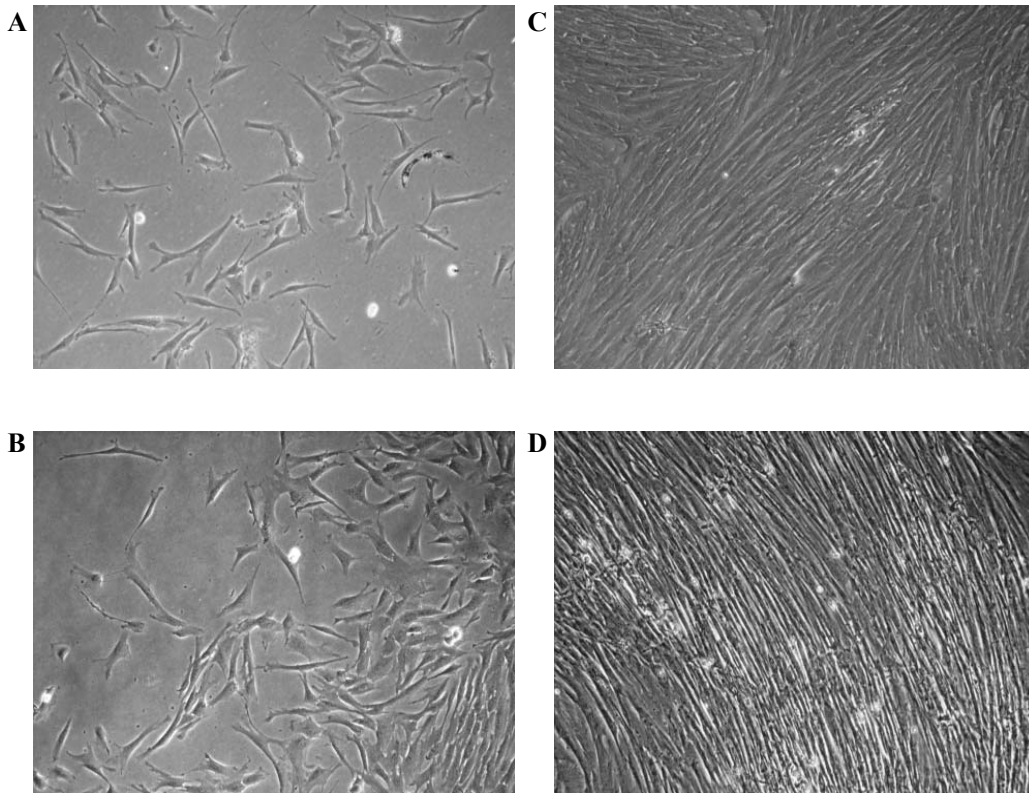
Πίνακας VI-2: Τα κύρια χαρακτηριστικά των πρωτογενών καλλιιεργειών MSCs του O.Λ. ανάλογα με τη μέθοδο απομόνωσης

	<i>Μέθοδος Απομόνωσης</i>	
	<i>Ενζυματική Πέψη</i>	<i>Ιστοκαλλιέργειες</i>
n	10	10
Απομονωμένα κύτταρα ανά cm O.Λ.	$1.75 \pm 0.94 \times 10^5$	$3.02 \pm 0.66 \times 10^5$
Βιωσιμότητα κυττάρων	$83 \pm 17\%$	$93 \pm 5\%$
% καλλιιεργειών όπου παρατηρήθηκε ανάπτυξη των κυττάρων (n)	100% (10)	100% (10)
Μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (PDT σε h)	$141.30 \pm 43.45^*$	$87.22 \pm 19.28^*$ ($p=0.0120$)
Τελική απόδοση	$3.42 \pm 1.8 \times 10^6$	$4.57 \pm 1.9 \times 10^6$

2.3. Σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο

Καθότι προέκυψαν τελικά δύο μέθοδοι απομόνωσης των WJ-MSCs, κρίθηκε απαραίτητη η σύγκριση των κυττάρων που απομονώθηκαν με αυτές. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες και όπως φαίνεται από τον Πίνακα VI-2, και στις δύο περιπτώσεις όλες οι καλλιέργειες ήταν επιτυχείς. Στις πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων που απομονώθηκαν με ενζυματική πέψη (*Primoculture of isolation method I WJ-MSCs, P-I WJ-MSCs*) όσο και σε αυτές των MSCs που απομονώθηκαν με ιστοκαλλιέργειες (*Primoculture of isolation method II WJ-MSCs, P-II WJ-MSCs*) μπορούσαν να διακριθούν, από την 5^η κιόλας ημέρα, κύτταρα με μορφολογία μεσεγχυματικών κυττάρων (Εικόνα VI-3A και B αντίστοιχα). Όταν τα

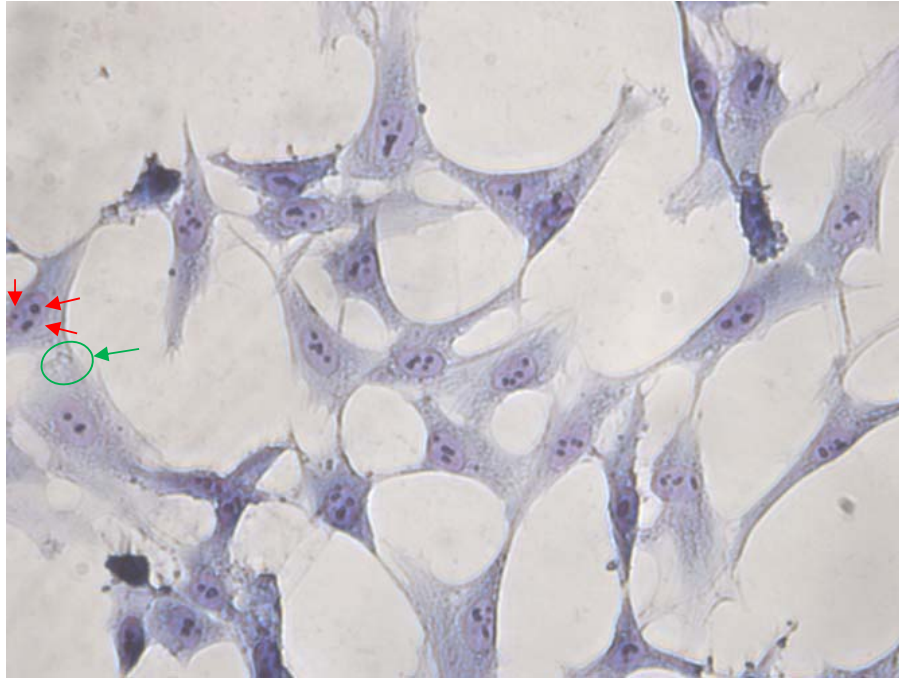
κύτταρα αυτά χρώστηκαν με Giemsa (Εικόνα VI-4A για τα P-I WJ-MSCs και B για τα P-II WJ-MSCs) έγινε εμφανές το ατρακτοειδές ή ελαφρώς αστεροειδές τους σχήμα με έντονες κυτταρικές προεκβολές (*cell processes*) που έρχονταν σε επαφή με τα γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα κυψελοειδές δύκτιο. Οι πυρήνες ήταν μεγάλοι σε κεντρική θέση στο κύτταρο, με έντονα κεχρωσμένους και πολλούς πυρηνίσκους ενώ στο κυτταρόπλασμα εμφανίζονταν μικρά λιπιδικά έγκλειστα, δείγμα του ενεργούς κυτταρικού μεταβολισμού. Τόσο τα P-I όσο και τα P-II WJ-MSCs πολλαπλασιάζονταν, με αποτέλεσμα η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας να αγγίζει το 90% σε 20 ημέρες και 10 ημέρες, αντίστοιχα (Εικόνα VI-3C και D αντίστοιχα).



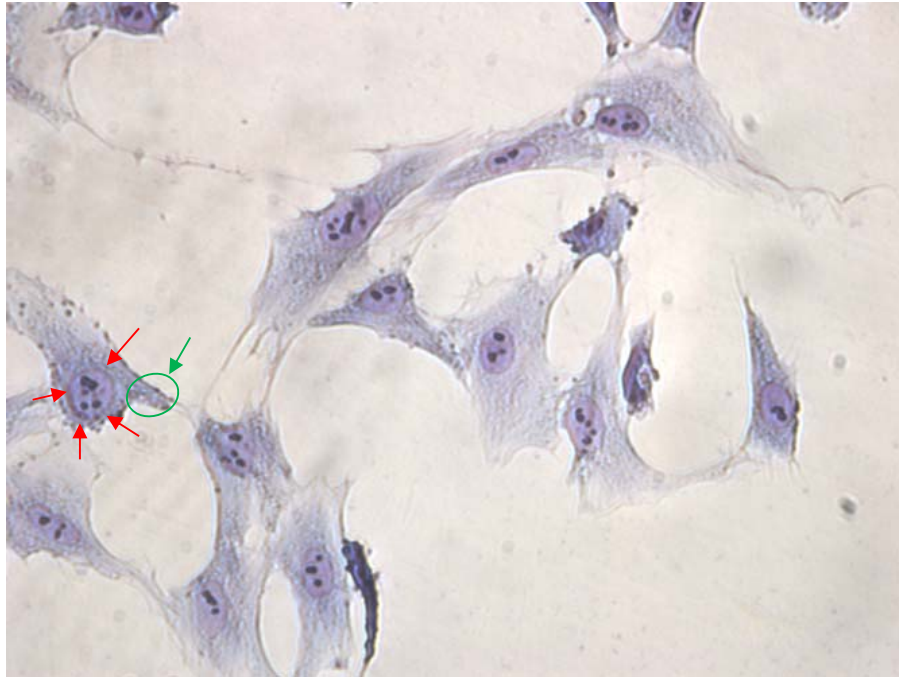
Εικόνα VI-3: Στις πρωτογενείς καλλιέργειες που προήλθαν από ενζυματική απομόνωση και ιστοκαλλιέργειες (A και B αντίστοιχα) εμφανίστηκαν προσκολλημένα κύτταρα με μορφολογία αντίστοιχη των MSCs από την 5η κιόλας μέρα. Η μορφολογία αυτή διατηρήθηκε κι όταν η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας ξεπέρασε το 90% (C τα κύτταρα της ενζυματικής πένης και D τα κύτταρα των ιστοκαλλιεργειών) (Μεγέθυνση 100x)

Η χρώση με Giemsa (Εικόνα VI-4C για τα P-I WJ-MSCs και D για τα P-II WJ-MSCs) έδειξε ότι τα κύτταρα είχαν αποκτήσει μια πιο επιμήκη μορφολογία, διατηρώντας το ατρακτοειδές σχήμα και το μεγάλο πυρήνα με πολλούς και έντονα κεχρωσμένους πυρηνίσκους. Ο όγκος του κυτταροπλάσματος είχε περιοριστεί σε σχέση με τον όγκο του πυρήνα, παρόλ' αυτά αρκετά λιπιδικά έγκλειστα ήταν ακόμα ορατά. Η *ex vivo* επέκταση των κυττάρων διατηρήθηκε πλέον των 90 ημερών ωστόσο στα P-I WJ-MSCs ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ήταν βραδύτερος, με μέσο PDT $141,30 \pm 43,45$ ώρες σε αντίθεση με τα P-II WJ-MSC που το μέσο PDT ήταν $87,22 \pm 19,28$ ώρες ($p=0.0120$). Στη συνέχεια τα κύτταρα των πρωτογενών καλλιιεργειών των δύο πρωτοκόλλων απομόνωσης χρησιμοποιήθηκαν για φαινοτυπικούς και λειτουργικούς ελέγχους.

Α

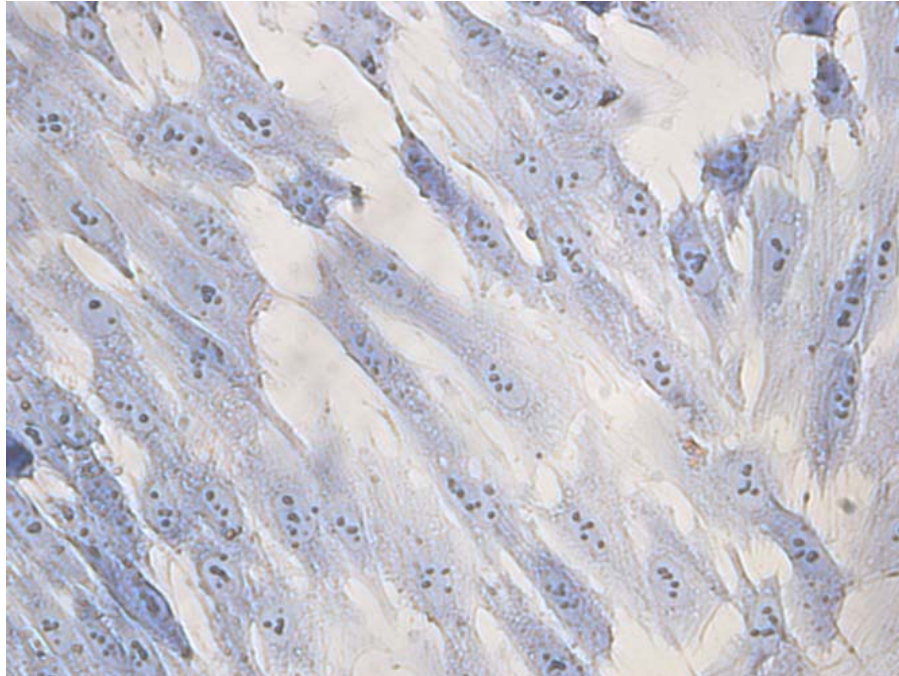


Β

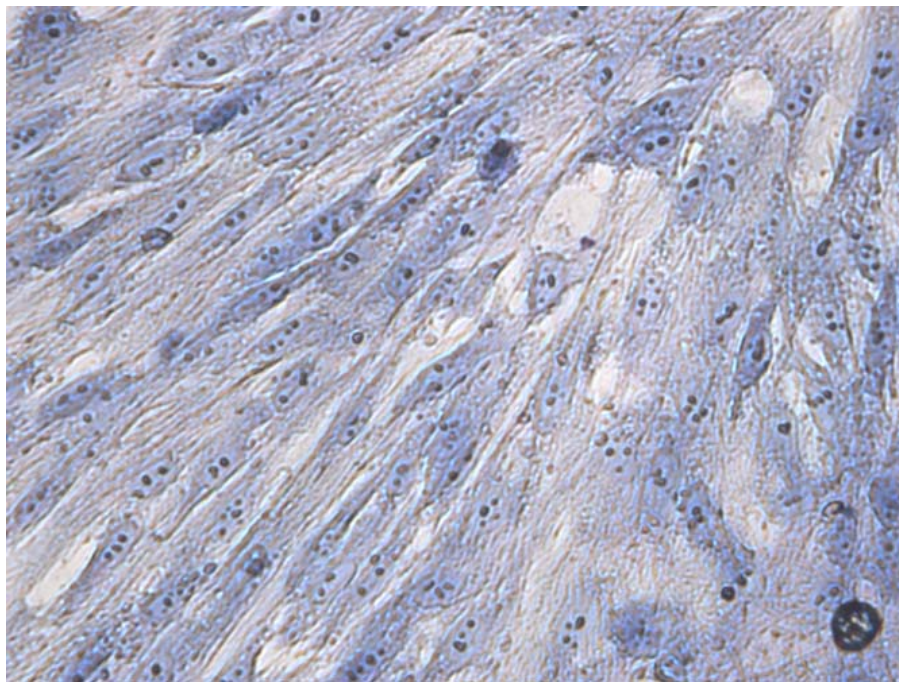


Εικόνα VI-4: Η χρώση των P-I (Α) και P-II WJ-MSC (Β) με Giemsa την 5^η ημέρα καλλιέργειας, έδειξε κύτταρα με ατρακτοειδή ή αστεροειδή μορφή, σε επαφή μεταξύ τους μέσω κυτταροπλασματικών προεκβολών. Τα κύτταρα είχαν μεγάλους πυρήνες με πολλούς και έντονα κεχρωσμένους πυρηνίσκους (κόκκινα βέλη), ενώ το κυταρόπλασμα ήταν λεπτό με λιπιδικά έγκλειστα (πράσινα βέλη). (Μεγένθυση 400x)

C

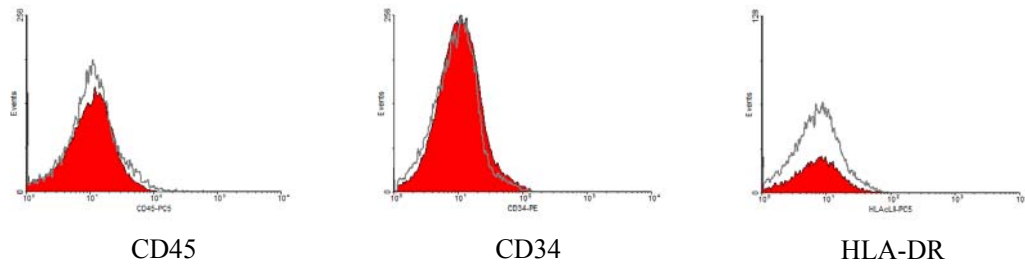


D

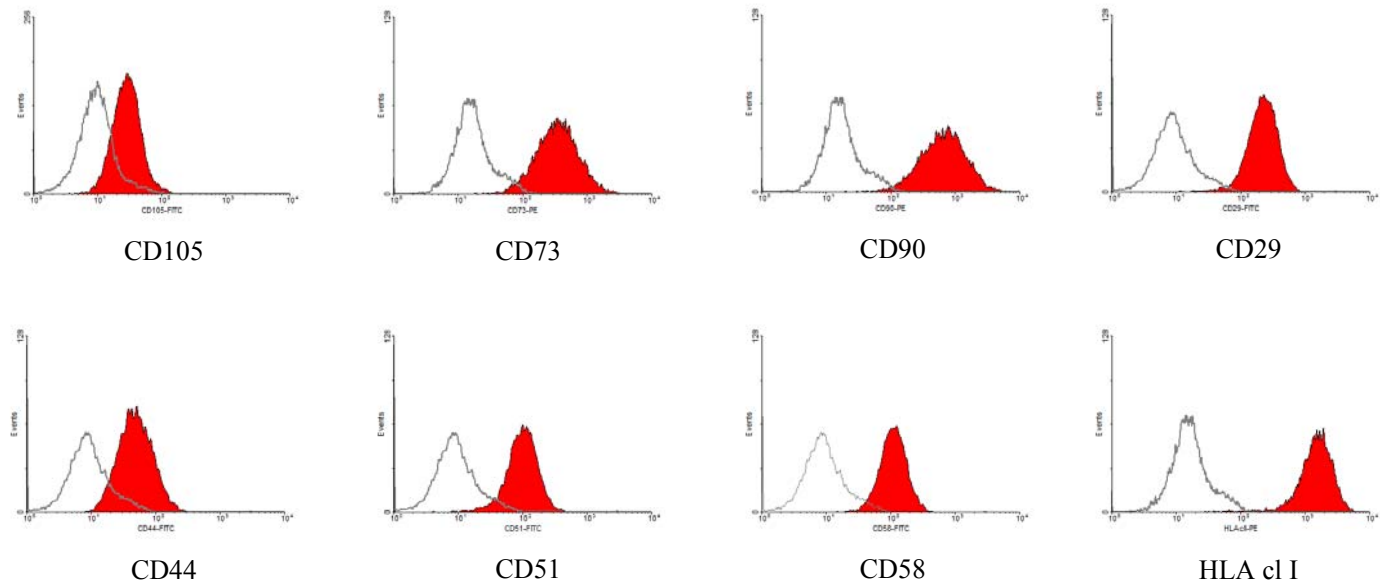


Εικόνα VI-4 (συνέχεια): Όταν η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας έφτασε στο 90%, τα P-I (C) και P-II WJ-MSC (D) διατήρησαν τα χαρακτηριστικά τους (μεγάλοι πυρήνες με πυρηνίσκους και κυτταρόπλασμα με λιπδικά έγκλειστα) ενώ είχαν πάρει μια πιο επιμήκη μορφή. (Χρώση Giemsa – μεγένθυση 400x)

(A)



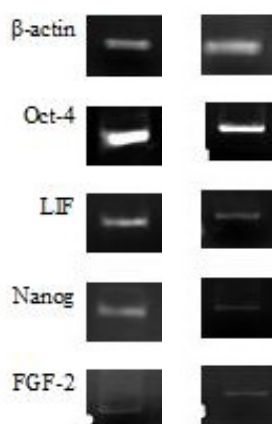
(B)



Εικόνα VI-5: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής στα P-I και P-II WJ-MSCs. Τα MSCs του του ομφαλίου λώρου, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που επιλέχθηκε για την απομόνωσή τους βρέθηκαν αρνητικά για τους αιμοποιητικούς δείκτες (A) και θετικά για τους δείκτες των μεσεγχυματικών κυττάρων (B). (Οι γκριζες καμπύλες αντιπροσωπεύουν τον ισοτυπικό έλεγχο)

2.3.1. Επίδραση της μεθόδου απομόνωσης στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων

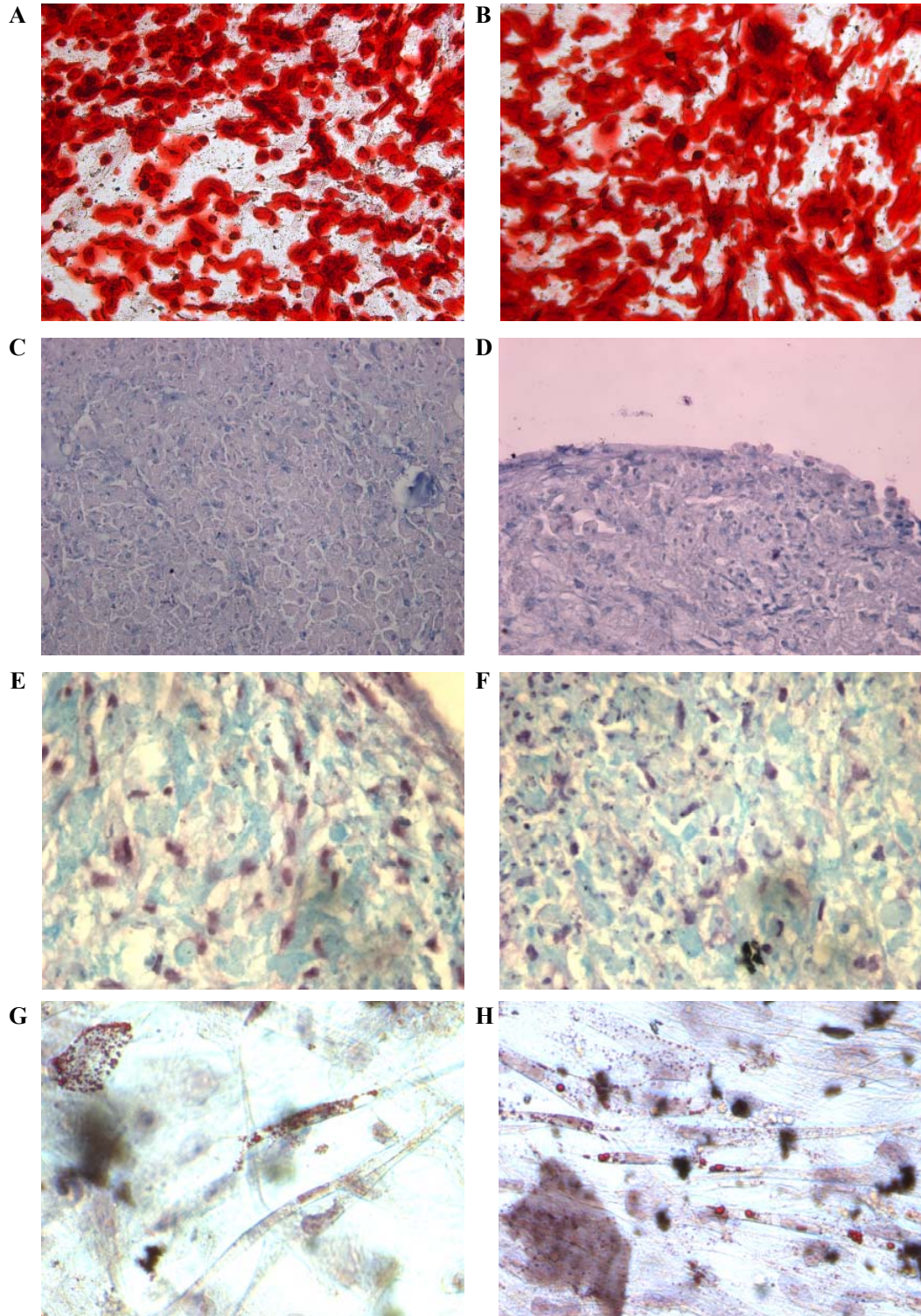
Προκειμένου να διαπιστωθούν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων των πρωτογενών καλλιιεργειών του ομφαλίου λώρου, μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής καθώς και με RT-PCR. Από την εξέταση του ανοσοφαινότυπου δεν προέκυψαν διαφορές ανάμεσα στα κύτταρα που απομονώθηκαν με ενζυματική πέψη και σε αυτά που απομονώθηκαν από τις ιστοκαλλιέργειες. Όλα τα κύτταρα ήταν θετικά για τους δείκτες των μεσεγχυματικών κυττάρων (CD105, CD90, CD73, CD58, CD51, CD29 και CD44) και για το μόριο HLA τάξης I και αρνητικά για τα αντιγόνα αιμοποιητικών κυττάρων (CD45, CD34 και HLA τάξης II) (Εικόνα VI-5A και B). Παράλληλα η έκφραση των γονιδίων βλαστικών κυττάρων *Oct-4*, *Nanog*, *LIF* και *FGF* ήταν θετική για όλα τα MSC του Ο.Λ. ανεξαρτήτως της μεθόδου απομόνωσης (Εικόνα VI-6).



Εικόνα VI-6: Τα MSC του Ο.Λ. που απομονώθηκαν με ενζυματική πέψη, P-I WJ-MSCs (αριστερά) και ιστοκαλλιέργειες, P-II WJ-MSCs (δεξιά) εξέφραζαν τα γονίδια βλαστικών κυττάρων

2.3.2. Επίδραση της μεθόδου απομόνωσης στις ιδιότητες των κυττάρων

Πέρα από την επίδραση της μεθόδου απομόνωσης στα χαρακτηριστικά των καλλιιεργειών και στο φαινότυπο των WJ-MSCs, μελετήθηκε και η επίδρασή της στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Κατόπιν επαγωγής της διαφοροποίησης των WJ-MSCs δεν διαπιστώθηκαν διαφορές, είτε αυτά είχαν απομονωθεί με ενζυματική πέψη είτε με ιστοκαλλιέργειες. Πράγματι τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε οστεοκύτταρα (Εικόνα VI-7A και B αντίστοιχα) και χονδροκύτταρα (Εικόνα VI-7C και D αντίστοιχα ή Εικόνα VI-7E και F) με την ίδια ευκολία ανεξάρτητα της μεθόδου απομόνωσης ενώ διαπιστώθηκε δυσκολία στην διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα αφού μετά από 21 ημέρες επαγωγής παρουσίασαν περιορισμένο αριθμό λιπιδικών εγκλείστων (Εικόνα

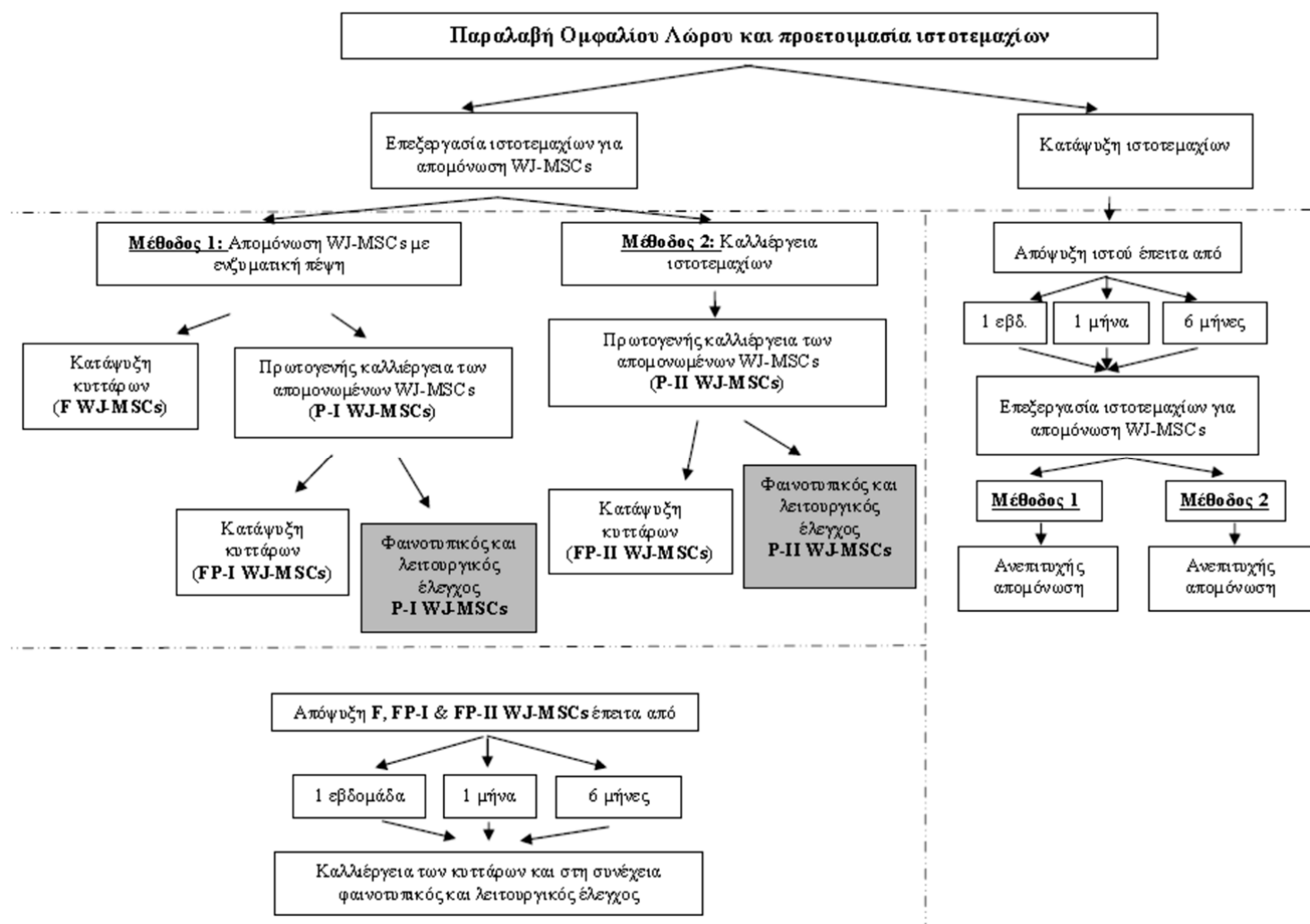


Εικόνα VI-7: Διαφοροποίηση P-I και P-II WJ-MSCs. Η χρώση με Alizarin Red-S έδειξε την παρουσία Ca^{2+} στον εξωκυττάριο χώρο (A και B αντίστοιχα) (μεγέθυνση 200x) ενώ η χρώση με Toluidine blue (C και D αντίστοιχα) (μεγέθυνση 200x) ή Alcian blue (E και F αντίστοιχα) (μεγέθυνση 600x). σε τομές κυτταρικής μικρομάζας έδειξε διαφοροποίηση σε χονδροκύτταρα. Ωστόσο μόνο μικρή παρουσία λιπιδίων φάνηκε από τη χρώση με Oil-Red-O (G και H αντίστοιχα) έπειτα από 21 ημέρες επαγωγής σε υλικό χονδρογένεσης. (Μεγέθυνση 600x)

VI-7G και H αντίστοιχα) όπως ακριβώς και τα αδιαφοροποίητα κύτταρα.

2.4. Απομόνωση από κατεψυγμένο ομφάλιο λώρο

Έπειτα από την επιτυχή απομόνωση WJ-MSCs από τον ομφάλιο λώρο, διερυνήθηκε η δυνατότητα απομόνωσής τους από ιστοτεμάχια που είχαν καταψυχθεί και αποψυχθεί μια εβδομάδα, ένα μήνα ή έξι μήνες αργότερα. Δοκιμάστηκαν τόσο η ενζυματική μέθοδος όσο και η μέθοδος των ιστοκαλλιιεργειών, χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί απομόνωση κυττάρων.



Εικόνα VI-8: Σχηματική αναπαράσταση του σχεδιασμού για τη μελέτη της κρυοκατάψυξης των MSCs του ομφαλίου λώρου

3. Κατάψυξη Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου

Ένας από τους κεντρικούς σκοπούς της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της κρυοσυντήρησης στα WJ-MSCs, αλλά και να διαπιστωθούν οι ιδανικότερες συνθήκες για την κατάψυξη τους (Παράρτημα V). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό ελήφθη υπόψη και η μέθοδος με την οποία απομονώθηκαν τα κύτταρα. Για το λόγο συγκρίθηκαν τρεις κατηγορίες κατεψυγμένων κυττάρων:

- κύτταρα που απομονώθηκαν με ενζυματική πέψη του ομφαλίου λώρου και καταψύχθηκαν, χωρίς να έχουν καλλιεργηθεί για να αποψυχθούν μετά από 1 εβδομάδα, 1 μήνα ή 6 μήνες (*Frozen WJ-MSCs*, *F WJ-MSCs*).
- κύτταρα που απομονώθηκαν με την ίδια μέθοδο καλλιεργήθηκαν και τα κύτταρα από αυτές τις πρωτογενείς καλλιέργειες (*P-I WJ-MSCs*) καταψύχθηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα (*Frozen Primoculture of isolation method I WJ-MSCs*, *FP-I WJ-MSCs*).
- κύτταρα από πρωτογενείς καλλιέργειες WJ-MSCs που απομονώθηκαν με ιστοκαλλιέργειες (*P-II WJ-MSCs*), καταψύχθηκαν (*Frozen Primoculture of isolation method II WJ-MSCs*, *FP-II WJ-MSCs*). (Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι, για τα WJ-MSCs που απομονώθηκαν με ιστοκαλλιέργειες, η ιστοκαλλιέργεια θεωρείται φάση της απομόνωσης και πρωτογενής καλλιέργεια αυτή που την ακολουθεί).

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν η κινητική των καλλιεργειών, ο φαινότυπος και η δυνατότητα διαφοροποίησης. Η Εικόνα VI-8 περιγράφει την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε.

3.1. Χαρακτηριστικά καλλιεργειών κρυοσυντηρημένων κυττάρων

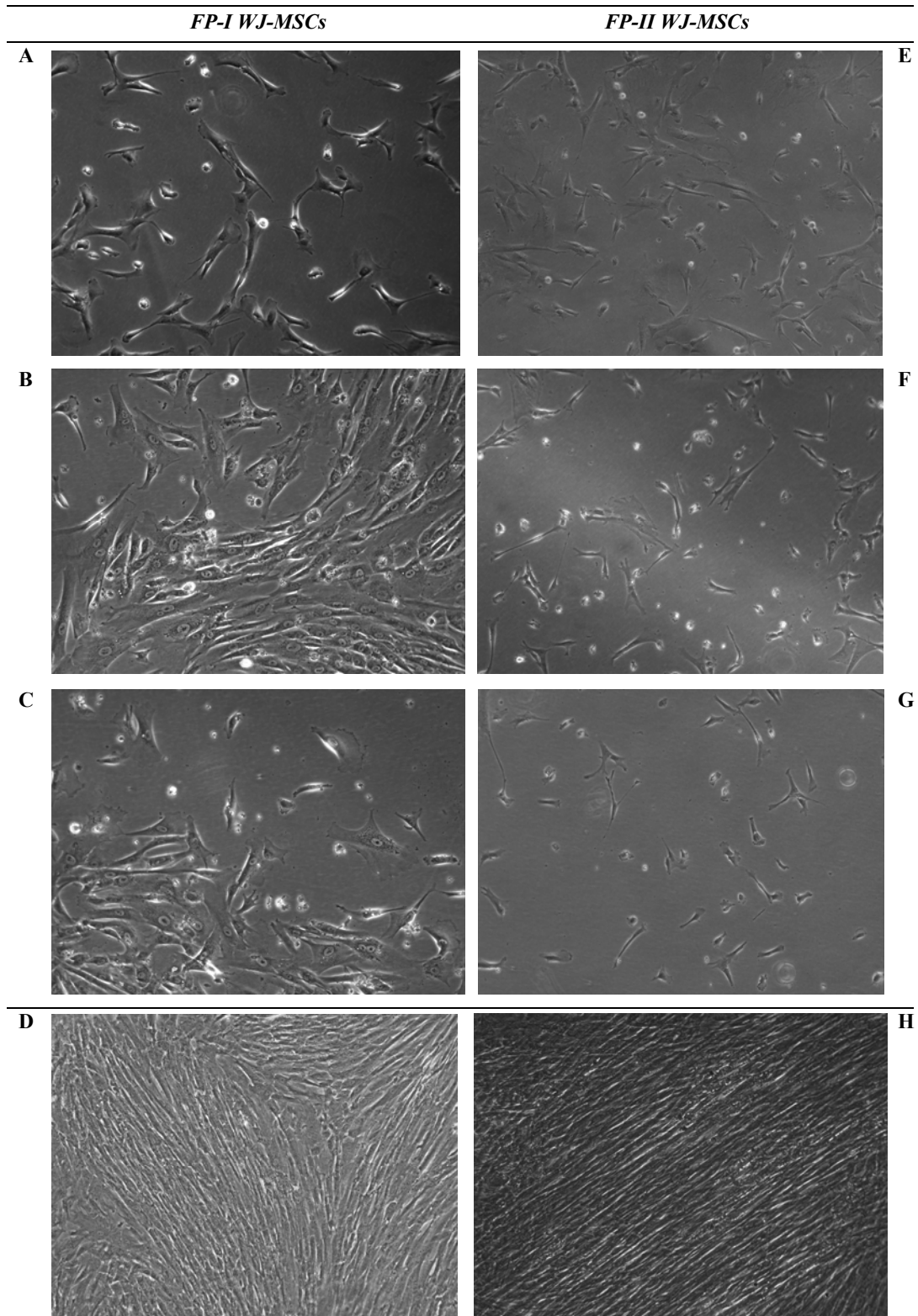
Τα κρυοσυντηρημένα WJ-MSCs αποψύχθηκαν έπειτα από 1 εβδομάδα, 1 μήνα και έξι μήνες και καλλιεργήθηκαν. Αρχικά μετρήθηκε η βιωσιμότητα των αποψυγμένων κυττάρων, όπου παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί πριν την κατάψυξη και αυτά που καταψύχθηκαν αμέσως μετά την ενζυματική πέψη του Ο.Λ. (Πίνακας VI-3) Έτσι ενώ τα FP-I και FP-II WJ-MSCs είχαν υψηλή βιωσιμότητα ($75\pm 21\%$ και $71\pm 17\%$ έπειτα από 1 εβδομάδα, $81\pm 12\%$ και $73\pm 25\%$ έπειτα από 1 μήνα, $79\pm 16\%$ και $83\pm 16\%$ έπειτα από 6 μήνες κρυοκατάψυξης αντίστοιχα) δεν συνέβη το ίδιο και για τα F WJ-MSCs ($53\pm 19\%$ έπειτα από 1 εβδομάδα, $62\pm 25\%$ έπειτα από 1 μήνα και $49\pm 22\%$ έπειτα

από 6 μήνες κρυοσυντήρησης). Επιπλέον τα FP-I και τα FP-II WJ-MSCs καλλιιεργήθηκαν επιτυχώς, ανεξαρτήτως από τη διάρκεια παραμονής τους στο υγρό

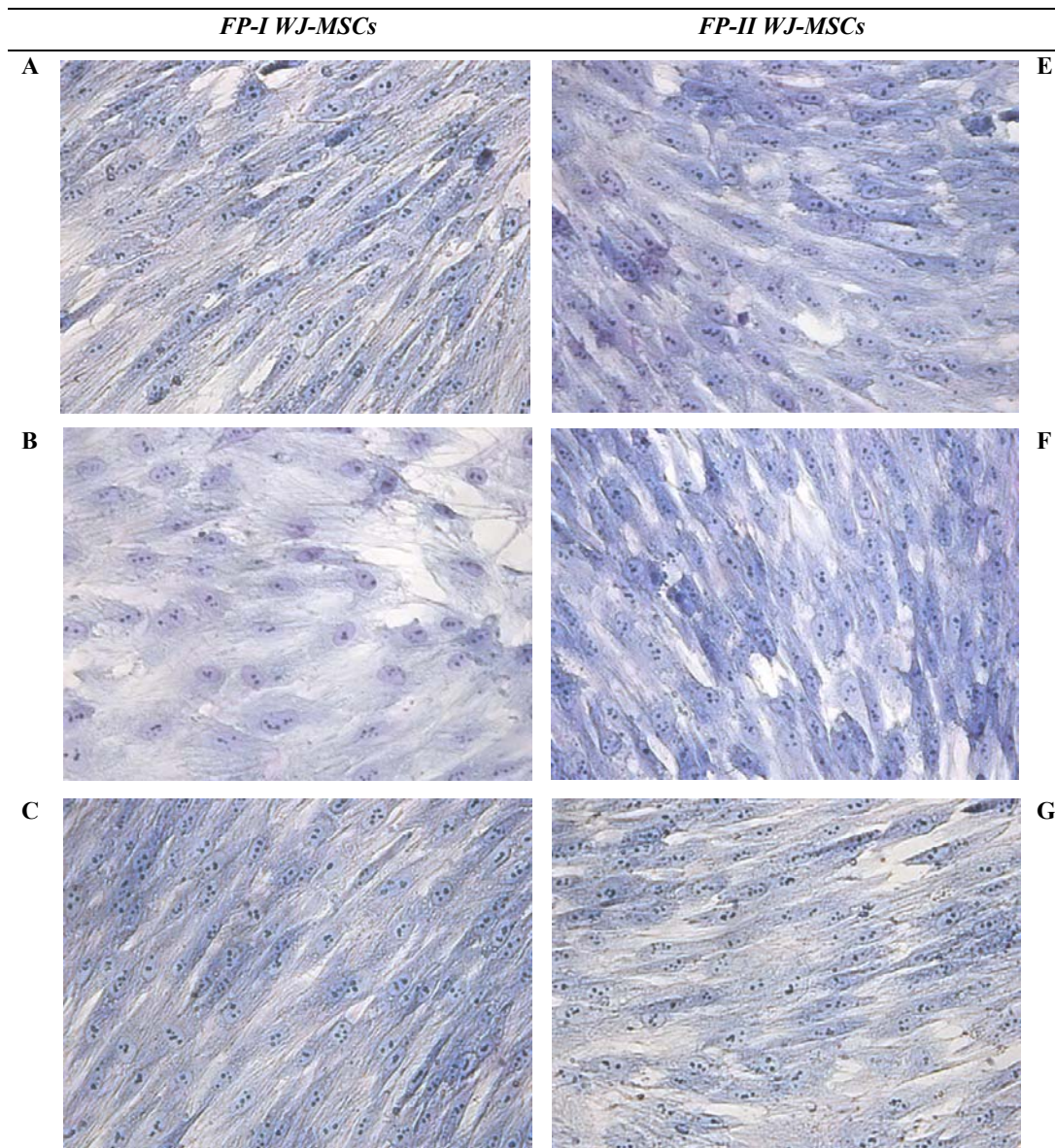
Πίνακας VI-3: Συγκριτικά χαρακτηριστικά των «φρέσκων» (P-I και P-II) και κρυοσυντηρημένων (FP-I, FP-II και F) WJ-MSCs. Δεν παρατηρήθηκαν καθόλου διαφορές ανάμεσα στα κρυοσυντηρημένα MSCs, είτε αυτά προήλθαν από τις πρωτογενείς καλλιέργειες της ενζυματικής πέψης (FP-I MSCs), είτε από τις πρωτογενείς καλλιέργειες των ιστοκαλλιιεργειών (FP-II MSCs). Επιπλέον τα P-I MSCs δείχνουν να μην επηρεάστηκαν από την κρυοκατάψυξη αφού παρουσιάζουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα FP-I MSCs. Μικρές διαφορές παρατηρήθηκαν στο PDT των FP-II MSCs σε σχέση με τις προ-κατάψυξης καλλιέργειες P-II MSCs PDTs ($p=0.021$, $p=0.028$ και $p=0.011$ για διάρκεια κρυοσυντήρησης 1 εβδομάδας, 1 μήνα και 6 μηνών αντίστοιχα)*. Αντίθετα τα αποτελέσματα των F-MSCs δεν ήταν αντίστοιχα με αυτά των άλλων καλλιιεργειών και δεν επέτρεψαν περαιτέρω ανάλυση.

Διάρκεια κρυοσυντήρησης	Πριν την κατάψυξη	Αποψυγμένα κύτταρα		
	<i>P-I MSCs</i>	<i>FP- I MSCs 1εβδομάδας</i>	<i>FP- I MSCs 1μήνα</i>	<i>FP- I MSCs 6 μηνών</i>
n	10	10	10	10
Βιωσιμότητα	83 ± 17%	75 ± 21%	81 ± 12%	79 ± 16%
% καλ/γίων με ανάπτυξη (n)	100% (10)	100% (10)	100% (10)	100% (10)
PDT (hr)	141,30 ± 43,45	123,06 ± 46,16	121,25 ± 2,40	148,63 ± 25,40
Διάρκεια κρυοσυντήρησης	<i>P-II MSCs</i>	<i>FP- II MSCs 1εβδομάδας</i>	<i>FP- II MSCs 1μήνα</i>	<i>FP- II MSCs 6 μηνών</i>
n	10	10	10	10
Βιωσιμότητα	93 ± 5%	71±17%	73 ± 25%	83 ± 16%
% καλ/γίων με ανάπτυξη (n)	100% (10)	100% (10)	100% (10)	100% (10)
PDT (hr)	87,22 ± 19,28	134,43 ± 45,50*	127,80 ± 26,41*	143,41 ± 46,69*
Διάρκεια κρυοσυντήρησης	<i>Ακαλλιέργητα MSC από ενζ. πέψη</i>	<i>F MSCs 1εβδομάδας</i>	<i>F MSCs 1μήνα</i>	<i>F MSCs 6 μηνών</i>
n	10	10	10	10
Βιωσιμότητα	83 ± 17%	53 ± 19%	62 ± 25%	49 ± 22%
% καλ/γίων με ανάπτυξη (n)	Όχι καλ/για	10% (1)	0% (0)	10% (1)
PDT (hr)	Όχι καλ/για	209,27	NA	259,88

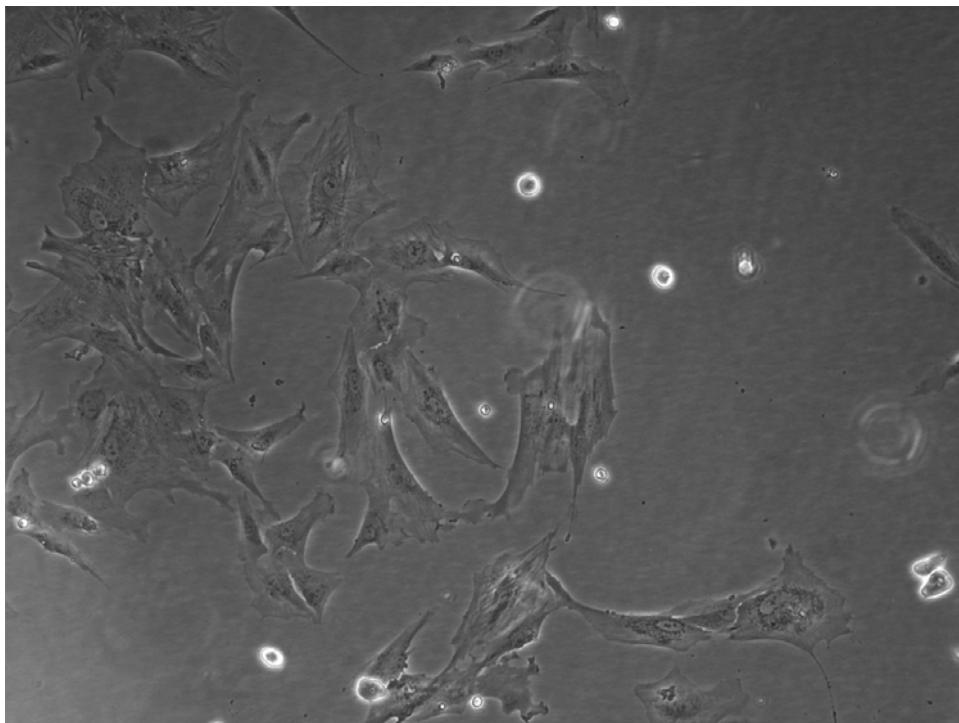
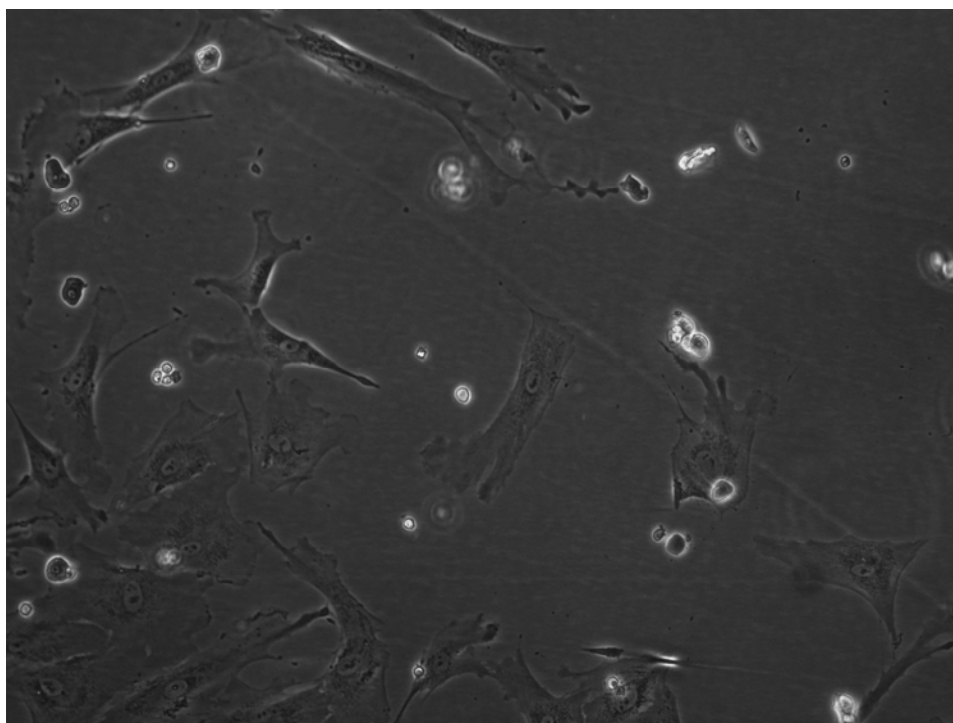
άζωτο και πολλαπλασιάζονταν με συγκρίσιμα PDT (Πίνακας VI-3). Από την 5^η κιόλας ημέρα, μπορούσαν να διακριθούν κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία MSCs προσκολλημένα στην πλαστική επιφάνεια καλλιέργειας των κρυοσυντηρημένων για 1 εβδομάδα, 1 μήνα και 6 μήνες FP-I WJ-MSCs (Εικόνα VI-9A έως C) ή FP-II WJ-MSCs (Εικόνα VI-9E έως G). Η μορφολογία αυτή διατηρήθηκε καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, ακόμα και όταν τα κύτταρα σχημάτισαν ταπήτιο, καλύπτοντας όλη την επιφάνεια της φλάσκας (Εικόνα VI-8D και H). Με τη χρώση των κυττάρων με Giemsa (Εικόνα VI-10) παρατηρήθηκαν ομοιότητες όλων των παραπάνω κυττάρων με τα WJ-MSCs των πρωτογενών καλλιιεργειών πριν την κατάψυξη (P-I και P-II WJ-MSCs). Ειδικότερα, τα FP-I FP-II WJ-MSCs είχαν διατηρήσει το μεγάλο πυρήνα με πολλούς πυρηνίσκους και το λεπτό κυτταρόπλασμα με λιπιδικά σωμάτια. Αντίθετα, στην πλειονότητα των καλλιιεργειών των F WJ-MSCs, δεν προσκολλήθηκαν κύτταρα στην επιφάνεια της καλλιέργειας. Μοναδικές εξαιρέσεις αποτέλεσαν μία περίπτωση κυττάρων κρυοσυντηρημένων για 1 εβδομάδα και άλλη μία με κύτταρα κρυοσυντηρημένα για 6 μήνες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα προσκολλημένα κύτταρα παρουσίασαν, την 5^η ημέρα, μια πιο πεπλατυσμένη μορφολογία (Εικόνα VI-11A και B). Η χρώση με Giemsa (Εικόνα VI-12A και B) έδειξε έντονη ανομοιομορφία του κυτταροπλάσματος ενώ η αιματοξυλίνη ηωσίνη (Εικόνα VI-13A και B) ανέδειξε την έντονη παρουσία ινιδίων στο κυτταρόπλασμα, που δε συμβαδίζει με τη μορφολογία MSCs. Επιπλέον τα κύτταρα πολλαπλασιάζονταν αργά και ο πολλαπλασιασμός τους σταμάτησε προτού σχηματιστεί ταπήτιο.



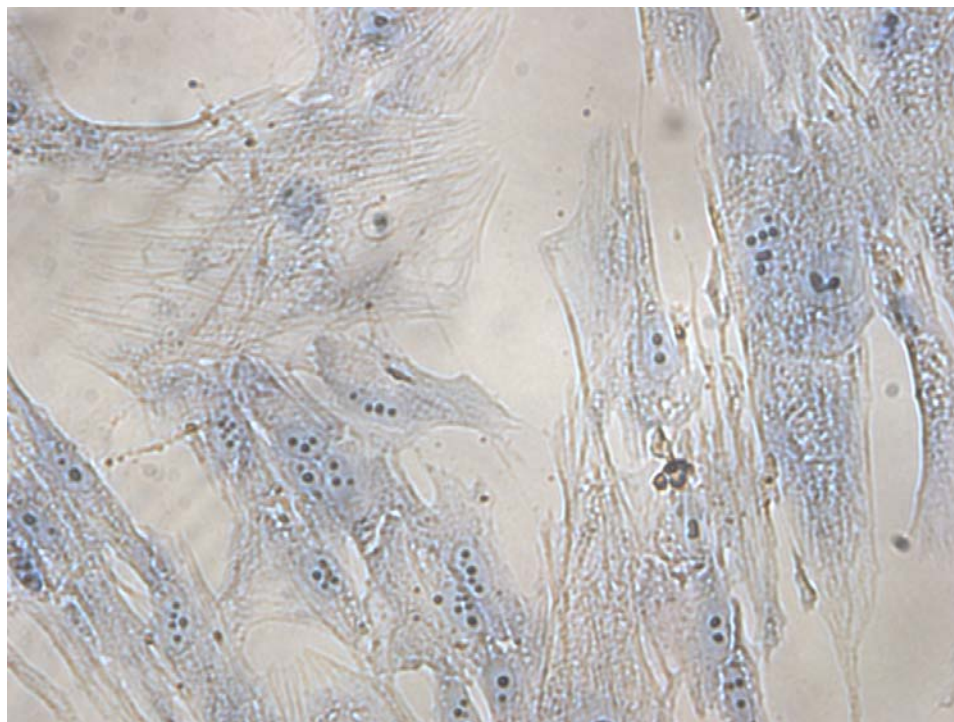
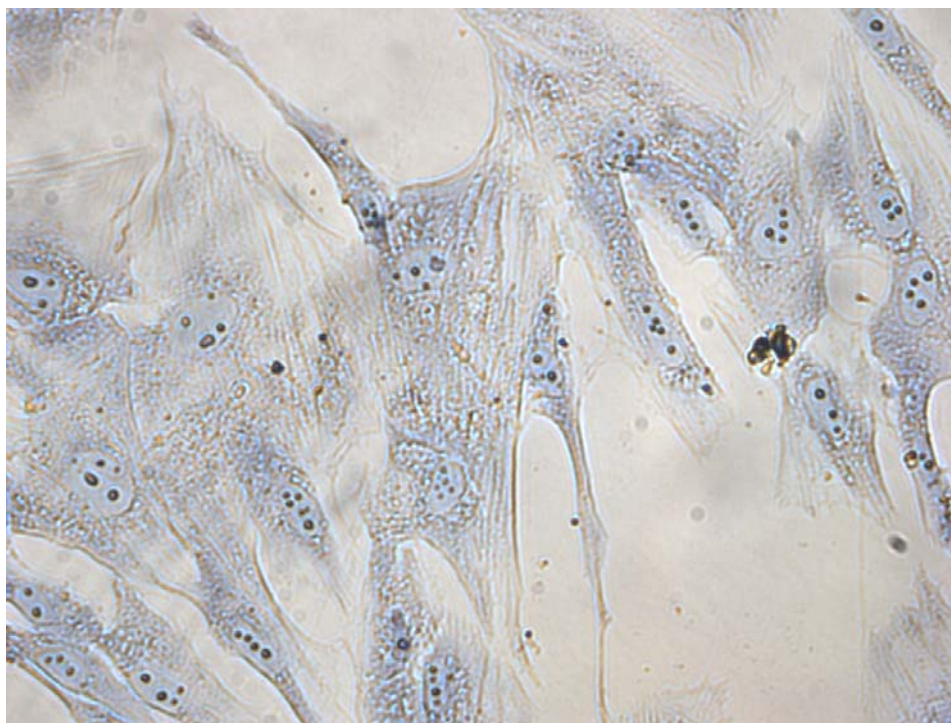
Εικόνα VI-9: Μορφολογικά χαρακτηριστικά FP-I και FP-II WJ-MSCs έπειτα από απόψυξη. Τόσο τα κύτταρα που είχαν καταψυχθεί για 1 εβδομάδα (A και E αντίστοιχα), όσο και αυτά που καταψύχθηκαν για 1 μήνα (B και F) ή 6 μήνες (C και G) παρουσίαζαν χαρακτηριστική μορφολογία MSCs. Αυτή η μορφολογία διατηρήθηκε μέχρι τη 15^η ημέρα, οπότε τα FP-I (D) και τα FP-II WJ MSCs (H) σχημάτιζαν ταπήτιο. (Μεγέθυνση 100x)



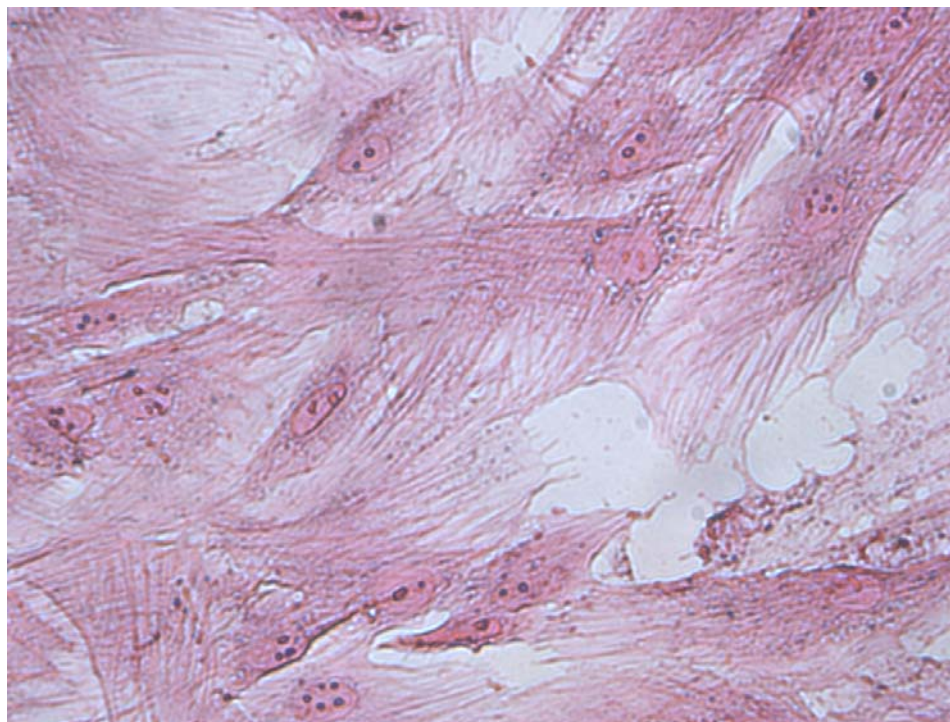
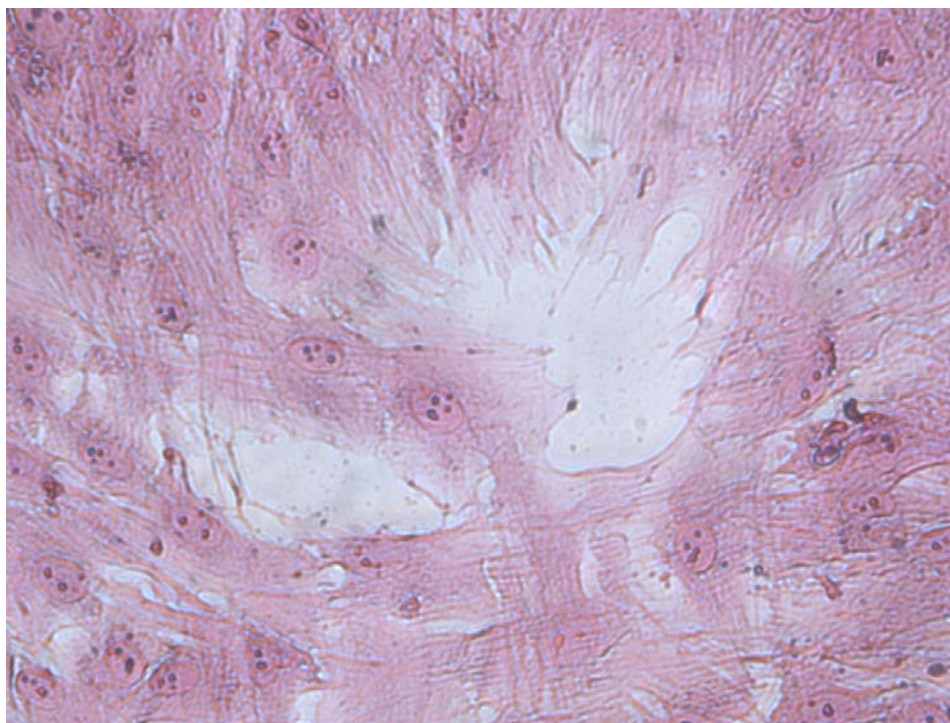
Εικόνα VI-10: Χρώση με Giemsa των FP-I και FP-II WJ-MSCs έπειτα από απόψυξη. Τόσο τα κύτταρα που είχαν καταψυχθεί για 1 εβδομάδα (A και E αντίστοιχα), όσο και αυτά που καταψύχθηκαν για 1 μήνα (B και F) ή 6 μήνες (C και G) δεν παρουσίασαν διαφορές, από μορφολογικής πλευράς, σε σχέση με τα κύτταρα των πρωτογενών καλλιιεργειών πριν την κατάψυξή τους (P-I και P-II WJ-MSCs). Διατήρησαν το ατρακτοειδές, επίμηκες σχήμα ενώ είχαν μεγάλο πυρήνα με πολλούς πυρηνίσκους και λεπτό κυτταρόπλασμα με παρουσία λιπιδίων. (Μεγέθυνση 400x)

A**B**

Εικόνα VI-11: Τα F-MSCs που αποψύχθηκαν έπειτα από 1 εβδομάδα (A) ή έπειτα από 6 μήνες (B), είχαν πιο πεπλατυσμένη μορφή με ακανόνιστο σχήμα και παρουσία ινιδίων στο κυτταρόπλασμα την 5^η ημέρα καλλιέργειας. (Μεγέθυνση 400x)

A**B**

Εικόνα VI-12: Τα F-MSCs που αποψύχθηκαν έπειτα από 1 εβδομάδα (A) ή έπειτα από 6 μήνες (B), είχαν πιο πεπλατυσμένη μορφή με ακανόνιστο σχήμα την 5^η ημέρα καλλιέργειας. Η χρώση με Giemsa έδειξε μεγάλη ανομοιομορφία στο κυτταρόπλασμα με έντονη παρουσία λιπιδικών εγκλείστων. (Μεγέθυνση 600x)

A**B**

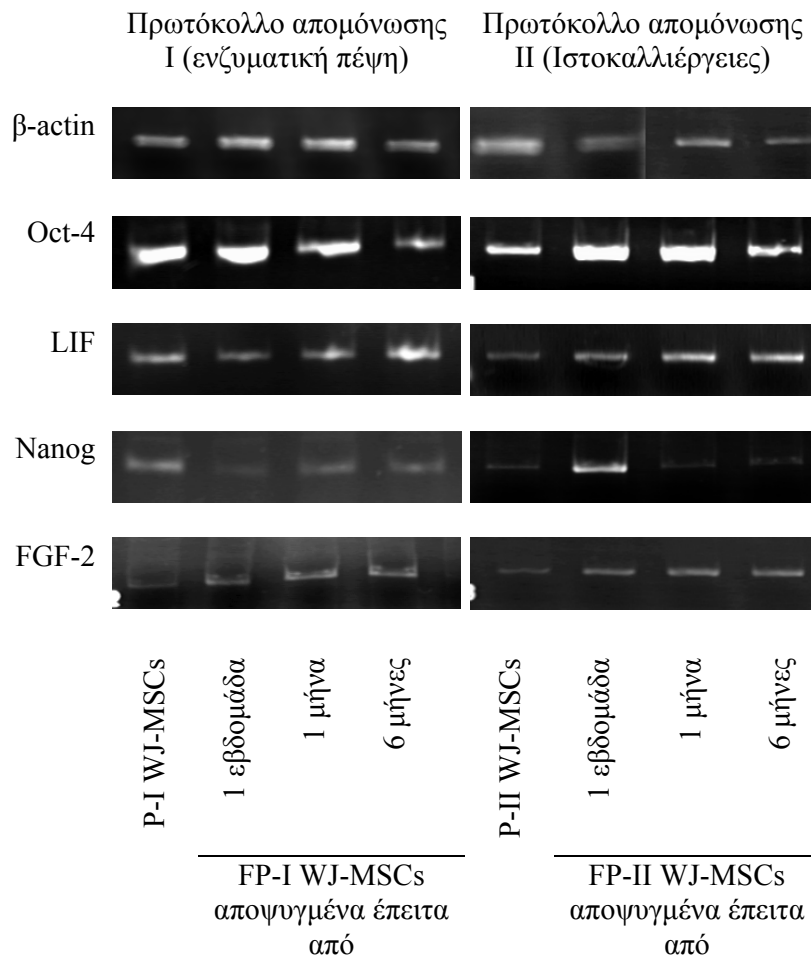
Εικόνα VI-13: Η χρώση με αιμοτοξυλίνη και ηωσίνη των F-MSCs που αποψύχθηκαν έπειτα από 1 εβδομάδα (A) ή έπειτα από 6 μήνες (B), δείχνει μεγάλη συγκέντρωση ινιδίων (stress fibers) στο κυτταρόπλασμα. (Μεγέθυνση 600x)

3.2. Ανοσοφαινότυπος κρυοσυντηρημένων κυττάρων

Για τη μελέτη του ανοσοφαινότυπου των WJ-MSCs χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα κατά, χαρακτηριστικών των μεσεγχυματικών κυττάρων, αντιγόνων. Αρχικά αναλύθηκαν τα κύτταρα πριν από την κρυοκατάψυξη, με την ολοκλήρωση των πρωτογενών καλλιιεργειών. Όσον αφορά τα κατεψυγμένα κύτταρα, αυτά αποψύχθηκαν, καλλιεργήθηκαν και όταν αποκολλήθηκαν, για να γίνει ανακαλλιέργεια, ένα μέρος τους χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση. Σε όλες τις περιπτώσεις τα WJ-MSCs ήταν αρνητικά για τους αιμοποιητικούς δείκτες CD34, CD45 και HLA class II ενώ ήταν θετικά για τις ιντεγκρίνες CD29 και CD51, τους υποδοχείς μεσοκυττάριας ουσίας CD44, CD58 και CD105, καθώς και για τους δείκτες CD90, CD73 και HLA class I. Η κρυοσυντήρηση και η απόψυξη δε φάνηκαν να επηρεάζουν τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων αφού, ανεξάρτητα από το χρόνο παραμονής τους στο υγρό άζωτο, διατήρησαν το αρχικό προφίλ έκφρασης δεικτών επιφανείας (Πίνακας VI-4). Παρατηρήθηκαν ωστόσο μεταβολές στα ποσοστά έκφρασης κάποιων από αυτούς. Ειδικότερα, και ενώ το $91,3 \pm 4,4\%$ των P-I WJ-MSCs ήταν θετικά για το CD29, το αντίστοιχο ποσοστό για τα κρυοσυντηρημένα για 1 μήνα FP-II WJ-MSCs ήταν $80,9 \pm 2,4\%$. Αντίθετα παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό έκφρασης του CD51 στα FP-I WJ-MSCs μετά από 1 και 6 μήνες κρυοσυντήρησης σε σχέση με τα P-I WJ-MSCs ($85,5 \pm 6,0\%$ και $81,6 \pm 2,2\%$ έναντι $64,0 \pm 7,1\%$ αντίστοιχα). Ο δείκτης επιφανείας CD90 εμφανίστηκε κι αυτός αυξημένος στα FP-I WJ-MSCs που αποψύχθηκαν στο εξάμηνο αφού τον εξέφραζαν σε ποσοστό $92,8 \pm 0,2\%$ ενώ τα P-I WJ-MSCs σε ποσοστό $86,7 \pm 4,4\%$. Όσον αφορά τα κύτταρα που απομονώθηκαν με ιστοκαλλιέργειες του ομφαλίου λώρου, παρουσίασαν και αυτά διακύμανση στο ποσοστό έκφρασης του CD51. Συγκεκριμένα, ενώ τα P-II WJ-MSCs ήταν κατά $95,8 \pm 3,3\%$ θετικά για αυτό το αντιγόνο, τα αποψυγμένα στη 1 εβδομάδα και στο εξάμηνο FP-II WJ-MSCs ήταν θετικά κατά $79,4 \pm 17,4\%$ και $84,8 \pm 11,7\%$ αντίστοιχα ενώ και το CD44 μετρήθηκε $79,8 \pm 17,6\%$ στα κρυοσυντηρημένα για ένα μήνα FP-II WJ-MSCs, που ήταν στατιστικά μικρότερο από το $96,5 \pm 3,6\%$ των P-II WJ-MSCs. Τέλος για τα απομονωμένα κύτταρα που καταψύχθηκαν χωρίς πρηγούμενη καλλιέργεια (F WJ-MSCs), λόγω της αποτυχίας καλλιέργειάς τους μετά την απόψυξη και της πρόωρης παύσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, πραγματοποιήθηκε ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος μόνο σε μία καλλιέργεια κυττάρων που αποψύχθηκαν έπειτα από 1 εβδομάδα κρυοσυντήρησης και για το λόγο αυτό δεν ήταν δυνατή η στατιστική ανάλυσή τους. Ωστόσο τα αποτελέσματα του ελέγχου παρατίθενται, και αυτά, στον Πίνακα VI-4.

Πίνακας VI-4: Τα ποσοστά έκφρασης των δεικτών επιφανείας των πρωτογενών καλλιιεργειών WJ-MSCs (P-I και P-II) καθώς και των κρυοσυντηρημένων, αποψυγμένων και ανακαλλιεργημένων κυττάρων (FP-I, FP-II και F WJ-MSCs). Τα p που εμφανίζονται αντιστοιχούν στις στατιστικές διαφορές που προέκυψαν από τη σύγκριση των κρυοσυντηρημένων κυττάρων με τα αντίστοιχα κύτταρα πριν την κατάψυξη (δηλ FP-I με P-I και FP-II με P-II).

Διάρκεια κατάψυξης	Ποσοστά έκφρασης δεικτών επιφανείας								
	<i>P-I MSCs</i>	<i>P-II MSCs</i>	<i>FP-I MSCs</i>			<i>FP-II MSCs</i>			<i>F MSCs</i>
			<i>1 εβδ.</i>	<i>1 μήνα</i>	<i>6 μήνες</i>	<i>1 εβδ.</i>	<i>1 μήνα</i>	<i>6 μήνες</i>	<i>1 εβδ.</i>
CD105	80,6±8,4	94,9±3,3	86,8±13,5	83,9±17,0	88,4±1,8	89,9±9,1	92,4±3,8	92,2±4,2	86,7
CD90	86,7±2,4	97,0±2,8	90,9±2,4	94,4±3,7	92,8±0,2 p=0,036	95,1±4,9	95,2±4,9	90,9±7,2	90,8
CD73	95,0±1,4	91,7±6,0	94,8±2,6	94,7±1,7	93,8±0,8	91,4±5,4	93,0±6,4	98,0±1,6	86,9
CD29	91,3±4,4	97,7±3,2	87,2±2,5	80,9±2,4 (p=0,049)	87,1±8,0	97,5±1,0	92,0±6,3	98,8±1,0	92,9
CD44	79,9±8,1	96,5±3,6	78,7±17,7	88,5±4,1	91,8±3,3	93,0±1,8	79,8±17,6 (p=0,042)	94,6±6,0	71,5
CD51	64,0±7,1	95,8±3,3	70,3±13,1	85,5±6,0 (p=0,041)	81,6±2,2 (p=0,040)	79,4±17,4 (p=0,037)	92,8±3,6	84,8±11,7 (p=0,044)	91,2
CD58	74,4±7,6	88,0±14,1	75,7±16,6	81,8±1,9	88,7±7,3	79,0±7,9	86,9±8,4	90,0±9,5	81,1
HLA class I	91,3±4,4	96,3±5,6	87,4±2,1	87,3±5,2	94,3±0,1	96,1±3,7	93,3±10,5	88,5±15,4	98,1
CD34	2,2±2,0	3,1±3,9	1,9±1,5	2,4±2,0	3,6±4,1	2,5±2,5	1,8±2,1	1,9±2,4	2,1
CD45	1,4±2,8	1,2±0,9	1,7±1,6	0,1±0,5	1,6±1,0	1,8±1,6	0,2±0,1	1,3±1,8	0,3
HLA class II	0,1±0,2	0,2±0,4	0,2±0,2	0,3±0,1	0,5±0,2	0,6±0,5	0,1±0,0	0,3±0,4	0,01



Εικόνα VI-14: Η γονιδιακή έκφραση είναι η ίδια για όλες τις κατηγορίες κυττάρων που μελετήθηκαν είτε πρόκειται για καλλιεργούμενα κύτταρα προ κατάψυξης (P-I και P-II WJ-MSCs) είτε για αποψυγμένα κύτταρα (FP-I και FP-II WJ-MSCs) και παραμένει βέβαια αμετάβλητη ανεξάρτητα από το χρόνο κρυοσυντήρησης.

3.3. Γονιδιακή έκφραση κρυοσυντηρημένων κυττάρων

Παράλληλα με τον ανοσοφαινοτυπικό έλεγχο των κρυοσυντηρημένων κυττάρων εξετάστηκε και η έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του συνολικού κυτταρικού *RNA* το οποίο χητισμοποιήθηκε σαν μήτρα για την αντίστροφη μεταγραφή σε *cDNA*. Με τη χρήση εκκινητών σχεδιασμένων με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων *Oct-4*, *LIF*, *Nanog*, *Rex-1* και *FGF-2*, ενισχύθηκαν με *PCR* τα αντίστοιχα *cDNA*. Οι ενισχυμένες αλληλουχίες ανιχνεύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Όπως διακρίνεται και στην Εικόνα VI-14, τα αποψυγμένα FP-I και FP-II WJ-MSCs διατήρησαν τη γονιδιακή έκφραση που είχαν και πριν τη κρυοσυντήρησή τους (P-I και P-II WJ-MSCs), ανεξάρτητα από τη συνολική διάρκεια της κρυοκατάψυξης.

3.4. Ελεγχόμενη *in vitro* διαφοροποίηση κρυοσυντηρημένων κυττάρων

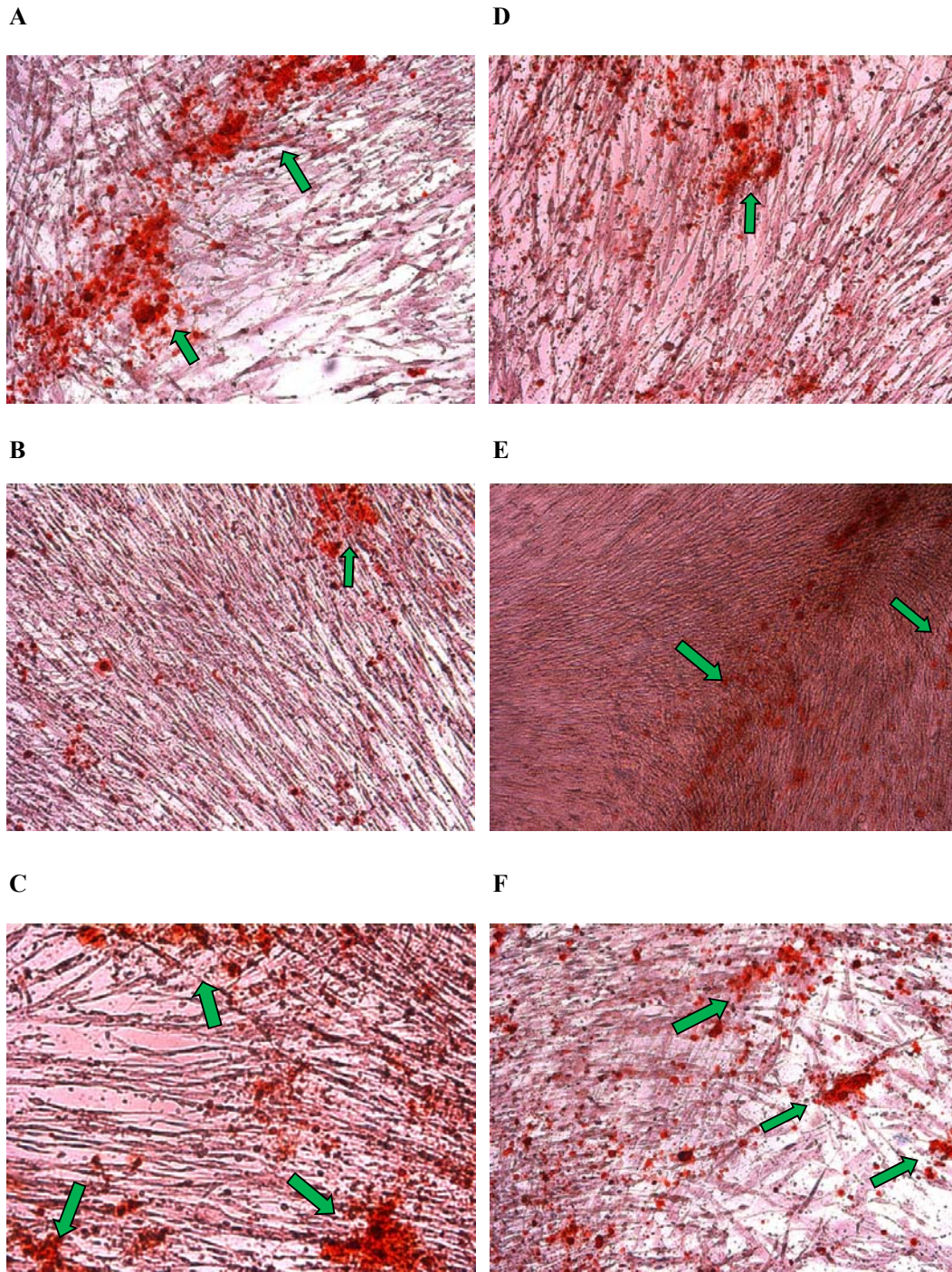
Ο λειτουργικός έλεγχος των κατεψυγμένων WJ-MSCs βασίστηκε στη ελεγχόμενη διαφοροποίησή τους σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα. Τα κρυοσυντηρημένα FP-I και FP-II WJ-MSCs, αφού αποψύχθηκαν και καλλιεργήθηκαν μέχρι την 1^η ανακαλλέργεια, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θρεπτικά υλικά οστεογένεσης και λιπογένεσης. Για να προκληθεί η διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα, 500.000 FP-I και FP-II WJ-MSCs καλλιεργήθηκαν με τη μέθοδο της μικρομάζας σε θρεπτικό υλικό χονδρογένεσης. Ο έλεγχος των διαφοροποιημένων κυττάρων έγινε 21 ημέρες μετά την έναρξη των καλλιιεργειών διαφοροποίησης.

3.4.1. Οστεογενής διαφοροποίηση

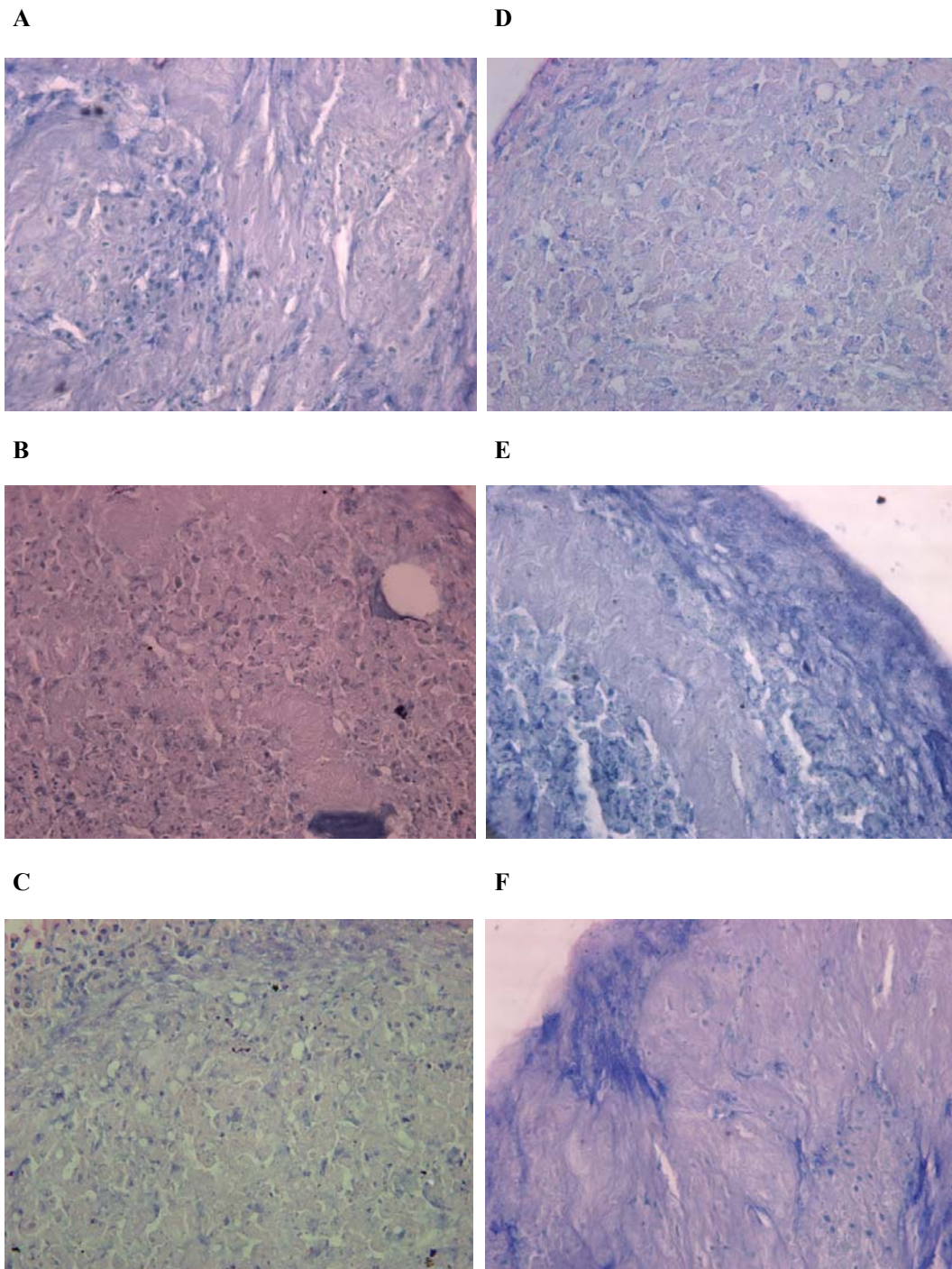
Η χρώση με Alizarin red S έδειξε εναπόθεση ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) στον εξωκυττάριο χώρο, σε όλες τις καλλιέργειες FP-I και FP-II WJ-MSCs που πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υλικό επαγωγής της οστεογένεσης, ανεξάρτητα από το χρόνο στον οποίο αποψύχθηκαν τα κύτταρα (Εικόνα VI-15). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η παραμονή τους στο υγρό άζωτο δεν επηρέασε την ιδιότητα των WJ-MSCs να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα υπό την επίδραση των κατάλληλων ερεθισμάτων.

3.4.2. Χονδρογενής διαφοροποίηση

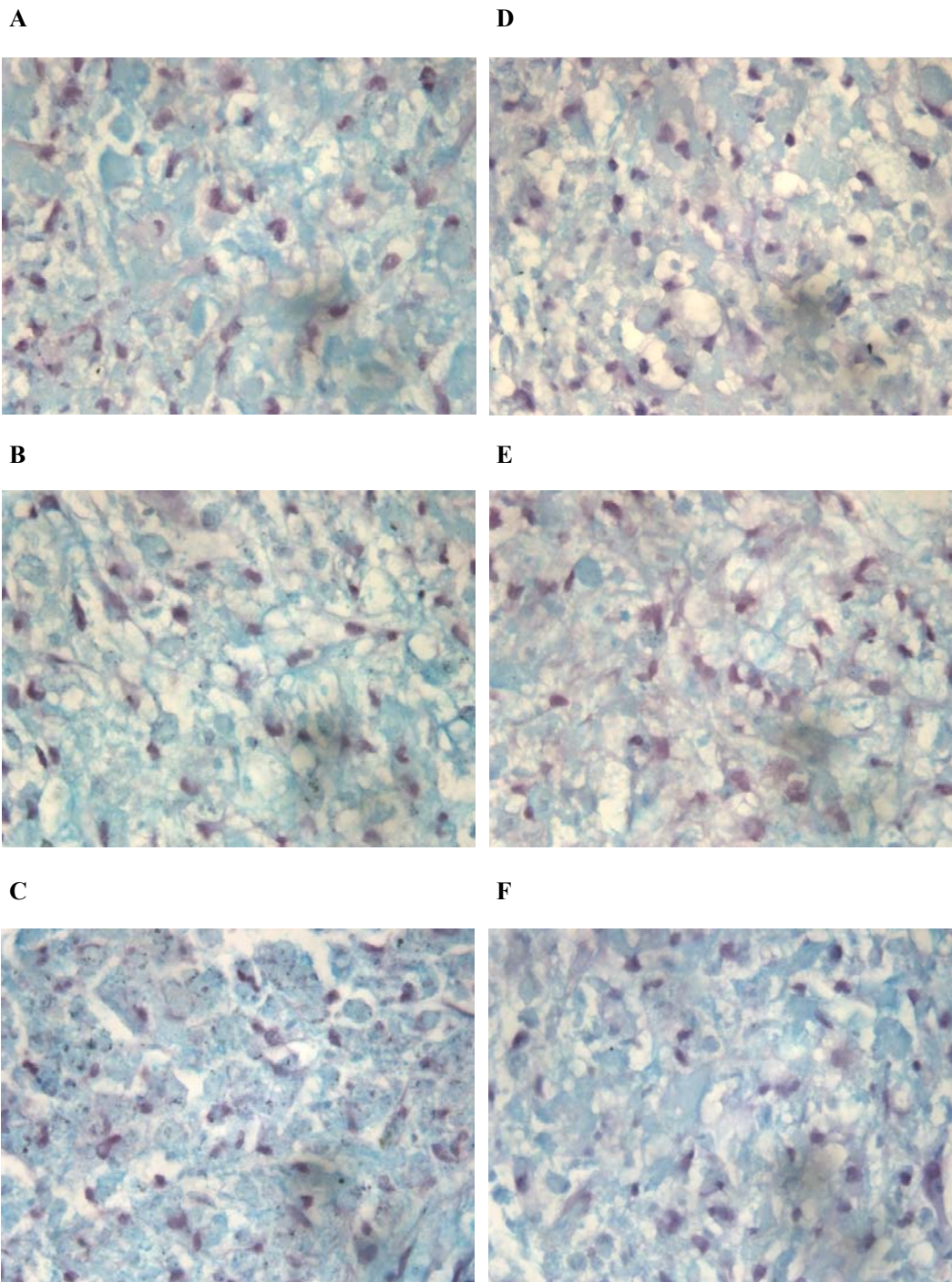
Οι μικρομάζες FP-I και FP-II WJ-MSCs εγκλείστηκαν σε μπλοκ παραφίνης. Ακολούθησε μικροτόμισή τους και χρώση των τομών με toluidine blue και alcian blue. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα δεν σχημάτιζαν μία ενιαία μάζα, με τις κυτταρικές τους μεμβράνες σε στενή επαφή, αλλά είχαν συνθέσει θεμέλια ουσία που τα περιέβαλε και τα διαχώριζε. Σε όλες δε τις τομές που χρώστηκαν με toluidine blue παρατηρήθηκε μεταχρωματικό φαινόμενο, με χρωματισμό αυτής της θεμέλιας ουσίας σε μωβ, γεγονός που καταδεικνύει την παρουσία πρωτεογλυκανών και γλυκοζαμινογλυκανών στο μεσοκυττάριο χώρο (Εικόνα VI-16). Αντίστοιχα η alcian blue έχρωσε τη θεμέλια ουσία μπλε επιβεβαιώνοντας το προηγούμενο πείραμα (Εικόνα VI-17).



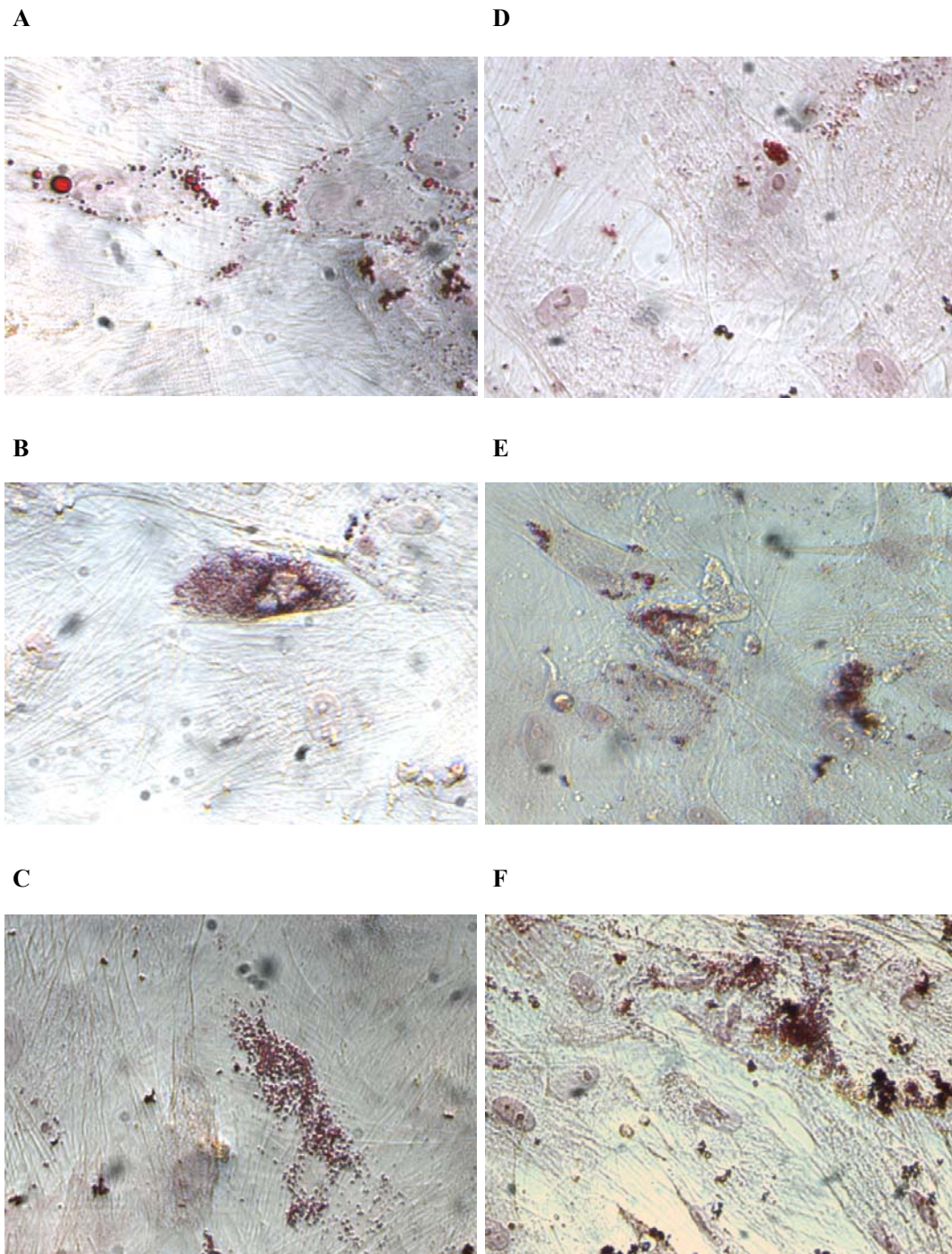
Εικόνα VI-15: Χρώση Alizarin Red των FP-I και FP-II WJ-MSCs που παρέμειναν στο υγρό άζωτο για 1 εβδομάδα (A και D αντίστοιχα), 1 μήνα (B και E) ή 6 μήνες (C και F αντίστοιχα) και στη συνέχεια καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που προήγαγε την οστεογένεση. Παρατηρείται εναπόθεση ιόντων Ca²⁺ στη μεσοκυττάρια ουσία (πράσινα βέλη). (Μεγέθυνση 200x)



Εικόνα VI-16: Χρώση Toluidine blue των FP-I και FP-II WJ-MSCs που παρέμειναν στο υγρό άζωτο για 1 εβδομάδα (A και D αντίστοιχα), 1 μήνα (B και E) ή 6 μήνες (C και F αντίστοιχα) και στη συνέχεια καλλιιεργήθηκαν με τη μέθοδο της μικρομάζας σε θρεπτικό μέσο που προήγαγε τη χονδρογένεση. Φαίνεται η θεμέλια ουσία, που επικρατεί των κυττάρων και έχει χρωματιστεί μωβ, λόγω της παρουσίας πρωτεογλυκανών. (Μεγέθυνση 200x)



Εικόνα VI-17: Χρώση Alcian blue των FP-I και FP-II WJ-MSCs που παρέμειναν στο υγρό άζωτο για 1 εβδομάδα (A και D αντίστοιχα), 1 μήνα (B και E) ή 6 μήνες (C και F αντίστοιχα) και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν με τη μέθοδο της μικρομάζας σε θρεπτικό μέσο που προήγαγε τη χονδρογένεση. Φαίνεται η θεμέλια ουσία, που έχει χρωματιστεί μπλε λόγω της παρουσίας πρωτεογλυκανών και γλυκοζαμινογλυκανών, ενώ οι πυρήνες είναι χρωματισμένοι μωβ από την αιματοξυλίνη. (Μεγέθυνση 600x)



Εικόνα VI-18: Χρώση Oil-Red-O των FP-I και FP-II WJ-MSCs που παρέμειναν στο υγρό άζωτο για 1 εβδομάδα (A και D αντίστοιχα), 1 μήνα (B και E) ή 6 μήνες (C και F αντίστοιχα) και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που προήγαγε τη λιπογένεση. Παρατηρείται περιορισμένος αριθμός λιπιδικών εγκλείστων σε κάποια από τα κύτταρα. (Μεγέθυνση 400x)

3.4.3. Λιπογενής διαφοροποίηση

Σε αντίθεση με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις όπου η διαφοροποίηση των κρυοσυντηρημένων WJ-MSCs ήταν ξεκάθαρη, όταν τα ίδια κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που προάγει τη λιπογένεση, παρατηρήθηκαν περιορισμένες, μόνο, μεταβολές στη μορφολογία τους. Η χρώση με Oil-Red-O έδειξε την παρουσία λιπιδικών εγκλείστων σε μικρό αριθμό FP-I και FP-II WJ-MSCs για όλες τις περιόδους κρυοσυντήρησης που εξετάστηκαν (Εικόνα VI-18). Ωστόσο οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τα χαρακτηριστικά των κυττάρων πριν την κατάψυξη και ενισχύουν τα προηγούμενα αποτελέσματα, δείχνοντας για μια ακόμα φορά ότι η κρυοκατάψυξη δεν επηρεάζει τα WJ-MSCs.

4. Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου σε ικρίωματα κολλαγόνου

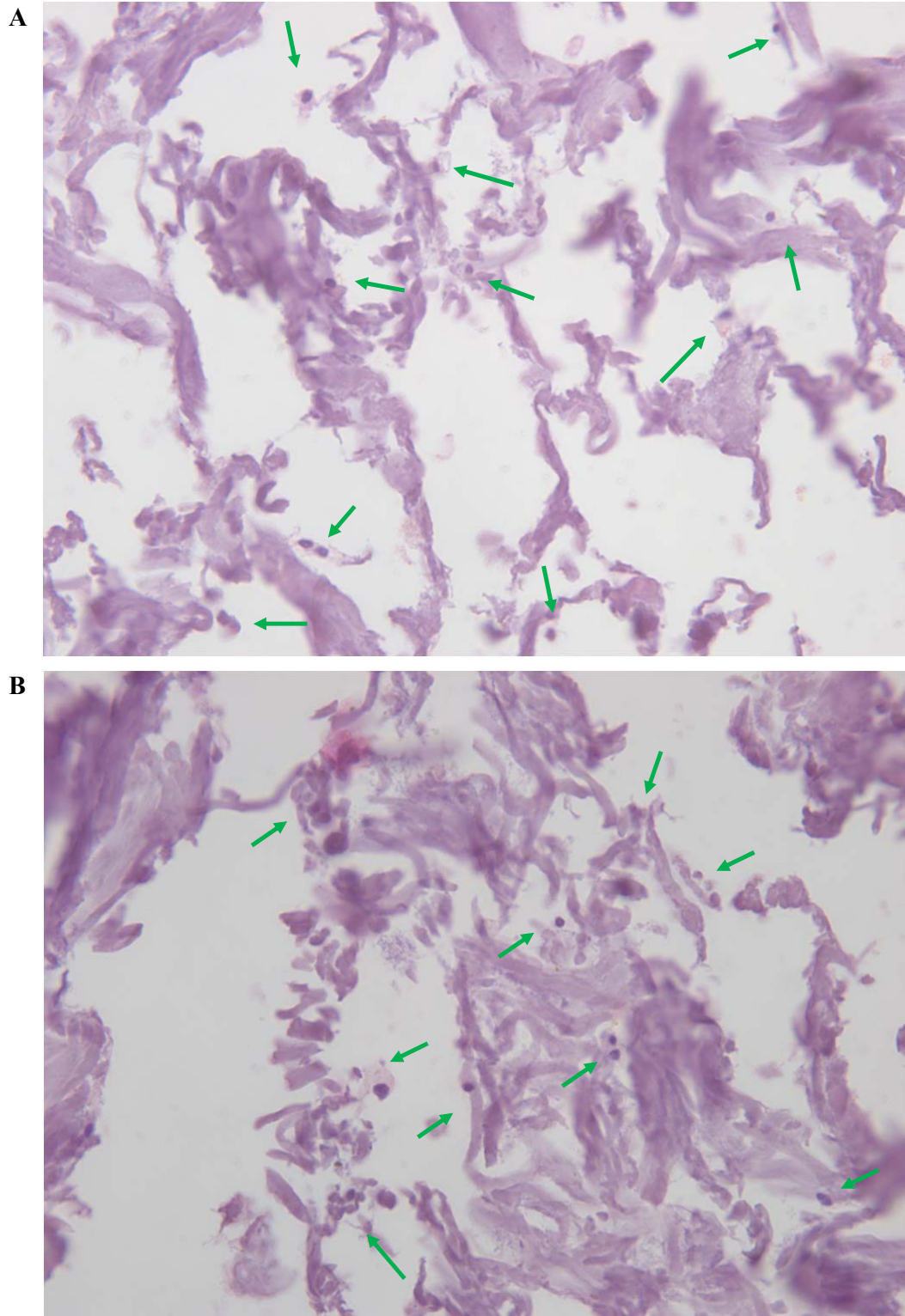
Τα P-I και P-II WJ-MSCs καλλιεργήθηκαν παρουσία ικριωμάτων με δύο μεθόδους, τη στατική, και τη δυναμική. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα κύτταρα είχαν αποικίσει το ικρίωμα, την τέταρτη εβδομάδα τα ικρίωματα εγκλείστηκαν σε παραφίνη και πραγματοποιήθηκαν επιφανειακές (150μm) και εν τω βάθει (650μm) τομές οι οποίες χρώστηκαν με αιματοξυλίνη, ηωσίνη και παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο.

4.1. Στατικές καλλιέργειες σε ικρίωματα κολλαγόνου

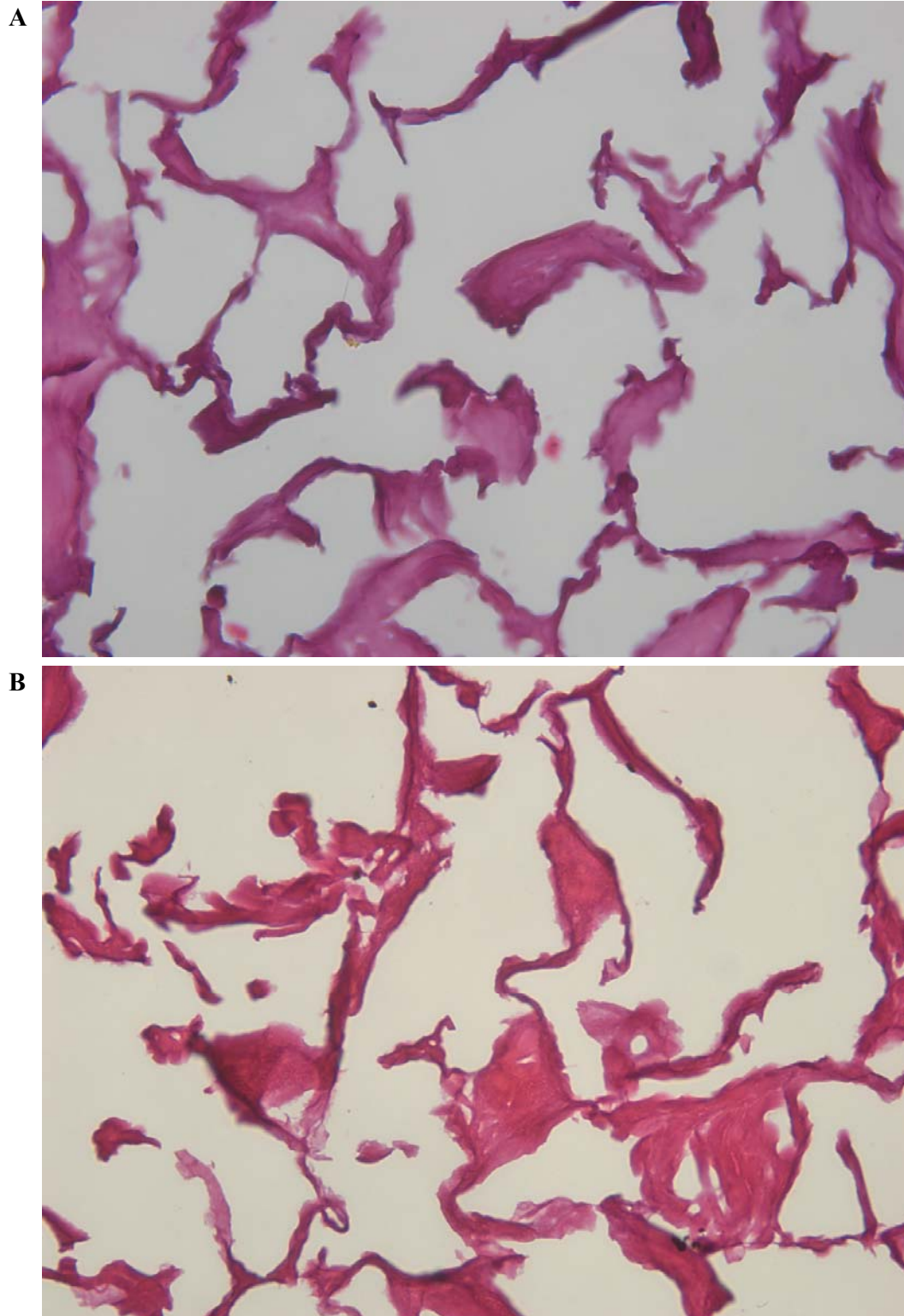
Στο διάστημα των τεσσάρων εβδομάδων κατά το οποίο τα WJ-MSCs επώαστηκαν παρουσία ικριωμάτων κολλαγόνου παρατηρήθηκε περιορισμένος αποικισμός του υλικού τόσο από τα κύτταρα. Τόσο τα P-I όσο και τα P-II WJ-MSCs ανιχνεύθηκαν στις επιφανειακές τομές του ικριώματος (Εικόνα VI-19A και B, αντίστοιχα) αλλά όχι στις τομές σε βάθος 650μm (Εικόνα VI-20A και B, αντίστοιχα).

4.2. Δυναμικές καλλιέργειες σε ικρίωματα κολλαγόνου

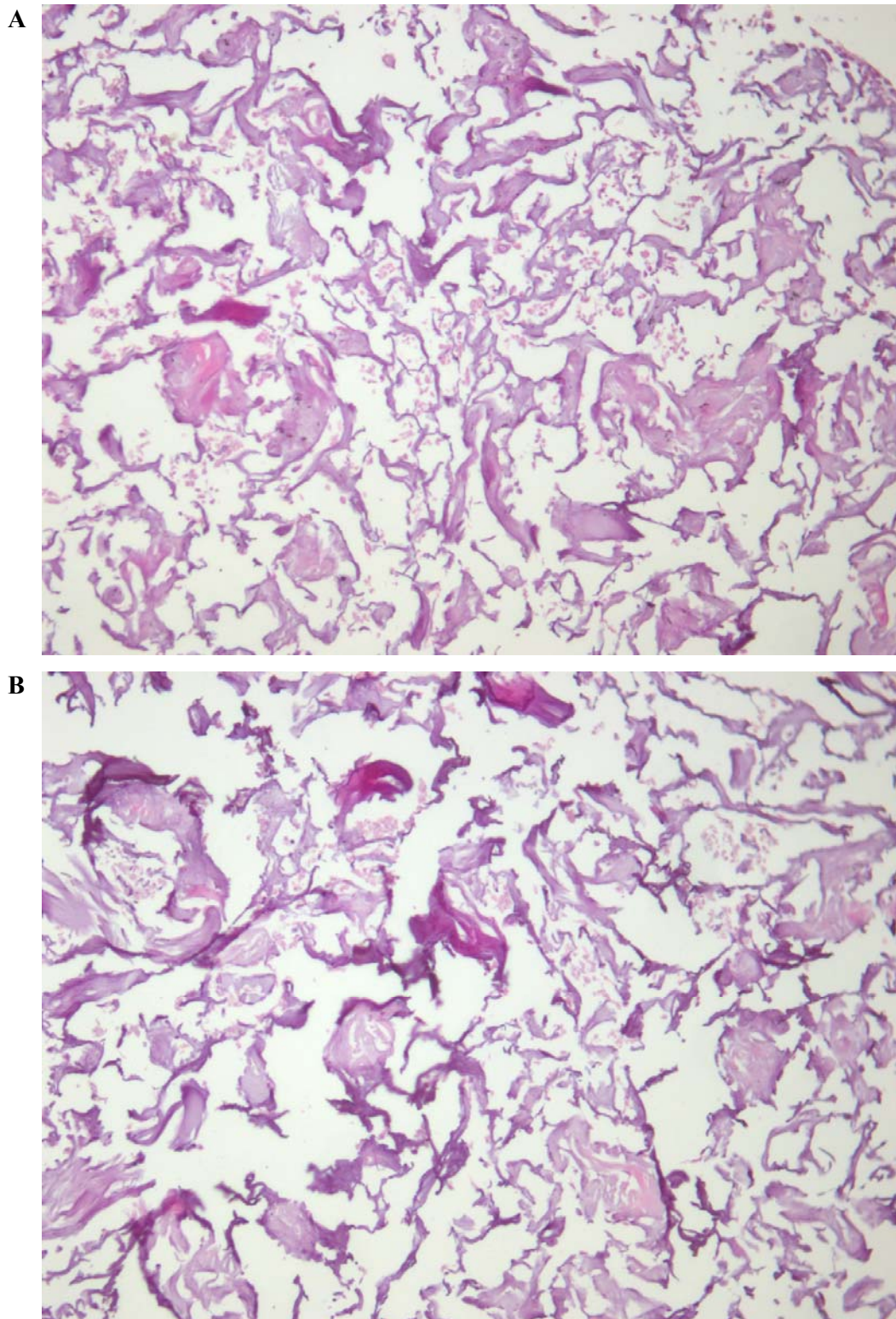
Αντίθετα απ' ό τι συνέβη με τις στατικές καλλιέργειες, στις δυναμικές, τα P-I και P-II WJ-MSCs αποίκισαν τα ικρίωματα κολλαγόνου σε όλο τους το βάθος. Έπετα από τέσσερις εβδομάδες καλλιέργειας υπήρχαν κύτταρα σε βάθος 150μm (Εικόνα VI-21A για τα P-I και B για τα P-II WJ-MSCs) καθώς και στα 650μm (Εικόνα VI-22A για τα P-I και B για τα P-II WJ-MSCs).



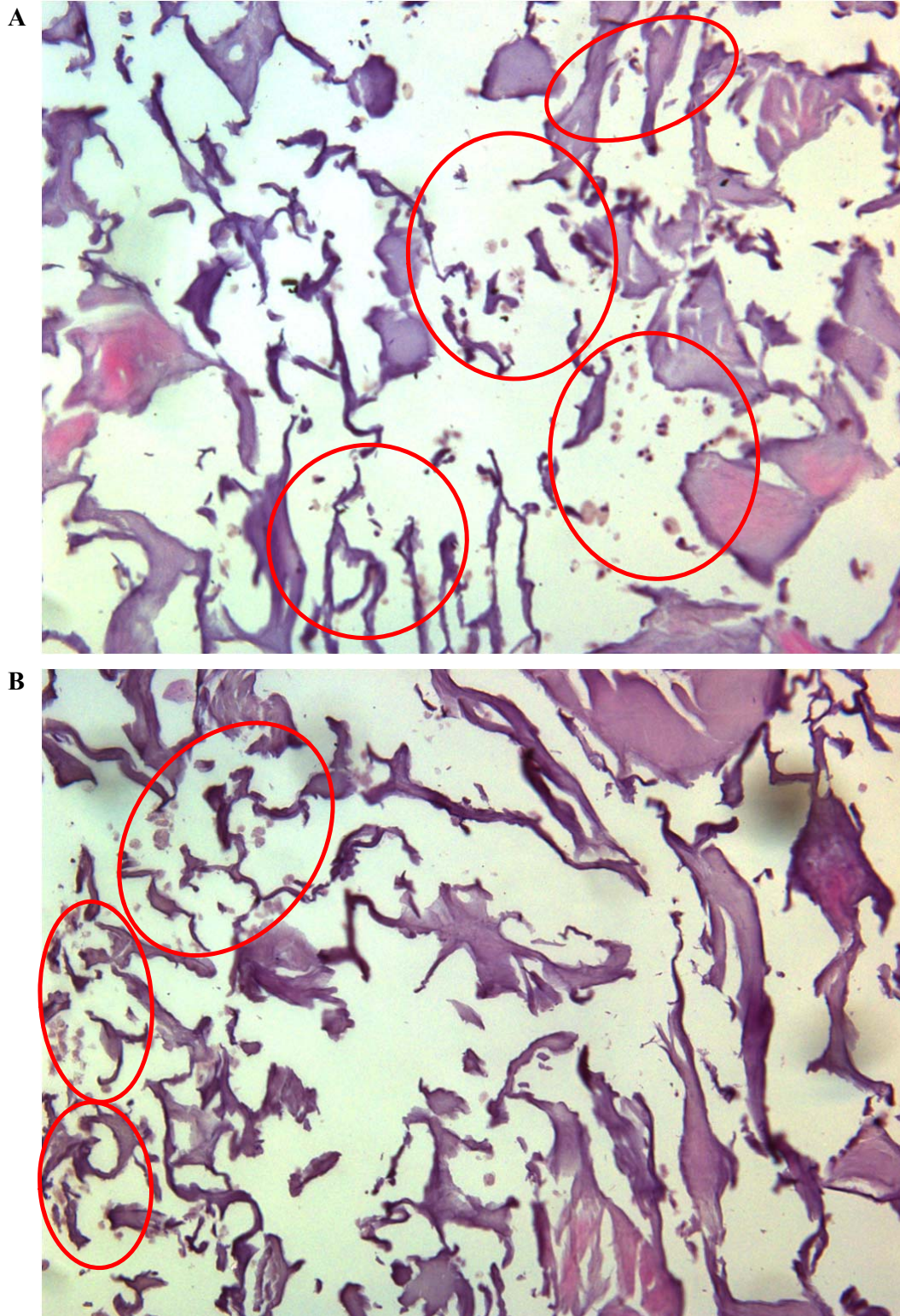
Εικόνα VI-19: Χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης σε επιφανειακές τομές (150μm βάθος) κριωμάτων κολλαγόνου στα οποία καλλιεργήθηκαν P-I (A) και P-II (B) WJ-MSCs για τέσσερις (4) εβδομάδες με τη στατική μέθοδο. Τα πράσινα βέλη δείχνουν τα κύτταρα που διείσδυσαν στις πτυχώσεις του κριώματος. (Μεγέθυνση 200x)



Εικόνα VI-20: Χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης σε εν τω βάθει τομές (650μm βάθος) ικριωμάτων κολλαγόνου στα οποία καλλιεργήθηκαν P-I (A) και P-II (B) WJ-MSCs για τέσσερις (4) εβδομάδες με τη στατική μέθοδο. Δεν φαίνεται να υπάρχουν κύτταρα σε αυτό το βάθος. (Μεγέθυνση 400x)



Εικόνα VI-21: Χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης σε επιφανειακές τομές (150μm βάθος) ικριωμάτων κολλαγόνου στα οποία καλλιεργήθηκαν P-I (A) και P-II (B) WJ-MSCs για τέσσερις (4) εβδομάδες με τη δυναμική μέθοδο. Τα κύτταρα φαίνονται διάχυτα σε όλες τις πτυχώσεις του ικριώματος. (Μεγέθυνση 100x)



Εικόνα VI-22: Χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης σε εν τω βάθει τομές (650μm βάθος) ικριωμάτων κολλαγόνου στα οποία καλλιεργήθηκαν P-I (A) και P-II (B) WJ-MSCs για τέσσερις (4) εβδομάδες με τη δυναμική μέθοδο. Οι κύκλοι σημειώνουν τις περιοχές που φαίνονται κύτταρα. (Μεγέθυνση 400x)

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα ως πηγή απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων.

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν προκαλέσει, τα τελευταία 14 χρόνια, έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των ιδιοτήτων τους, οι οποίες αφορούν τη δυνατότητα διαφοροποίησής τους σε άλλες κυτταρικές σειρές καθώς και για την ανοσορρυθμιστική τους δράση. Έτσι, τα MSCs χρησιμοποιούνται στην αναγεννητική ιατρική αλλά και σαν κυτταρική θεραπεία σε νοσήματα όπως είναι η σκλήρυνση κατά πλάκας ή η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση. Ωστόσο οι εφαρμογές τους περιορίζονται από το γεγονός ότι ο μυελός των οστών αποτελεί, μέχρι στιγμής, την αποκλειστική (πλην ελάχιστων εξαιρέσεων) πηγή απομόνωσης κυττάρων για κλινικές εφαρμογές, παρόλο που φαίνεται ότι MSCs που λαμβάνονται και από άλλες πηγές (πχ. το λίπος) παρουσιάζουν ενισχυμένες θεραπευτικές ιδιότητες σε σχέση με αυτά του μυελού των οστών. Η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο να διευκρινίσει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και του ομφαλίου λώρου ως εναλλακτικές πηγές, εμβρυϊκών αυτήν την φορά, MSCs για κλινικές εφαρμογές.

1.1. Αποτελεσματικότητα των μεθόδων απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα

Σε ένα πρώτο στάδιο επιχειρήθηκε η απομόνωση MSCs από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 172 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος, το μεγαλύτερο έως τώρα δείγμα σε δημοσιευμένη εργασία. Πράγματι, αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έγιναν σε μικρά δείγματα των 11 (Lee OK et al., 2004) ή 24 (Manca MF et al., 2008) μονάδων ενώ μόνο η Karen Bieback και οι συνεργάτες της χρησιμοποίησαν 59 μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος (Bieback K et al., 2004). Για την απομόνωση MSCs τα μονοπύρρηνα κύτταρα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος καλλιεργήθηκαν αυτούσια ή έπειτα από εμπλουτισμό με *RosetteSep*®. Το *RosetteSep*® αποτελείται από ένα μίγμα τροποποιημένων τετραμερών αντισωμάτων που συμπλέκει τους ώριμους αιμοποιητικούς πληθυσμούς με τα ερυθρά αιμοσφαίρια προκειμένου να διευκολύνει την απομάκρυνση των πρώτων. Με τη χρήση του *RosetteSep*® ενισχύεται ο πληθυσμός των MSCs σε σχέση με τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς του ομφαλοπλακουντιακού αίματος πριν την έναρξη της καλλιέργειας

(Merino A et al., 2003). Η πρώτη παρατήρηση που προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η επιβεβαίωση, προγενέστερων μελετών, σχετικά με την ύπαρξη MSCs στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα (Erices A et al., 2000; Lee OK et al., 2004).

Ωστόσο, παρά την ύπαρξη MSCs στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την αδυναμία συστηματικής απομόνωσής τους από αυτήν την πηγή. Πράγματι, το ποσοστό επιτυχίας υπήρξε κατώτερο του 2%, ανεξαρτήτως της μεθοδολογίας απομόνωσης. Οι παρατηρήσεις αυτές, συνάδουν με την άποψη που διατυπώθηκε από διάφορες ερευνητικές ομάδες, ότι το ομφαλοπλακουντιακό αίμα δεν αποτελεί κατάλληλη πηγή για την απομόνωση MSCs (Perdikogianni C et al., 2008; Wexler SA et al., 2003). Η κυριότερη αιτία είναι, κατά πάσα πιθανότητα, η πολύ μικρή συχνότητά τους στο συνολικό κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, η οποία, σε τελειόμηνους τοκετούς αγγίζει τα 0,3 στα 10^6 κύτταρα (Campagnoli C et al., 2001). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα αποτελέσματα ακόμα και μετά από εμπλουτισμό του κλάσματος των μονοπύρηνων κυττάρων με τη χρήση του *RosetteSep*®. Έτσι, ενώ με τον εμπλουτισμό απομακρύνθηκαν σε μεγάλο ποσοστό οι ώριμοι αιμοποιητικοί πληθυσμοί, δεν έγινε το ίδιο και με τα ανώριμα και προγονικά κύτταρα, τα οποία υπάρχουν σε αφθονία στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να προσκολλούνται στο πλαστικό μέσο καλλιέργειας σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι τα MSCs και να εμποδίζουν την ανάπτυξή τους. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα, άλλοι ερευνητές, και συγκεκριμένα η Bieback και οι συνεργάτες της, αναφέρουν απομόνωση MSCs από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα με ποσοστά επιτυχίας μεγαλύτερο του 60% (Bieback K et al., 2004). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων τους όμως, προκύπτει ότι απομόνωσαν κύτταρα σε λιγότερο από τα μισά τους δείγματα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις σε λιγότερο από το ένα τρίτο, γεγονός που μεταφράζει τα πραγματικά τους ποσοστά επιτυχίας σε 30-50%. Το 60% που αναφέρθηκε οφείλεται στο ότι προσμετρήθηκαν ως «επιτυχίες» όλες οι διακριτές αποικίες MSCs ακόμα κι αν 2 ή περισσότερες από αυτές προήλθαν από την ίδια μονάδα ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Ανεξαρτήτως όμως από τον τρόπο υπολογισμού ή την ορθότητα των αποτελεσμάτων τους, οι «ιδανικές» συνθήκες που απαιτούνται κατά τους συγγραφείς προκειμένου να επιτευχθούν αντίστοιχα αποτελέσματα καθιστούν την υλοποίηση της μεθόδου τους ανέφικτη σε ευρεία κλίμακα για την παραγωγή MSCs για κλινικές εφαρμογές. Ειδικότερα, η επιτυχής απομόνωση των κυττάρων, εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από την εκτεταμένη χρήση εμβρυικού ορού μόσχου (*foetal calf serum, FCS*) τη στιγμή που επικρατεί η τάση

κατάργησης των ζωικών ορών σε κύτταρα που προορίζονται για κλινικές εφαρμογές. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη περί ακαταλληλότητας του ομφαλοπλακουντιακού αίματος ως πηγή MSCs.

1.2. Χαρακτηριστικά των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Από την περεταίρω ανάλυση των αποτελεσμάτων, φάνηκε ότι η μέθοδος της απομόνωσης δεν επηρεάζει ούτε το ρυθμό πολλαπλασιασμού ή τη δυνατότητα διατήρησης σε καλλιέργεια, αλλά ούτε και τα χαρακτηριστικά των απομονωμένων κυττάρων. Πράγματι, ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ομοιογενών κυτταρικών πληθυσμών που προέκυψαν με το πέρας της τρίτης ανακαλλιέργειας, έδειξε ότι όλα τα MSCs που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν επιτυχώς από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα παρουσίαζαν χαρακτηριστική διπολική, ατρακτοειδή μορφολογία, εξέφραζαν τους χαρακτηριστικούς μεσεγχυματικούς δείκτες και ήταν αρνητικά για τους αιμοποιητικούς δείκτες. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι εξέφραζαν τα γονίδια πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, *Oct-4*, *Nanog*, *Rex-1*, *LIF* και *FGF-2*. Παρόλο που έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι τα περισσότερα ή όλα από τα παραπάνω γονίδια εκφράζονται σε MSCs εμβρυϊκών ιστών κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης (Wang XY et al., 2008; Zheng C et al., 2009), σε MSCs του αμνιακού υγρού (Roubelakis MG et al., 2007) καθώς και σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς που απομονώνονται από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, όπως για παράδειγμα τα μικρά εμβρυονικοειδή βλαστικά κύτταρα (*very small embryonic-like stem cells*, *VSELs*) (Kucia M et al., 2007), είναι η πρώτη φορά που ο συνδυασμός των παραπάνω εξακριβώνεται σε MSCs που απομονώνονται από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα τελειόμηνων τοκετών. Έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια *Oct-4* (Niwa H et al., 2000) και *Nanog* (Chambers I et al., 2003; Mitsui K et al., 2003) σχετίζονται με την αυτοανανέωση, την πολυδυναμικότητα, καθώς και με τη διατήρησή των κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε ότι αυτοί οι δύο παράγοντες είναι από τους πλέον σημαντικούς για τη δημιουργία iPSC (Maherali N et al., 2007; Takahashi K and Yamanaka S, 2006; Wernig M et al., 2007). Παράλληλα το *Rex-1* ενεργοποιείται από το *Nanog* (Shi W et al., 2006) και η έκφρασή του οδηγεί και αυτή με τη σειρά της στην αναστολή της διαφοροποίησης (Bhandari DR et al., 2010). Κατά συνέπεια, η βιολογική σημασία της συνέκφρασης των γονιδίων αυτών στα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος είναι μεγάλη αφού ουσιαστικά αποδεικνύει το βλαστικό τους χαρακτήρα. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση των *LIF* και *FGF-2* φαίνεται να προσδίδει στα MSCs κάποιες από τις

κύριες ιδιότητές τους. Είναι πλέον γνωστό ότι για τις καλλιέργειες εμβρυονικών ή άλλων βλαστικών κυττάρων (π.χ. αιμοποιητικών) είναι απαραίτητη η παρουσία τροφικής στοιβάδας ινοβλαστών ή άλλων κυττάρων μεσοδερμικής προέλευσης που εκκρίνουν τον *LIF* (Ogawa K et al., 2004). Ο παράγοντας αυτός διατηρεί τα βλαστικά κύτταρα της καλλιέργειας αδιαφοροποίητα. Συνεπώς η δυνατότητα χρήσης των MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος ως τροφική στοιβάδα για τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων (Jang YK et al., 2006; Mehrasa R et al., 2014) οφείλεται πιθανότατα στην έκκριση του *LIF*. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το *LIF* παίζει ρόλο και στην ανοσορρυθμιστική δράση των MSCs και ειδικότερα στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων (Nasef A et al., 2008). Όσον αφορά τον *FGF-2*, ο αυξητικός αυτός παράγοντας προάγει την οστεογένεση και την χονδρογένεση (Lee TJ et al., 2013). Φαίνεται επίσης ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην επούλωση των τραυμάτων (Broadley KN et al., 1989; Ortega S et al., 1998) προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση (Cao R et al., 2003) και πιθανώς να είναι από τους κύριους διαμεσολαβητές της αναγεννητικής δράσης των MSCs. Δεν αποκλείεται τέλος, τόσο το *LIF* όσο και το *FGF-2* να έχουν και αυτοκρινή δράση στις καλλιέργειες MSCs συμβάλλοντας στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων.

Ομοίως με τα φαινοτυπικά και τα γονοτυπικά χαρακτηριστικά των MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, ούτε η ικανότητα διαφοροποίησής τους φάνηκε να επηρεάζεται από τη μέθοδο απομόνωσης. Ωστόσο η παρατήρηση αυτή αποδείχθηκε δευτερευούσης σημασίας καθότι μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η ιδιότητα της διαφοροποίησης των κυττάρων καθεαυτή. Πράγματι, τα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, διαφοροποιήθηκαν, σε όλες τις περιπτώσεις, σε οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα, αλλά παρουσίασαν περιορισμένη δυνατότητα λιπογένεσης. Παρόλο που το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί απόλυτα με άλλα δημοσιευμένα αποτελέσματα (Rebelatto CK et al., 2008), έρχεται σε αντίθεση με τα καθιερωμένα κριτήρια ορισμού των MSCs, τα οποία προϋποθέτουν τη διαφοροποίησή τους και στις τρεις κυτταρικές σειρές (Dominici M et al., 2006). Ενώ όμως η προϋπόθεση αυτή ισχύει για τα MSCs του μυελού των οστών, δε φαίνεται να εφαρμόζεται πλήρως όταν τα κύτταρα προέρχονται από άλλες πηγές. Ειδικότερα για τα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος έχουν παρατηρηθεί σημαντικές αποκλίσεις από τον κανόνα. Ο Guillot και οι συνεργάτες του, διαπίστωσαν ότι τα MSCs που προέρχονταν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, αν και έχουν τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με αυτά του μυελού των οστών, παρουσιάζουν

αυξημένη ικανότητα οστεογένεσης σε σχέση με αυτά (Guillot PV et al., 2008). Σε μία άλλη συγκριτική μελέτη παρατηρήθηκε, από την ομάδα του Kern, πλήρης αδυναμία των MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, ακόμα και όταν καλλιεργήθηκαν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα σε συνθήκες που επάγουν τη λιπογένεση (Kern S et al., 2006). Αντίθετα, αυτά που απομονώθηκαν από το λιπώδη ιστό και το μυελό των οστών διαφοροποιούνταν εύκολα και άμεσα. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από τη Manca και τους συνεργάτες της, οι οποίοι σε δείγμα 24 μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος δεν κατάφεραν να απομονώσουν μεσεγχυματικά κύτταρα με δυνατότητα λιπογένεσης παρόλο που τα διαφοροποίησαν επιτυχώς σε οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα (Manca MF et al., 2008). Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης σε συνδυασμό με τις παραπάνω παρατηρήσεις φαίνεται ότι διαφορετικής προέλευσης MSCs παρουσιάζουν αποκλίσεις στη δυνατότητα διαφοροποίησής τους. Πιο συγκεκριμένα, για τα εμβρυϊκής προέλευσης κύτταρα η περιορισμένη λιπογενετική τους ικανότητα θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι αύξηση της λιπογένεσης σχετίζεται με την ηλικία (Moerman EJ et al., 2004). Για το λόγο αυτό άλλωστε παρατηρούνται λιποκύτταρα στον μυελό των οστών των ενηλίκων αλλά όχι σε αυτόν των εμβρύων και των νεογνών.

1.3. Σύγκριση θρεπτικών υλικών για την καλλιέργεια των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Σε έναν δεύτερο χρόνο επιχειρήθηκε η βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας ώστε να επιταχυνθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των MSCs, με το σκεπτικό ότι ταχύτερη εξάπλωσή τους σε σχέση με τους ανεπιθύμητους πληθυσμούς, θα οδηγούσε τελικά στην επικράτησή τους και την επιτυχή απομόνωσή τους. Σε αντίστοιχες μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν και αφορούσαν MSCs του μυελού των οστών, διερευνήθηκαν διάφορες πτυχές της καλλιέργειας. Ο Sekiya με τους συνεργάτες του στηρίχθηκαν στην αρχική πυκνότητα των κυττάρων και τη διάρκεια της καλλιέργειας (Sekiya I et al., 2002) ενώ η Sotiropoulou και η ομάδα της προέβησαν στην ανάλυση πολλαπλών παραγόντων, από τον κατασκευαστή της φλάσκας καλλιέργειας έως τη σύσταση του θρεπτικού υλικού (Sotiropoulou PA et al., 2006b;2006c). Τέλος, άλλοι ερευνητές που μελέτησαν εναλλακτικές πηγές ορού, όπως για παράδειγμα αυτόλογους ή ομαδοποιημένους (*pooled*) αλλογενείς ορούς από περιφερικό αίμα ενηλίκων δωτών, διαπίστωσαν ότι ενώ ο αυτόλογος ορός επιτρέπει την ταχεία επέκταση των MSCs του μυελού των οστών (Muller I et al., 2006; Pochampally RR et al., 2004), η ανάμειξη των αλλογενών σταματά την

ανάπτυξη των κυττάρων (Shahdadfar A et al., 2005). Στα δεδομένα των μελετών αυτών βασίστηκαν και οι συνδυασμοί των θρεπτικών υλικών που συγκρίθηκαν με το MCM στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε ως βάση το a-MEM επειδή, όπως απέδειξε η Sotiropoulou με τους συνεργάτες της, υπερτερεί των άλλων θρεπτικών υλικών διευκολύνοντας την απομόνωση και επιταχύνοντας την ανάπτυξη των MSCs (Sotiropoulou PA et al., 2006c). Παράλληλα, επιχειρήθηκε η αντικατάσταση του FBS στις καλλιέργειες από ορό ανθρώπινης προέλευσης αλλά, σε αντίθεση με τους Muller, Pochampally και Shahdadfar που χρησιμοποίησαν ορό περιφερικού αίματος, προτιμήθηκε το CBS. Τα κύρια πλεονεκτήματα της λήψης του ορού από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, αντί του περιφερικού αίματος ενηλίκων, έχουν σχέση όχι μόνο με τη διαθεσιμότητα του βιολογικού αυτού υλικού αλλά πιθανότατα και με τη σύστασή του. Παρόλο που αυτή δεν έχει αναλυθεί επαρκώς, είναι πλέον γνωστό ότι το CBS είναι πλούσιο σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα επιδερμικούς (*epidermal growth factor* – EGF), ενδοθηλιακούς (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), ινοβλαστικούς (FGF), νευρικούς (*nerve growth factor* – NGF), ινσουλινοειδείς (*insulin like growth factor* - IGF), ιντερφερόνες και ιντερλευκίνες (Shetty P et al., 2007; Tekkatte C et al., 2011). Επίσης περιέχει λευκωματίνη, σιδηροφιλίνη, ινώδες, ανόργανα άλατα (Jeswani RM and Vani SN, 1991), γκρελίνη, αδιπονεκτίνη (Dundar NO et al., 2010), βιταμίνες A,E και βασικά λιπαρά οξέα (Kohlboeck G et al., 2011). Το σημαντικότερο όμως είναι πως υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποιοι από τους αυξητικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα οι EGF, NGF και IGF βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ομφαλοπλακουντιακό απ' ό,τι στο περιφερικό αίμα (Yoon KC et al., 2007) γεγονός που καθιστά το CBS, σε θεωρητικό τουλάχιστον επίπεδο, πολλά υποσχόμενο υποκατάστατο του FBS.

Από τους τρεις συνδυασμούς θρεπτικών υλικών – ορών που δοκιμάστηκαν, το MCM αποδείχθηκε το λιγότερο αποτελεσματικό καθώς δεν επέτρεπε την παρατεταμένη καλλιέργεια των MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Έχουν γίνει ελάχιστες απόπειρες σύγκρισης του θρεπτικού αυτού υλικού με άλλα και αφορούσαν κυρίως MSCs απομονωμένα από τον μυελό των οστών (Osipova EY et al., 2011). Η μοναδική μελέτη που πραγματοποιήθηκε με MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος ανέφερε αποτυχία καλλιέργειας των κυττάρων στο MCM (Bieback K et al., 2004) αλλά το δείγμα στο οποίο βασίστηκε ήταν πολύ μικρό (6 δείγματα). Κατά συνέπεια, δεν είναι ασφαλής η διεξαγωγή συγκρίσεων μεταξύ των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων και των αποτελεσμάτων της παρούσης διατριβής. Ωστόσο, οι παραπάνω παρατηρήσεις στο σύνολό τους, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το MCM είναι ακατάλληλο για την καλλιέργεια MSCs του ομφαλοπλακουντιακού

αίματος και η πλέον πιθανή εξήγηση έχει να κάνει με τη σύστασή του. Παρόλο που πρόκειται για εμπορικό προϊόν και η ακριβής σύνθεσή του παραμένει απόρρητη για τη διάρκεια ισχύος της πατέντας, είναι γνωστό ότι έχει σαν βάση ένα τροποποιημένο McCoy's Medium εμπλουτισμένο με FCS (Bieback K et al., 2004). Το McCoy's Medium, σε αντίθεση με το α-MEM που χρησιμοποιήθηκε στις υπόλοιπες καλλιέργειες, δεν περιέχει καθόλου νουκλεοτίδια ενώ η περιεκτικότητά του σε αμινοξέα, βιταμίνες και κάποια ανόργανα άλατα είναι δύο με τέσσερις φορές χαμηλότερη (Παράρτημα VI). Πιθανότατα λοιπόν να μην επαρκούν τα παρεχόμενα θρεπτικά συστατικά για τη συντήρηση ενός ταχύτατα διαιρούμενου κυτταρικού πληθυσμού, όπως είναι τα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

Κατά τη σύγκριση των άλλων δύο θρεπτικών υλικών, η μεγαλύτερη διάρκεια των καλλιεργειών MSCs προτού επέλθει κυτταρικός θάνατος παρατηρήθηκε όταν αυτά καλλιεργήθηκαν σε α-MEM με 20% CBS ενώ οι καλλιέργειες σε α-MEM - 20% FBS παρουσίασαν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά ως προς το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και τη μέγιστή τους διάρκεια. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι τα MSCs που καλλιεργήθηκαν σε α-MEM με 20% CBS, υπέστησαν κατά το διάστημα στο οποίο διατηρήθηκαν, σε καλλιέργεια 20 διπλασιασμούς του πληθυσμού τους, όπως ακριβώς και τα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε α-MEM - 20% FBS ενώ, δεν παρουσιάστηκε καμία διαφοροποίηση στον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων. Συνολικά, οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδηλώνουν, ότι το CBS θα μπορούσε να αντικαταστήσει το FBS στις καλλιέργειες MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, γεγονός που επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και από αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Shetty και τους συνεργάτες του (Shetty P et al., 2007). Η αντικατάσταση ζωικών ορών από ορούς ανθρώπινης προέλευσης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για μελλοντικές κλινικές εφαρμογές των κυττάρων. Επί του παρόντος, επικρατεί ανησυχία ότι οι ζωικοί οροί στις καλλιέργειες κυττάρων που χορηγούνται σε ασθενείς θα μπορούσαν να μεταδώσουν ασθένειες ιογενούς (Erickson GA et al., 1991), βακτηριακής (Simonetti AB et al., 2007) ή πριοντικής αιτιολογίας. Επιπλέον δεν αποκλείεται κάποια αναφυλακτική αντίδραση ή άλλου είδους ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε ζωικές πρωτεΐνες (Selvaggi TA et al., 1997), ειδικά από τη στιγμή που έχει αποδειχθεί ότι όταν χορηγούνται MSCs καλλιεργημένα σε FBS σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, αυτοί παράγουν αντισώματα έναντι ζωικών αντιγόνων (Sundin M et al., 2007). Ακόμα κι αν αυτές οι ανησυχίες αποδειχθούν αβάσιμες, παραμένει το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη διακύμανση στη σύσταση σε κάθε παρτίδα FBS, η οποία επηρεάζει συχνά τη φαινοτυπική και γονοτυπική σταθερότητα των καλλιεργημένων κυττάρων (Jochems

CE et al., 2002). Κατά συνέπεια, ανθρωπίνοι οροί ή παράγωγά τους θα μπορούσαν να προσφέρουν τη λύση σε ένα δυσεπίλυτο, προς ώρας, πρόβλημα και το CBS αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική περίπτωση.

2. Ο ομφάλιος λώρος ως πηγή απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων.

2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου

Αντίθετα απ' ότι ίσχυσε με το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, η απομόνωση των MSCs από τον ομφάλιο λώρο αποδείχθηκε ευκολότερη. Αρχικά δοκιμάστηκε η μέθοδος της ενζυματικής πέψης της Wharton's Jelly επειδή είχε ήδη περιγραφεί από τους Lu LL και Wang HS (Lu LL et al., 2006; Wang HS et al., 2004). Παρόλο που οι δύο αυτές ομάδες είχαν αναφερθεί στη δυνατότητα απομόνωσης MSC από τον ομφάλιο λώρο δεν είχαν ποτέ διερευνηθεί οι ιδανικές συνθήκες καλλιέργειάς τους. Για το λόγο αυτό, σε ένα προκαταρκτικό στάδιο μελετήθηκε, όπως ακριβώς και στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα, η επίδραση συνδυασμού θρεπτικών υλικών και ορών.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρεμφερή με αυτά που προαναφέρθηκαν για το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Συνοπτικά, το MCM αποδείχθηκε το πλέον ακατάλληλο για την καλλιέργεια MSCs ομφαλίου λώρου, λόγω του χαμηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της αδυναμίας διατήρησής τους σε καλλιέργεια για διάστημα μεγαλύτερο των 26 ημερών, ενώ και τα συνολικά ποσοστά επιτυχίας των καλλιεργειών σε MCM ήταν τα χαμηλότερα. Αντίστροφα το α-MEM με FBS αποδείχθηκε το πλέον αποτελεσματικό. Παρατηρήθηκε δε μια αναλογία της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων σε σχέση με τη συγκέντρωση του ορού που χρησιμοποιήθηκε. Τέλος το α-MEM με 20% CBS ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από το FBS επειδή, αν και επέτρεψε τη διατήρηση των καλλιεργειών για μεγάλο χρονικό διάστημα, ο πολλαπλασιασμός των MSCs ήταν βραδύτερος. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της σύγκρισης των θρεπτικών υλικών τόσο στα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, όσο και σε αυτά του ομφαλίου λώρου, καθίσταται πλέον σαφές, αφενός ότι η σύνθεση του MCM, έχει την ίδια επίδραση σε όλα τα MSCs εμβρυϊκής προέλευσης, αφετέρου δε ότι το CBS θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των ζωικών ορών στις κυτταροκαλλιέργειες εμβρυϊκών MSCs γενικότερα, αφού επιτρέπει τη διατήρησή τους

και τον πολλαπλασιασμό τους χωρίς να επηρεάζει τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητές τους.

2.2. Σχεδιασμός, υλοποίηση και επικύρωση, πρωτοκόλλου κρυοσυντήρησης Μεσεγγυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου.

Η επιβεβαίωση της δυνατότητας απομόνωσης MSCs από τον ομφάλιο λώρο, οδήγησε στο σχεδιασμό ενός πρωτόκολλου που θα επέτρεπε τη συστηματική απομόνωσή τους αλλά και την κρυοσυντήρησή τους για μελλοντική κλινική χρήση. Πρόσφατες μελέτες, έχουν συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των ιδανικών συνθηκών απομόνωσης (Salehinejad P et al., 2012; Yoon JH et al., 2013) και κρυοκατάψυξης (Balci D and Can A, 2013; Da-Croce L et al., 2013) των MSCs του ομφαλίου λώρου. Ωστόσο, η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί την πρώτη, και μοναδική μέχρι στιγμής, απόπειρα να εξεταστούν ταυτόχρονα οι δύο αυτές κρίσιμες παράμετροι. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η απομόνωση MSCs για κλινικές εφαρμογές προϋποθέτει την απόκτηση ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων, σε όσον το δυνατό μικρότερο διάστημα διότι παρατεταμένη παραμονή τους σε συνθήκες καλλιέργειας μπορεί να οδηγήσει σε συσώρευση γενετικών ανωμαλιών (Ho AD et al., 2005) ή καταστροφή των κυττάρων λόγω γήρανσης. Πράγματι, πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεταβολές τις οποίες υπόκεινται τα MSCs κατά την καλλιέργειά τους ταυτίζονται με τις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα *in vivo* εξαιτίας της γήρανσης του οργανισμού (Wagner W et al., 2009). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι κονταίνουν τα τελομερή τους (Baxter MA et al., 2004), αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και την απόπτωση σε βάρος των γονιδίων που ελέγχουν τη μίτωση (Schallmoser K et al., 2010) και μεταβάλλεται το προφίλ μεθυλίωσης του DNA (Bork S et al., 2010) με αποτέλεσμα την απώλεια της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και την απώλεια των ιδιοτήτων τους. Ως εκ τούτου αλλά και λόγω του γεγονότος ότι η παραγωγή του CBS οδηγεί στην καταστροφή μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, επιλέχθηκε το α-MEM με FBS για τη συνέχιση των πειραμάτων και τη μελέτη των WJ-MSC. Συνήθως τα καθιερωμένα πρωτόκολλα καλλιέργειας και επέκτασης MSCs χρησιμοποιούν συγκεντρώσεις ορού που κυμαίνονται μεταξύ του 10 και 20% (Chamberlain G et al., 2007; Meuleman N et al., 2006). Δεδομένου ότι από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα φάνηκε ότι η επίδραση του FBS στα κύτταρα ήταν ποσοτική, προτιμήθηκε η συγκέντρωση 15% προκειμένου να επιτευχθεί η γρήγορη επέκταση των κυττάρων περιορίζοντας όσο το δυνατόν την κατανάλωση ορού. Εξάλλου,

πρόσφατες συγκριτικές μελέτες σε MSCs άλλων θηλαστικών (Ayatollahi M et al., 2012; Eslaminejad MB et al., 2009), αλλά και παλαιότερες σε ανθρώπινα κύτταρα του αμνιακού υγρού (Felix JS et al., 1974), έδειξαν ότι η επίδραση του ορού στα κύτταρα μεγιστοποιείται στο 15% και περεταίρω αύξηση δεν συνοδεύεται από μεταβολή των χαρακτηριστικών των καλλιιεργειών. Η επιλογή αυτής της συγκέντρωσης επικυρώθηκε εκ των υστέρων ταυτόχρονα με τη σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης MSC από τον ομφάλιο λώρο.

2.2.1. Σύγκριση μεθόδων απομόνωσης

Αρχικά, από τη σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης διαπιστώθηκε ότι τόσο η ενζυματική πέψη όσο και οι ιστοκαλλιέργειες, επέτρεπαν τη λήψη ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων. Ωστόσο, τα WJ-MSCs που προήλθαν με τη μέθοδο των ιστοκαλλιιεργειών, παρουσίασαν ταχύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με πρόσφατη μελέτη που έδειξε καλύτερη απόδοση των ιστοκαλλιιεργειών και μεγαλύτερη βιωσιμότητα των απομονωμένων MSCs σε σχέση με την ενζυματική πέψη (Yoon JH et al., 2013). Μια πιθανή εξήγηση έχει σχέση με την ενζυματική πέψη (Yoon JH et al., 2013). Μια πιθανή εξήγηση έχει σχέση με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στον οποίο βρίσκονται τα WJ-MSCs κατά την ολοκλήρωση της απομόνωσης. Τα PII WJ-MSCs απομονώθηκαν με ιστοκαλλιέργεια, κατά την ολοκλήρωση της οποίας τα κύτταρα που ελήφθησαν ήταν σε εκθετική φάση πολλαπλασιασμού. Έτσι, από την έναρξη κιόλας των πρωτογενών τους καλλιιεργειών τα PII WJ-MSCs πολλαπλασιάζονταν και γρήγορα κάλυψαν την επιφάνεια καλλιέργειας. Αντίθετα τα PI WJ-MSCs απομονώθηκαν πρακτικά άμεσα, από έναν ιστό (ομφάλιο λώρο) στον οποίο δεν πολλαπλασιάζονταν. Κατά συνέπεια, στις πρωτογενείς τους καλλιέργειες τα PI WJ-MSCs παρέμειναν για κάποιο διάστημα σε λανθάνουσα φάση προτού ενεργοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός τους με αποτέλεσμα να μεγαλώσει η διάρκεια που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση των καλλιιεργειών. Ωστόσο, ανεξαρτήτως της μεθόδου απομόνωσης τα WJ-MSCs παρουσίαζαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά MSCs, δηλαδή διπολικό ή ατρακτοειδές σχήμα, με μεγάλους πυρήνες, πολλούς και έντονα κεχρωσμένους πυρηνίσκους ενώ το κυτταρόπλασμά τους ήταν λεπτό με λιπιδικά έγκλειστα. Ο ανοσοφαινοτυπικός τους έλεγχος επιβεβαίωσε τον μεσεγχυματικό τους χαρακτήρα, καθώς εξέφραζαν τους δείκτες επιφανείας CD105, CD93, CD70, CD29, CD44, CD51, CD58, και το αντιγόνο HLA τάξης I, ενώ ήταν αρνητικά για τους αιμοποιητικούς δείκτες CD45, CD34 και το αντιγόνο HLA τάξης II. Παράλληλα, όπως και τα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, έτσι και τα WJ-MSCs εξέφραζαν τα γονίδια *Oct-4*, *Nanog*, *LIF* και το *FGF-2*. Τα τρία πρώτα από τα γονίδια αυτά έχουν διαπιστωθεί μεμονωμένα και από

άλλους ερευνητές σε κύτταρα του ομφαλίου λώρου (Lu LL et al., 2006; Yoon JH et al., 2013) γεγονός που επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης και αποδεικνύει την πολυδυναμικότητα και το βλαστικό χαρακτήρα των WJ-MSCs. Το σύνολο των παραπάνω μορφολογικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας αποδεικνύοντας ότι είναι εφικτή η επέκταση των MSCs του ομφαλίου λώρου.

Επιπλέον, τα απομονωμένα κύτταρα του ομφαλίου λώρου είχαν και τις ιδιότητες των MSCs αφού μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα αλλά δεν διαφοροποιήθηκαν πλήρως σε λιποκύτταρα στις 21 ημέρες που διήρκησε η επαγωγή της λιπογένεσης. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τη δημοσιευμένη μελέτη του Zhang και των συνεργατών του που ανέφερε ότι τα WJ-MSCs έχουν αυξημένη δυνατότητα διαφοροποίησης σε οστεοκύτταρα σε σχέση με τα MSCs του μυελού των οστών, αλλά δεν διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα (Zhang ZY et al., 2009). Παράλληλα, τα αποτελέσματα διαφοροποίησης των κυττάρων τόσο του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, όσο και του ομφαλίου λώρου έρχονται να επιβεβαιώσουν μελέτες που αναφέρουν ότι τα MSCs εμβρυϊκής προέλευσης παρουσιάζουν περιορισμένη δυνατότητα λιπογένεσης (Karahuseyinoglu S et al., 2007; Ragni E et al., 2013). Γενικότερα, φάνηκε από τη μελέτη των MSCs που απομονώθηκαν από τις δύο εμβρυϊκές πηγές, ότι μοιράζονται τα βασικά τους χαρακτηριστικά και ιδιότητες.

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αποτελεσμάτων της απομόνωσης WJ-MSCs, διαπιστώνεται ότι προέκυψαν δύο ισοδύναμες μέθοδοι, η ενζυματική πέψη και οι ιστοκαλλιέργειες της Wharton's Jelly. Εξάλλου και οι δύο έχουν χρησιμοποιηθεί από διαφορετικές ομάδες με μεγάλη επιτυχία (Lindenmair A et al., 2012). Κατά συνέπεια, η τελική επιλογή της μεθόδου μπορεί να βασιστεί μόνο σε δευτερεύοντα, και πιο υποκειμενικά κριτήρια, όπως είναι για παράδειγμα το οικονομικό κόστος (η χρήση ενζύμων ανεβάζει το κόστος επεξεργασίας), η διαχείριση του φόρτου εργασίας σε κάθε εργαστήριο καθώς και η εμπειρία του κάθε εκάστοτε ερευνητή σε αντίστοιχες μεθόδους απομόνωσης. Τέλος, αν και δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής τοξική επίδραση των ενζύμων στα απομονωμένα κύτταρα, η μέθοδος των ιστοκαλλιεργειών, λόγω της απουσίας ενζυματικής πέψης, περιορίζει την ανθρώπινη παρέμβαση στα κύτταρα, έχει λιγότερα βήματα (και κατά συνέπεια λιγότερες δυσκολίες στο «στήσιμο» της μεθόδου), λιγότερες παραμέτρους που πρέπει να ελεγχθούν και θα έπρεπε ίσως να προτιμηθεί. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρει η Ifitimia-Mander, η τεχνική των ιστοκαλλιεργειών έχει πιο σταθερή απόδοση γιατί

επηρεάζεται λιγότερο από παραμέτρους που έχουν σχέση με την ποιότητα του αρχικού βιολογικού υλικού (Iftimia-Mander A et al., 2013).

2.2.2. Κρυοσυντήρηση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφαλίου λώρου

Εν συνεχεία, τα καλλιεργημένα WJ-MSCs καταψύχθηκαν και όταν αποψύχθηκαν έπειτα από 1 εβδομάδα, 1 μήνα και 6 μήνες, διαπιστώθηκε ότι διατηρούσαν τη βιωσιμότητά τους σε υψηλά επίπεδα και ξανακαλλιεργήθηκαν επιτυχώς, είτε είχαν απομονωθεί με ενζυματική πέψη είτε με ιστοκαλλιέργειες. Ωστόσο, στις καλλιέργειες των αποψυγμένων FP-II WJ-MSCs παρατηρήθηκε μια μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους μετά από όλες τις περιόδους κρυοσυντήρησης που εξετάστηκαν. Και σε αυτήν την περίπτωση, η διαφορά που προκύπτει οφείλεται πιθανότατα στην κινητική των καλλιεργιών. Έτσι, ενώ στις καλλιέργειες πριν την κατάψυξη, τα P-II WJ-MSCs βρίσκονταν συνεχώς σε φάση εκθετικού πολλαπλασιασμού, μετά την απόψυξή τους, τα καλλιεργημένα FP-II WJ-MSCs πέρασαν μια λανθάνουσα φάση προτού ενεργοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός τους, γεγονός που επιμήκυνε τη συνολική διάρκεια των καλλιεργιών. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να ενισχύεται από την πρωτεομική ανάλυση που πραγματοποίησε η ομάδα του Di Giuseppe σε WJ-MSCs πριν και μετά την κατάψυξη. Αυτό που διαπίστωσαν ήταν ότι αμέσως μετά την κατάψυξη, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων είχε μεταβληθεί και αντί να εκφράζονται οι πρωτεΐνες των μονοπατιών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εκφράζονταν πρωτεΐνες που σχετίζονταν με την αντοχή και την άμυνα στις ακραίες θερμοκρασίες καθώς και με την επιβίωση των κυττάρων (Di Giuseppe F et al., 2014). Η αλλαγή λοιπόν στην πρωτεϊνική έκφραση και η επαναφορά της στα προ-κατάψυξης επίπεδα, θα μπορούσε να εξηγήσει ικανοποιητικά τη λανθάνουσα φάση που παρατηρήθηκε κατά την απόψυξη.

Μικρές διαφορές παρατηρήθηκαν και στα ποσοστά έκφρασης κάποιων αντιγονικών δεικτών στα κρυοσυντηρημένα κύτταρα, όμως συνολικά οι μετρήσεις χαρακτηρίζονταν από μεγάλη τυπική απόκλιση. Για παράδειγμα, το CD51, παρόλο που ήταν θετικό σε όλα τα δείγματα, παρουσίασε διακυμάνσεις όσες φορές μετρήθηκε. Ομοίως, η μέτρηση του ποσοστού έκφρασης του CD44, το οποίο βρέθηκε να είναι χαμηλότερο στα κρυοσυντηρημένα για 1 μήνα FP-II WJ-MSCs, παρουσίαζε πολύ μεγάλη τυπική απόκλιση. Τέλος, άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές, και πιο συγκεκριμένα στα ποσοστά έκφρασης του CD29 και του CD90 στα κρυοκατεψυγμένα για 1 και 6 μήνες FP-I WJ-MSCs αντιστοίχως, δεν φάνηκε να έχουν κάποια βιολογική σημασία. Γενικότερα όμως, όλα τα κύτταρα μετά την

απόψυξη ήταν θετικά για τους μεσεγγυματικούς και αρνητικά για τους αιμοποιητικούς δείκτες για τους οποίους εξετάστηκαν. Παράλληλα, ο μικροσκοπικός έλεγχος, ο γονιδιακός έλεγχος και οι δοκιμασίες διαφοροποίησης, δεν κατέδειξαν καμία διαφορά ανάμεσα στα αποψυγμένα FP-I ή FP-II WJ-MSCs και τα πριν την κρυοσυντήρηση P-I ή P-II WJ-MSCs αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα λίγα δημοσιευμένα αποτελέσματα σχετικά με την κατάψυξη των καλλιεργημένων WJ-MSCs. Ο Gong με τους συνεργάτες του, ανέφερε επιτυχή επέκταση των MSCs μετά από την κατάψυξή τους, με τη μέση βιωσιμότητα στην απόψυξη να ανέρχεται στο 75% (Gong W et al., 2012), ποσοστό που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Ταυτόχρονα, άλλες ερευνητικές ομάδες ενισχύουν τα πειραματικά αυτά δεδομένα αφού διαπίστωσαν επανειλημμένως διατήρηση των ιδιοτήτων των MSCs στα κρυοσυντηρημένα κύτταρα (de Lima Prata K et al., 2012; Fong CY et al., 2010; Majore I et al., 2011). Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παρατηρήσεις στο σύνολό τους, διαπιστώνεται ότι τα MSCs του ομφαλίου λώρου μπορούν να καταψυχθούν επιτυχώς και να ξανακαλλιεργηθούν έπειτα από απόψυξη, διατηρώντας τα χαρακτηριστικά τους και τις ιδιότητές τους.

Αντίθετα με την επιτυχημένη κατάψυξη των καλλιεργημένων WJ-MSCs, η απόπειρα κρυοσυντήρησης εναιωρήματος κυττάρων που προήλθαν από ενζυματική πέψη του ομφαλίου λώρου, χωρίς να έχει προηγηθεί καλλιέργειά τους, χαρακτηρίστηκε από αποτυχία. Μόνο από δύο δείγματα κατέστη δυνατό να καλλιεργηθούν κύτταρα, τα οποία όμως χαρακτηρίζονταν από χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και διαφοροποιημένα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον οι καλλιέργειες δεν ολοκληρώθηκαν αφού ο πολλαπλασιασμός των F WJ-MSCs σταμάτησε προτού σχηματιστεί ταπήτιο. Δυστυχώς δεν υπάρχουν αντίστοιχες δημοσιευμένες μελέτες που να διευκολύνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μοναδική μελέτη που να αφορά κατάψυξη MSCs αμέσως μετά από την ενζυματική πέψη του ιστού προέλευσής τους, έχει πραγματοποιηθεί σε δείγματα οδοντικού πολφού και έδειξε ότι τα αποψυγμένα κύτταρα είχαν μικρή βιωσιμότητα, περιορισμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και μορφολογία που παρέπεμπε σε αδρανή κύτταρα (Woods EJ et al., 2009). Ακόμα όμως κι αν δεν είναι συγκρίσιμες οι πειραματικές συνθήκες, η ομοιότητα των αποτελεσμάτων εμφανίζει μια σαφή τάση. Ενδεχομένως, η υποβολή των κυττάρων διαδοχικά, στο στρες της ενζυματικής πέψης και στο στρες της κατάψυξης να επηρέασε την ικανότητα επιβίωσής τους, κάτι που δεν ίσχυε όταν τα κύτταρα είχαν καλλιεργηθεί και αφενός είχαν ανακάμψει από την επίδραση των ενζύμων, αφετέρου δε βρίσκονταν σε φάση ανάπτυξης, με έντονα

ενεργό μεταβολισμό, όταν καταψύχθηκαν. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να ενισχύεται και από τη χαμηλή βιωσιμότητα που μετρήθηκε στα αποψυγμένα F WJ-MSCs.

Τέλος κατά τη μελέτη της απομόνωσης/κρυοκατάψυξης των WJ-MSCs, διαπιστώθηκε η αδυναμία απομόνωσής τους από κατεψυγμένα ιστοτεμάχια ομφαλίου λώρου. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με αναφορές άλλων ερευνητικών ομάδων που φέρονται να έχουν απομονώσει επιτυχώς MSCs από κατεψυγμένα ιστοτεμάχια (Choudhery MS et al., 2013; Da-Croce L et al., 2013; Friedman R et al., 2007; Roy S et al., 2014). Παρόλα αυτά, η Da-Croce με την ομάδα της ανέφεραν σημαντικές μορφολογικές αλλοιώσεις στα κρυοσυντηρημένα ιστοτεμάχια καθώς και χαμηλή βιωσιμότητα των απομονωμένων κυττάρων (Da-Croce L et al., 2013) ενώ ο Roy και η ομάδα του δεν κατάφεραν να έχουν την ίδια απόδοση στον κατεψυγμένο και το φρέσκο ιστό (Roy S et al., 2014). Αυτές οι διαφορές αποτελεσμάτων πιθανώς να οφείλονται στις διαφορετικές μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν από την κάθε ερευνητική ομάδα, καθώς η Da-Croce τονίζει την ανάγκη βελτίωσης των συνθηκών κατάψυξης και ειδικότερα τον καθορισμό της συγκέντρωσης υπερπροστατευτικού υλικού και του ρυθμού ψύξης του ιστού (Da-Croce L et al., 2013). Πιθανότητα, οι δύο αυτές παράμετροι να μην μας επέτρεψαν την αναπαραγωγή των παρατηρήσεών τους. Μία άλλη υπόθεση ωστόσο στηρίζεται στην κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα μέσα στον ιστό. Κατά τη μελέτη της κρυοσυντήρησης των MSCs του μυελού των οστών από τον Xu και τους συνεργάτες του διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που βρισκόταν σε εναιώρημα, ήταν πιο ανθεκτικά στο κρυοπροστατευτικό και την ψύξη απ' ότι τα προσκολλημένα κύτταρα. Αιτία ήταν η δομή του κυττάρου, η οργάνωση του κυτταροσκελετού και των οργανιδίων στο κυτταρόπλασμα που αύξανε την ανθεκτικότητα των σφαιρικών κυττάρων του εναιωρήματος έναντι των επίπεδων προσκολλημένων MSCs (Xu X et al., 2012). Δεδομένου ότι μέσα στον ιστό του ομφαλίου λώρου τα WJ-MSCs είναι προσκολλημένα και έχουν τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα *in vitro* καλλιεργημένα κύτταρα, δεν αποκλείεται να παρουσιάζουν και μειωμένη ανθεκτικότητα στη διαδικασία της κρυοκατάψυξης. Ανεξάρτητα όμως από αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω, η κατάψυξη κυττάρων αντί των ιστοτεμαχίων φαίνεται να αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για την κλινική χρήση των WJ-MSCs καθώς παρέχει τη δυνατότητα φύλαξης ενός πλήρως ελεγμένου, χαρακτηρισμένου και έτοιμου προς χρήση βιολογικού υλικού.

2.3. Εποικισμός ικριωμάτων κολλαγόνου από Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα του ομφαλίου λώρου

Στο τελευταίο σκέλος αυτής της μελέτης εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης των WJ-MSCs σε συνδυασμό με βιοαπορροφήσιμα ικριώματα κολλαγόνου. Το κολλαγόνο είναι η πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στα θηλαστικά και προσδίδει στους περισσότερους ιστούς τις μηχανικές και δομικές τους ιδιότητες (Gelse K et al., 2003). Ικριώματα κολλαγόνου σε διάφορες μορφές, χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη λείων μυϊκών ινών (Song J et al., 2000), ηπατικών (Michalopoulos G and Pitot HC, 1975), ενδοθηλιακών (Weinberg CB and Bell E, 1986) και επιθηλιακών κυττάρων (Winder SJ et al., 1992) ενώ πορώδη ικριώματα υποστηρίζουν την *in vitro* και *in vivo* αναγέννηση ιστών του μυοσκελετικού, δηλαδή οστών (Rodrigues CV et al., 2003), τενόντων (Kall S et al., 2004) και χόνδρων (Chen G et al., 2004). Επιπλέον, είναι διαπερατά και υδρόφιλα ώστε να διευκολύνουν την κυκλοφορία και την εγκατάσταση των κυττάρων καθώς και τη τροφοδοσία τους με θρεπτικό υλικό, ενώ παρουσιάζουν ελάχιστη αντιγονικότητα (Cooperman L and Michaeli D, 1984; DeLustro F et al., 1986). Κατά συνέπεια οι ιδιότητες του συγκεκριμένου υλικού αλλά και το γεγονός της έντονης παρουσίας του στους συνδετικούς ιστούς, αποτέλεσαν τους σημαντικότερους λόγους της επιλογής των ικριωμάτων κολλαγόνου. Από τους ιστολογικούς ελέγχους που έγιναν προκειμένου να διαπιστωθεί ο *in vitro* εποικισμός του από τα κύτταρα, φάνηκε ότι μόνο η δυναμική μέθοδος καλλιέργειας επέτρεπε την εν τω βάθει διείσδυση του ικριώματος από τα WJ-MSCs. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων, οι οποίες διαπίστωσαν ότι η δυναμική μέθοδος καλλιέργειας ενισχύει τον εποικισμό των πορώδων ικριωμάτων (Schliephake H et al., 2009; Weinand C et al., 2009; Xiao YL et al., 1999). Επιπλέον η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική καθώς η αποτελεσματικότητα του εποικισμού μπορεί να αποτελέσει κρίσιμη παράμετρο όταν ο αριθμός των διαθέσιμων κυττάρων είναι μικρός (Weinand C et al., 2009) ενώ φαίνεται να συνδέεται και με την *in vivo* αναγέννηση του ιστού (Schliephake H et al., 2009). Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν τη δυνατότητα χρήσης των WJ-MSCs σε συνδυασμό με ικριώματα. Αντίστοιχες κατασκευές χρησιμοποιούνται σε κλινικές εφαρμογές εμβιομηχανικής για την ανάπλαση ιστών όπως οι χόνδροι (Frenkel SR and Di Cesare PE, 2004), τα οστά (Olivier V et al., 2004) ή ακόμα και ολόκληρης τραχείας (Macchiarini P et al., 2008) με διαφοροποιημένα MSCs του μυελού των οστών του ίδιου του ασθενούς. Τελευταίες πιο σύγχρονες τεχνικές χρησιμοποιούν αδιαφοροποίητα MSCs του μυελού των οστών προκειμένου να επιτύχουν το ίδιο αποτέλεσμα (Bray LJ et al.,

2012; Mendez JJ et al., 2014; Reichert JC et al., 2012). Τα WJ-MSCs θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην περαιτέρω εξέλιξη των εφαρμογών αυτών, αφενός μεν χάρη στις εγγενείς ιδιότητες των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, αφετέρου δε λόγω της μοναδικής δυνατότητας που προσφέρουν της «εφ' άπαξ» συλλογής, τους κατά τον τοκετό, και φύλαξής τους για ενδεχόμενη μελλοντική χρήση .

3. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, η παρούσα Διδακτορική Διατριβή, απέδειξε ότι MSCs υπάρχουν στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα, αλλά με τις υπάρχουσες τεχνικές η απομόνωσή τους είναι δύσκολη και πρακτικά ασύμφορη. Αντιθέτως, δείχθηκε ότι ο ομφάλιος λώρος αποτελεί καλή πηγή MSCs για κλινικές εφαρμογές ιστικής ανάπλασης και ότι τα κύτταρα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική επιλογή για τις τεχνικές Ιστομηχανικής στην Αναγεννητική Ιατρική. Επιπλέον, στα πλαίσια του πρωτοκόλλου απομόνωσης και κατάψυξης που αναπτύχθηκε, η Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, έχει ήδη ξεκινήσει τη λειτουργία Τράπεζας Μεσεγχυματικών Κυττάρων για οικογενειακή χρήση. Τέλος διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια MSCs μπορεί να γίνει χωρίς τη χρήση ζωικών ορών, χρησιμοποιώντας ως υποκατάστατο τον ορό ομφαλοπλακουντιακού αίματος.

4. Μελλοντικές προοπτικές

Για την περεταίρω εξέλιξη και ανάπτυξη της χρήσης των MSCs στην αναγεννητική ιατρική θα πρέπει να επικεντρωθούν οι μελλοντικές μελέτες σε τρεις βασικούς άξονες. Ο πρώτος άξονας αφορά την ανάπτυξη τεχνικών και μεθόδων που θα επιτρέψουν την αποτελεσματική απομόνωση των MSCs και από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Μπορεί σήμερα να υπάρχουν άλλες πηγές MSCs πιο αποδοτικές, που να επιτρέπουν την εύκολη απομόνωση των κυττάρων, ωστόσο δεν πρέπει να παραγνωρίζεται το γεγονός ότι τα MSCs διαφορετικής προέλευσης παρουσιάζουν μικρές, αλλά ενδεχομένως σημαντικές ως προς τις θεραπευτικές τους ιδιότητες διαφορές. Για παράδειγμα, σε μια πρόσφατη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και του ομφαλίου λώρου από τον ίδιο δότη, ο Secco και η ομάδα του έδειξαν ότι ενώ στα πρώτα εκφράζονται πιο έντονα γονίδια που σχετίζονται με την οστεογένεση και με ανοσολογικούς μηχανισμούς, στα WJ-MSCs εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό γονίδια των οδών

αγγειογένεσης και νευρογένεσης (Secco M et al., 2009). Ο Raicevic από την πλευρά του επικεντρώθηκε στη σύγκριση των ανοσολογικών ιδιοτήτων των MSCs του ομφαλίου λώρου, του λιπώδους ιστού και του μυελού των οστών όπου παρατήρησε ουσιαστικές διαφορές. Παρόλο που όλα τα κύτταρα είχαν τη βασική ανοσορρυθμιστική ιδιότητα των MSCs, τα WJ-MSCs παρουσίαζαν διαφορετικό προφίλ έκφρασης υποδοχέων TLR (Toll-Like receptors) και ως εκ τούτου αντιδρούσαν με διαφορετικό τρόπο στις κυτταροκίνες της φλεγμονής και η ανοσοκατασταλτική τους δράση δεν επηρεαζόταν από την ενεργοποίηση των TLR. Παράλληλα διαφορές υπήρχαν στην απόκριση στη φλεγμονή και ανάμεσα στα MSCs του λιπώδους ιστού και αυτά του μυελού των οστών (Raicevic G et al., 2011). Ένα άλλο παράδειγμα αφορά τις εκκρινόμενες κυτταροκίνες, καθώς ένας σημαντικός αριθμός εργασιών έχει δείξει διαφορές τόσο στο είδος όσο και στην αναλογία των εκκρινόμενων παραγόντων από MSCs που προέρχονται από διαφορετικές πηγές. (Hwang JH et al., 2009; Troyer DL and Weiss ML, 2008; Wegmeyer H et al., 2013). Κατά συνέπεια, αντί να αναζητείται η «ιδανική» πηγή για την απομόνωση MSCs για όλες τις κλινικές εφαρμογές, θα ήταν πιο χρήσιμο να μελετηθούν σε βάθος όλες, προκειμένου να διευκρινιστεί ποια κύτταρα πλεονεκτούν για κάθε χρήση ξεχωριστά.

Ο δεύτερος άξονας αφορά τη μελέτη του ορού ή ακόμη και πλάσματος του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και των παραγώγων τους. Ανάπτυξη του συγκεκριμένου αντικειμένου θα μπορούσε να συμβάλει καθοριστικά στις μεθόδους καλλιέργειας όχι μόνο των MSCs αλλά και άλλων κυττάρων που προορίζονται για κλινικές εφαρμογές. Τέλος, ο τρίτος άξονας θα έχει σαν στόχο τις *in vivo* μελέτες σε ζωικά πρότυπα καθώς και τις κλινικές δοκιμές οι οποίες τελικά θα δείξουν τη χρησιμότητα των εμβρυϊκών MSCs στις εφαρμογές της ιστομηχανικής και της αναγεννητικής ιατρικής.

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aggarwal S and Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-1822. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559
2. Allen KJ, Buck NE and Williamson R. (2005). Stem cells for the treatment of liver disease. *Transpl Immunol*, 15(2), 99-112. doi: 10.1016/j.trim.2005.09.001
3. Altman J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137(4), 433-457. doi: 10.1002/cne.901370404
4. Altman J and Das GD. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335.
5. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425(6961), 968-973. doi: 10.1038/nature02069
6. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118(2), 149-161. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.004
7. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*, 35(5), 1482-1490. doi: 10.1002/eji.200425405
8. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, et al. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*, 5(3), 267-277.
9. Ayatollahi M, Salmani MK, Geramizadeh B, Tabei SZ, Soleimani M and Sanati MH. (2012). Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World J Stem Cells*, 4(1), 1-8. doi: 10.4252/wjsc.v4.i1.1
10. Baker M. (2007). Scientific definition by political request.
11. Baksh D, Yao R and Tuan RS. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 25(6), 1384-1392. doi: 10.1634/stemcells.2006-0709
12. Balci D and Can A. (2013). The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Curr Stem Cell Res Ther*, 8(1), 60-72.
13. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. (2007). Cotransplantation 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*, 110(7), 2764-2767. doi: 10.1182/blood-2007-04-087056
14. Barker N and Clevers H. (2007). Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology*, 133(6), 1755-1760. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.029
15. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 30(1), 42-48.
16. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ and Bellantuono I. (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*, 22(5), 675-682. doi: 10.1634/stemcells.22-5-675
17. Becker AJ, Mc CE and Till JE. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197, 452-454.

18. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, et al. (2007). Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 25(7), 1753-1760. doi: 10.1634/stemcells.2007-0068
19. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 105(5), 2214-2219. doi: 10.1182/blood-2004-07-2921
20. Bhandari DR, Seo KW, Roh KH, Jung JW, Kang SK and Kang KS. (2010). REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 5(5), e10493. doi: 10.1371/journal.pone.0010493
21. Bieback K, Kern S, Kluter H and Eichler H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22(4), 625-634. doi: 10.1634/stemcells.22-4-625
22. Bocelli-Tyndall C, Barbero A, Candrian C, Ceredig R, Tyndall A and Martin I. (2006). Human articular chondrocytes suppress in vitro proliferation of anti-CD3 activated peripheral blood mononuclear cells. *J Cell Physiol*, 209(3), 732-734. doi: 10.1002/jcp.20789
23. Bongso TA, Fong CY, Ng CY and Ratnam SS. (1994a). Blastocyst transfer in human in vitro fertilization: the use of embryo co-culture. *Cell Biol Int*, 18(12), 1181-1189.
24. Bongso TA, Fong CY, Ng SC and Ratnam S. (1994b). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod*, 9(11), 2110-2117.
25. Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, et al. (2008). Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 3), 353-356. doi: 10.1042/bst0360353
26. Bork S, Pfister S, Witt H, Horn P, Korn B, Ho AD, et al. (2010). DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*, 9(1), 54-63. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00535.x
27. Bray LJ, George KA, Hutmacher DW, Chirila TV and Harkin DG. (2012). A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus. *Biomaterials*, 33(13), 3529-3538. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.045
28. Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, Buckley-Sturrock A, Sato Y, Rifkin DB, et al. (1989). Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest*, 61(5), 571-575.
29. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(10), 3828-3832.
30. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I and Fisk NM. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396-2402.
31. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. (2003). Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*, 9(5), 604-613. doi: 10.1038/nm848
32. Caplan AL. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650. doi: 10.1002/jor.1100090504
33. Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M and Musaro A. (2011). Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*, 10(1), 35-42. doi: 10.1016/j.arr.2009.08.001
34. Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, et al. (2010). Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 19(3), 317-322. doi: 10.1177/0961203309348983

35. Chamberlain G, Fox J, Ashton B and Middleton J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739-2749. doi: 10.1634/stemcells.2007-0197
36. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643-655.
37. Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA and Goodell MA. (2007). Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol*, 5(8), e201. doi: 10.1371/journal.pbio.0050201
38. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, et al. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, 107(12), 4817-4824. doi: 10.1182/blood-2006-01-0057
39. Chen G, Sato T, Ushida T, Ochiai N and Tateishi T. (2004). Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng*, 10(3-4), 323-330. doi: 10.1089/107632704323061681
40. Choudhery MS, Badowski M, Muise A and Harris DT. (2013). Utility of cryopreserved umbilical cord tissue for regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*, 8(5), 370-380.
41. Cooperman L and Michaeli D. (1984). The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*, 10(4), 638-646.
42. Cotsarelis G, Sun TT and Lavker RM. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*, 61(7), 1329-1337.
43. Da-Croce L, Gambarini-Paiva GH, Angelo PC, Bambirra EA, Cabral AC and Godard AL. (2013). Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell Tissue Bank*, 14(1), 65-76. doi: 10.1007/s10561-012-9301-9
44. de Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, Sartori MF, Baruffaldi Preis FW and Brini AT. (2009). Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy*, 11(6), 793-803. doi: 10.3109/14653240903079393
45. de Lima Prata K, de Santis GC, Orellana MD, Palma PV, Brassesco MS and Covas DT. (2012). Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. *Cytotherapy*, 14(6), 694-700. doi: 10.3109/14653249.2012.677820
46. DeLustro F, Condell RA, Nguyen MA and McPherson JM. (1986). A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res*, 20(1), 109-120. doi: 10.1002/jbm.820200110
47. Dennis JE and Charbord P. (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*, 20(3), 205-214. doi: 10.1634/stemcells.20-3-205
48. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A and Hoffman R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101(8), 2999-3001. doi: 10.1182/blood-2002-06-1830
49. Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Eleuterio E, Sulpizio M, Lanuti P, Riviello A, et al. (2014). Cryopreservation effects on Wharton's Jelly Stem Cells proteome. *Stem Cell Rev*, 10(3), 429-446. doi: 10.1007/s12015-014-9501-8
50. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843.
51. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905

52. Dong HH, Xiang S, Chen XP, Liang HF, Zhang W, Jing K, et al. (2009). The epithelial-mesenchymal transition promotes transdifferentiation of subcutaneously implanted hepatic oval cells into mesenchymal tumor tissue. *Stem Cells Dev*, 18(9), 1293-1298. doi: 10.1089/scd.2008.0321
53. Dundar NO, Dundar B, Cesur G, Yilmaz N, Sutcu R and Ozguner F. (2010). Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum. *Pediatr Int*, 52(4), 622-625. doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03100.x
54. Ergen AV and Goodell MA. (2010). Mechanisms of hematopoietic stem cell aging. *Exp Gerontol*, 45(4), 286-290. doi: 10.1016/j.exger.2009.12.010
55. Erices A, Conget P and Minguell JJ. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 109(1), 235-242.
56. Erickson GA, Bolin SR and Landgraf JG. (1991). Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev Biol Stand*, 75, 173-175.
57. Eslaminejad MB, Nazarian H, Falahi F, Taghiyar L and Daneshzadeh MT. (2009). Ex vivo Expansion and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Goat Bone Marrow *Iran J Basic Med Sci.*, 12(2), 10.
58. Evans MJ and Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.
59. Felix JS, Doherty RA, Davis HT and Ridge SC. (1974). Amniotic fluid cell culture. I. Experimental design for evaluating cell culture variables: determination of optimal fetal calf serum concentration. *Pediatr Res*, 8(11), 870-874. doi: 10.1203/00006450-197411000-00003
60. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. (2009). Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol*, 183(2), 993-1004. doi: 10.4049/jimmunol.0900803
61. Fong CY, Subramanian A, Biswas A, Gauthaman K, Srikanth P, Hande MP, et al. (2010). Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reprod Biomed Online*, 21(3), 391-401. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.010
62. Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, Schindler JW, Jaenisch R, Carey V, et al. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*, 27(1), 84-90. doi: 10.1038/nbt.1517
63. Frenkel SR and Di Cesare PE. (2004). Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng*, 32(1), 26-34.
64. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK and Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4), 393-403.
65. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI and Frolova GP. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
66. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II and Petrakova KV. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16(3), 381-390.
67. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C and Klingemann H. (2007). Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13(12), 1477-1486. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.048
68. Fuchs E and Segre JA. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100(1), 143-155.
69. Fuchs E, Tumber T and Guasch G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116(6), 769-778.

70. Gelse K, Poschl E and Aigner T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(12), 1531-1546.
71. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW and Dazzi F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105(7), 2821-2827. doi: 10.1182/blood-2004-09-3696
72. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 321(17), 1174-1178. doi: 10.1056/nejm198910263211707
73. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan KW, et al. (2004). Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol*, 32(4), 397-407. doi: 10.1016/j.exphem.2004.01.002
74. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. (1997). Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*, 337(6), 373-381. doi: 10.1056/nejm199708073370602
75. Gong W, Han Z, Zhao H, Wang Y, Wang J, Zhong J, et al. (2012). Banking human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical use. *Cell Transplant*, 21(1), 207-216. doi: 10.3727/096368911x586756
76. Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R and Le Blanc K. (2005). Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica*, 90(8), 1017-1026.
77. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81(8), 531-535.
78. Guillot PV, De Bari C, Dell'Accio F, Kurata H, Polak J and Fisk NM. (2008). Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources. *Differentiation*, 76(9), 946-957. doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00279.x
79. Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H and Fisk NM. (2007). Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells*, 25(3), 646-654. doi: 10.1634/stemcells.2006-0208
80. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. (2007). Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*, 179(3), 1595-1604.
81. Haynes J and Burnett AL. (1963). DEDIFFERENTIATION AND REDIFFERENTIATION OF CELLS IN HYDRA VIRIDIS. *Science*, 142(3598), 1481-1483.
82. Haynesworth SE, Goldberg VM and Caplan AL. (1994). Diminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging. In JA Buckwalter, VM Goldberg & SL-Y Woo (Eds.), *Musculoskeletal Soft-tissue Aging: Impact on Mobility* (Vol. 1, pp. 79-87). Rosemont, IL, USA: American Academy of Orthopaedic Surgeons.
83. Ho AD, Wagner W and Mahlknecht U. (2005). Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO Rep*, 6 Spec No, S35-38. doi: 10.1038/sj.embor.7400436
84. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13), 8932-8937. doi: 10.1073/pnas.132252399
85. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395. doi: 10.1080/14653240500319234
86. Hwa Cho H, Bae YC and Jung JS. (2006). Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*, 24(12), 2744-2752. doi: 10.1634/stemcells.2006-0189

87. Hwang JH, Shim SS, Seok OS, Lee HY, Woo SK, Kim BH, et al. (2009). Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci*, 24(4), 547-554. doi: 10.3346/jkms.2009.24.4.547
88. Iftimia-Mander A, Hourd P, Dainty R and Thomas RJ. (2013). Mesenchymal stem cell isolation from human umbilical cord tissue: understanding and minimizing variability in cell yield for process optimization. *Biopreserv Biobank*, 11(5), 291-298. doi: 10.1089/bio.2013.0027
89. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. (2003). Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*, 88(8), 845-852.
90. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 22(7), 1338-1345. doi: 10.1634/stemcells.2004-0058
91. Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, et al. (2006). Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*, 85(4), 212-225. doi: 10.1007/s00277-005-0047-3
92. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM and Sharkis SJ. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*, 6(6), 532-539. doi: 10.1038/ncb1132
93. Jeswani RM and Vani SN. (1991). A study of serum zinc levels in cord blood of neonates and their mothers. *Indian J Pediatr*, 58(5), 683-686.
94. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), 4120-4126. doi: 10.1182/blood-2004-02-0586
95. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, et al. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*, 13(4), 767-773. doi: 10.1089/ten.2006.0192
96. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR and Baumanns V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim*, 30(2), 219-227.
97. Jones S, Horwood N, Cope A and Dazzi F. (2007). The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol*, 179(5), 2824-2831.
98. Kall S, Noth U, Reimers K, Choi CY, Muehlberger T, Allmeling C, et al. (2004). [In vitro fabrication of tendon substitutes using human mesenchymal stem cells and a collagen type I gel]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 36(4), 205-211. doi: 10.1055/s-2004-815745
99. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319-331. doi: 10.1634/stemcells.2006-0286
100. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H and Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294-1301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342
101. Kiel MJ and Morrison SJ. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, 8(4), 290-301. doi: 10.1038/nri2279
102. Kohlboeck G, Glaser C, Tiesler C, Demmelmair H, Standl M, Romanos M, et al. (2011). Effect of fatty acid status in cord blood serum on children's behavioral difficulties at 10 y of age: results from the LISAPLUS Study. *Am J Clin Nutr*, 94(6), 1592-1599. doi: 10.3945/ajcn.111.015800

103. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 386-398. doi: 10.1634/stemcells.2005-0008
104. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101(9), 3722-3729. doi: 10.1182/blood-2002-07-2104
105. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369-377.
106. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, et al. (2007). Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*, 21(2), 297-303. doi: 10.1038/sj.leu.2404470
107. Lansdorp PM, Dragowska W and Mayani H. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med*, 178(3), 787-791.
108. Le Blanc K, Frassonni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371(9624), 1579-1586. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X
109. Le Blanc K, Gotterstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. (2005). Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*, 79(11), 1607-1614.
110. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotterstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363(9419), 1439-1441. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7
111. Lee G, White LS, Hurov KE, Stappenbeck TS and Piwnica-Worms H. (2009). Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(12), 4701-4706. doi: 10.1073/pnas.0900751106
112. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL and Chen TH. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), 1669-1675. doi: 10.1182/blood-2003-05-1670
113. Lee TJ, Jang J, Kang S, Jin M, Shin H, Kim DW, et al. (2013). Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 430(2), 793-797. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.067
114. Li YP, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, et al. (2008). Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol*, 180(3), 1598-1608.
115. Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, Hennerbichler S, Gabriel C, Wolbank S, et al. (2012). Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells*, 1(4), 1061-1088. doi: 10.3390/cells1041061
116. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. (2008). Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*, 26(1), 279-289. doi: 10.1634/stemcells.2007-0454
117. Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D and Janes SM. (2009). Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res*, 69(10), 4134-4142. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-4698

118. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*, 91(8), 1017-1026.
119. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 90(4), 516-525.
120. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, 372(9655), 2023-2030. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61598-6
121. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1(1), 55-70. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.014
122. Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R and Kasper C. (2011). Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev*, 7(1), 17-31. doi: 10.1007/s12015-010-9165-y
123. Manca MF, Zwart I, Beo J, Palasingham R, Jen LS, Navarrete R, et al. (2008). Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. *Cytotherapy*, 10(1), 54-68. doi: 10.1080/14653240701732763
124. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, et al. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*, 97(4), 744-754. doi: 10.1002/jcb.20681
125. Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7634-7638.
126. Mayani H, Dragowska W and Lansdorp PM. (1993). Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*, 82(9), 2664-2672.
127. Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, et al. (2010). Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp Neurol*, 223(1), 229-237. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.007
128. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M and Weissman IL. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 241(4873), 1632-1639.
129. McLaughlin D, Tsirimonaki E, Vallianatos G, Sakellaris N, Chatzistamatiou T, Stavropoulos-Gioka C, et al. (2006). Stable expression of a neuronal dopaminergic progenitor phenotype in cell lines derived from human amniotic fluid cells. *J Neurosci Res*, 83(7), 1190-1200. doi: 10.1002/jnr.20828
130. Mehrasa R, Vaziri H, Oodi A, Khorshidfar M, Nikogoftar M, Golpour M, et al. (2014). Mesenchymal stem cells as a feeder layer can prevent apoptosis of expanded hematopoietic stem cells derived from cord blood. *Int J Mol Cell Med*, 3(1), 1-10.
131. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W and Dilloo D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619-4621. doi: 10.1182/blood-2003-11-3909
132. Mendez JJ, Ghaedi M, Steinbacher D and Niklason L. (2014). Epithelial Cell Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells in Decellularized Lung Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0647
133. Merino A, Mazzara R, Fuste B, Diaz-Ricart M, Rozman M, Lozano M, et al. (2003). Transfusion medicine illustrated. The mesenchymal stem cell revealed. *Transfusion*, 43(1), 1.

134. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, et al. (2006). Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*, 76(4), 309-316. doi: 10.1111/j.1600-0609.2005.00611.x
135. Michalopoulos G and Pitot HC. (1975). Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res*, 94(1), 70-78.
136. Minguell JJ, Conget P and Erices A. (2000). Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*, 33(8), 881-887.
137. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631-642.
138. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA and Lecka-Czernik B. (2004). Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*, 3(6), 379-389. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00127.x
139. Morrison SJ and Spradling AC. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4), 598-611. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.038
140. Mueller SM and Glowacki J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*, 82(4), 583-590.
141. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, et al. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107(5), 1878-1887. doi: 10.1182/blood-2005-06-2211
142. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, et al. (2006). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*, 8(5), 437-444. doi: 10.1080/14653240600920782
143. Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H, Yee EJ and McCune JM. (1990). Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med*, 172(4), 1055-1063.
144. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, Francois S, Chapel A, Thierry D, et al. (2008). Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol*, 253(1-2), 16-22. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.06.002
145. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R and Fibbe WE. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177(4), 2080-2087.
146. Niemann C and Watt FM. (2002). Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol*, 12(4), 185-192.
147. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T and Takahashi HE. (1999). Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab*, 17(3), 171-177.
148. Niwa H, Miyazaki J and Smith AG. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24(4), 372-376. doi: 10.1038/74199
149. O'Malley J, Woltjen K and Kaji K. (2009). New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Biotechnol*, 20(5), 516-521. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.005
150. Ogawa K, Matsui H, Ohtsuka S and Niwa H. (2004). A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes Cells*, 9(5), 471-477. doi: 10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x

151. Olivier V, Faucheux N and Hardouin P. (2004). Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *Drug Discov Today*, 9(18), 803-811. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03222-2
152. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M and Basilico C. (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5672-5677.
153. Osipova EY, Shamanskaya TV, Kurakina OA, Nikitina VA, Purbueva BB, Ustugov AY, et al. (2011). Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells during Ex Vivo Expansion. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 1(3), 11.
154. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175), 141-146. doi: 10.1038/nature06534
155. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, Salmon M, et al. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*, 26(3), 150-156. doi: 10.1016/j.it.2004.11.014
156. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 283(5403), 845-848.
157. Perdikogianni C, Dimitriou H, Stiakaki E, Martimianaki G and Kalmanti M. (2008). Could cord blood be a source of mesenchymal stromal cells for clinical use? *Cytotherapy*, 10(5), 452-459. doi: 10.1080/14653240701883079
158. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), 4857-4861.
159. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, et al. (1998). Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3), 1142-1147.
160. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109(4), 1422-1432. doi: 10.1182/blood-2006-06-028704
161. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
162. Pittenger MF and Marshak DR. (2001). Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. In DR Marshak, DK Gardner & D Gottlieb (Eds.), *Stem Cell Biology* (1st ed., pp. 349-374). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
163. Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J and Prockop DJ. (2004). Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood*, 103(5), 1647-1652. doi: 10.1182/blood-2003-06-1967
164. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. (2000). Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*, 106(11), 1331-1339. doi: 10.1172/jci10329
165. Potten CS, Booth C and Pritchard DM. (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol*, 78(4), 219-243.
166. Ragni E, Vigano M, Parazzi V, Montemurro T, Montelatici E, Lavazza C, et al. (2013). Adipogenic potential in human mesenchymal stem cells strictly depends on adult or foetal tissue harvest. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(11), 2456-2466. doi: 10.1016/j.biocel.2013.07.024
167. Raicevic G, Najar M, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. (2011). The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. *Cell Immunol*, 270(2), 207-216. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.05.010

168. Ramadan AA, Michael MI, Khadre SE, Aziz FA and Hamad SS. (1986). Dedifferentiation and redifferentiation during hind limb regeneration in *Bufo regularis* Reuss and sources of regenerative blastema formation. *Folia Morphol (Praha)*, 34(4), 377-385.
169. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G and Dazzi F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 83(1), 71-76. doi: 10.1097/01.tp.0000244572.24780.54
170. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B and Ringden O. (2007). Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol*, 65(4), 336-343. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01905.x
171. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B and Le Blanc K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*, 305(1), 33-41. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.013
172. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(7), 901-913. doi: 10.3181/0712-rm-356
173. Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, Saifzadeh S, Krishnakanth P, Berner A, et al. (2012). A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med*, 4(141), 141ra193. doi: 10.1126/scitranslmed.3003720
174. Reiter I, Tzukerman M and Maor G. (2002). Spontaneous differentiating primary chondrocytic tissue culture: a model for endochondral ossification. *Bone*, 31(2), 333-339.
175. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, et al. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*, 5(4), 378-386. doi: 10.1007/s12015-009-9094-9
176. Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA, et al. (2003). Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24(27), 4987-4997.
177. Romanov YA, Svintsitskaya VA and Smirnov VN. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 21(1), 105-110. doi: 10.1634/stemcells.21-1-105
178. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F and Verfaillie CM. (2008). Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*, 314(9), 1937-1944. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.03.006
179. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J and Weissman IL. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447(7145), 725-729. doi: 10.1038/nature05862
180. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, et al. (2007). Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 16(6), 931-952. doi: 10.1089/scd.2007.0036
181. Roy S, Arora S, Kumari P and Ta M. (2014). A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 68(3), 467-472. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.010
182. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, et al. (1995). Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(22), 10119-10122.
183. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW and Stevens CE. (1993). Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 81(7), 1679-1690.
184. Saji Y, Tamura S, Yoshida Y, Kiso S, Iizuka AS, Matsumoto H, et al. (2004). Basic fibroblast growth factor promotes the trans-differentiation of mouse bone marrow cells into hepatic

- lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors. *J Hepatol*, 41(4), 545-550. doi: 10.1016/j.jhep.2004.06.017
185. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. (2012). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 48(2), 75-83. doi: 10.1007/s11626-011-9480-x
186. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM and Davies JE. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 23(2), 220-229. doi: 10.1634/stemcells.2004-0166
187. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, et al. (2010). Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*, 95(6), 867-874. doi: 10.3324/haematol.2009.011692
188. Schliephake H, Zghoul N, Jager V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, et al. (2009). Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res A*, 90(2), 429-437. doi: 10.1002/jbm.a.32104
189. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ and Azizi SA. (1999). Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther*, 10(15), 2539-2549. doi: 10.1089/10430349950016870
190. Secco M, Moreira YB, Zucconi E, Vieira NM, Jazedje T, Muotri AR, et al. (2009). Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood. *Stem Cell Rev*, 5(4), 387-401. doi: 10.1007/s12015-009-9098-5
191. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG and Prockop DJ. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20(6), 530-541. doi: 10.1634/stemcells.20-6-530
192. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*, 26(1), 212-222. doi: 10.1634/stemcells.2007-0554
193. Selvaggi TA, Walker RE and Fleisher TA. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89(3), 776-779.
194. Shahdadfar A, Fronsdaal K, Haug T, Reinholt FP and Brinckmann JE. (2005). In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, 23(9), 1357-1366. doi: 10.1634/stemcells.2005-0094
195. Shetty P, Bharucha K and Tanavde V. (2007). Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 31(3), 293-298. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.11.010
196. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y and Pei D. (2006). Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, 281(33), 23319-23325. doi: 10.1074/jbc.M601811200
197. Shockley KR, Rosen CJ, Churchill GA and Lecka-Czernik B. (2007). PPARgamma2 Regulates a Molecular Signature of Marrow Mesenchymal Stem Cells. *PPAR Res*, 2007, 81219. doi: 10.1155/2007/81219
198. Simonetti AB, Englert GE, Campos K, Mergener M, de David C, de Oliveira AP, et al. (2007). Nanobacteria-like particles: A threat to cell cultures. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 6.

199. Slavin S, Kurkalli BG and Karussis D. (2008). The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosurg*, 110(9), 943-946. doi: 10.1016/j.clineuro.2008.01.014
200. Smith A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060-1060.
201. Smith KP, Luong MX and Stein GS. (2009). Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *J Cell Physiol*, 220(1), 21-29. doi: 10.1002/jcp.21681
202. Song J, Rolfe BE, Hayward IP, Campbell GR and Campbell JH. (2000). Effects of collagen gel configuration on behavior of vascular smooth muscle cells in vitro: association with vascular morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36(9), 600-610. doi: 10.1007/bf02577528
203. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN and Papamichail M. (2006a). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24(1), 74-85. doi: 10.1634/stemcells.2004-0359
204. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN and Papamichail M. (2006b). Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells*, 24(5), 1409-1410. doi: 10.1634/stemcells.2005-0654
205. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN and Papamichail M. (2006c). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 462-471. doi: 10.1634/stemcells.2004-0331
206. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC and Moretta L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), 1327-1333. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997
207. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC and Moretta L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), 1484-1490. doi: 10.1182/blood-2005-07-2775
208. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N and Galipeau J. (2006). Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*, 107(6), 2570-2577. doi: 10.1182/blood-2005-07-2793
209. Stenderup K, Justesen J, Clausen C and Kassem M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919-926.
210. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ and Andreeff M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*, 62(13), 3603-3608.
211. Sundin M, Ringden O, Sundberg B, Nava S, Gotherstrom C and Le Blanc K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*, 92(9), 1208-1215.
212. Takahashi K and Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
213. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*, 129(7), 1377-1388. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.028
214. Tanaka H, Wakisaka A, Ogasa H, Kawai S and Liang CT. (2003). Effects of basic fibroblast growth factor on osteoblast-related gene expression in the process of medullary bone formation induced in rat femur. *J Bone Miner Metab*, 21(2), 74-79. doi: 10.1007/s007740300012

215. Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM and Sankaranarayanan K. (2011). "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int*, 2011, 504723. doi: 10.4061/2011/504723
216. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), 542-545. doi: 10.1038/nature730
217. Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al. (2003). An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem*, 134(4), 551-558.
218. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.
219. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17), 7844-7848.
220. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP and Hearn JP. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 55(2), 254-259.
221. Till JE and McCulloch EA. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-222.
222. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danko ES and Scandurro AB. (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*, 26(1), 99-107. doi: 10.1634/stemcells.2007-0563
223. Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, et al. (2008). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*, 26(2), 562-569. doi: 10.1634/stemcells.2007-0528
224. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Brandt JE, Hoffman R, Law P, et al. (1994). Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*, 22(2), 215-222.
225. Troyer DL and Weiss ML. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26(3), 591-599. doi: 10.1634/stemcells.2007-0439
226. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ and Hwang SM. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, 19(6), 1450-1456. doi: 10.1093/humrep/deh279
227. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC and Guinan EC. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75(3), 389-397. doi: 10.1097/01.tp.0000045055.63901.a9
228. Tyndall A and Uccelli A. (2009). Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplant*, 43(11), 821-828. doi: 10.1038/bmt.2009.63
229. Uccelli A, Moretta L and Pistoia V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8(9), 726-736. doi: 10.1038/nri2395
230. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14720-14725. doi: 10.1073/pnas.97.26.14720
231. Vanikar AV, Trivedi HL, Feroze A, Kanodia KV, Dave SD and Shah PR. (2011). Effect of co-transplantation of mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells as compared to hematopoietic stem cell transplantation alone in renal transplantation to achieve donor hypo-responsiveness. *Int Urol Nephrol*, 43(1), 225-232. doi: 10.1007/s11255-009-9659-1

232. Vassilopoulos G, Wang PR and Russell DW. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 422(6934), 901-904. doi: 10.1038/nature01539
233. Vescovi AL, Gritti A, Galli R and Parati EA. (1999). Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells. *J Neurotrauma*, 16(8), 689-693.
234. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, 100(5), 1611-1618. doi: 10.1182/blood-2002-01-0294
235. Wagner W, Bork S, Horn P, Krunic D, Walenda T, Diehlmann A, et al. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*, 4(6), e5846. doi: 10.1371/journal.pone.0005846
236. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22(7), 1330-1337. doi: 10.1634/stemcells.2004-0013
237. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, et al. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422(6934), 897-901. doi: 10.1038/nature01531
238. Wang XY, Lan Y, He WY, Zhang L, Yao HY, Hou CM, et al. (2008). Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood*, 111(4), 2436-2443. doi: 10.1182/blood-2007-07-099333
239. Wegmeyer H, Broske AM, Leddin M, Kuentzer K, Nisslbeck AK, Hupfeld J, et al. (2013). Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev*, 22(19), 2606-2618. doi: 10.1089/scd.2013.0016
240. Weinand C, Xu JW, Peretti GM, Bonassar LJ and Gill TJ. (2009). Conditions affecting cell seeding onto three-dimensional scaffolds for cellular-based biodegradable implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 91(1), 80-87. doi: 10.1002/jbm.b.31376
241. Weinberg CB and Bell E. (1986). A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 231(4736), 397-400.
242. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448(7151), 318-324. doi: 10.1038/nature05944
243. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B and Hows JM. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 121(2), 368-374.
244. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135(6), 1118-1129. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.048
245. Wilson A and Trumpp A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6(2), 93-106. doi: 10.1038/nri1779
246. Winder SJ, Turvey A and Forsyth IA. (1992). Characteristics of ruminant mammary epithelial cells grown in primary culture in serum-free medium. *J Dairy Res*, 59(4), 491-498.
247. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D and Goebel WS. (2009). Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*, 59(2), 150-157. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.06.005
248. Xiao YL, Riesle J and Van Blitterswijk CA. (1999). Static and dynamic fibroblast seeding and cultivation in porous PEO/PBT scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*, 10(12), 773-777.

249. Xu X, Liu Y, Cui Z, Wei Y and Zhang L. (2012). Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation. *J Biotechnol*, 162(2-3), 224-231. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.09.004
250. Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin HJ, Lee M, Song H, et al. (2004). Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy*, 6(5), 476-486. doi: 10.1080/14653240410005041
251. Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, et al. (2013). Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int*, 2013, 428726. doi: 10.1155/2013/428726
252. Yoon KC, You IC, Im SK, Jeong TS, Park YG and Choi J. (2007). Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*, 114(9), 1637-1642. doi: 10.1016/j.optha.2006.12.014
253. Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, et al. (2004). Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*, 40(1), 1-80. doi: 10.1385/cbb:40:1:1
254. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5), 1755-1761. doi: 10.1182/blood-2005-04-1496
255. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, et al. (2007). SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *Faseb j*, 21(12), 3197-3207. doi: 10.1096/fj.06-6558com
256. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Schantz JT, Fisk NM, Choolani MA, et al. (2009). Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 27(1), 126-137. doi: 10.1634/stemcells.2008-0456
257. Zheng C, Yang S, Guo Z, Liao W, Zhang L, Yang R, et al. (2009). Human multipotent mesenchymal stromal cells from fetal lung expressing pluripotent markers and differentiating into cell types of three germ layers. *Cell Transplant*, 18(10), 1093-1109. doi: 10.3727/096368909X12483162197042
258. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228. doi: 10.1089/107632701300062859

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: ΜΟΝΑΔΕΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΩΝΩΣΗ MSCs

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Εμπλουτισμός με RosetteSep	Τελευταία ανακαλλιέργεια	Επιτυχία απομόνωσης	Έλεγχος κατά την επιστίβαση	Έλεγχοι στην 3 ^η ανακαλλιέργεια		
							Κυτταρομετρία ροής	Κυτταρομε- τρία ροής	RT-PCR	Διαφοροποί- ηση
CB001	39	03/01/2007	04/01/2007	+	6	+	+	+	+	+
CB002	35	03/01/2007	04/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB003	39	03/01/2007	04/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB004	38	03/01/2007	04/01/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB005	37	12/01/2007	12/01/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB006	41	22/01/2007	22/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB007	41	22/01/2007	23/01/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB008	41	23/01/2007	23/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB009	41	23/01/2007	23/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB010	35	24/01/2007	25/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB011	35	25/01/2007	25/01/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB012	39	25/01/2007	26/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB013	38	25/01/2007	26/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB014	35	31/01/2007	31/01/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB015	38	11/02/2007	12/02/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB016	39	12/02/2007	12/02/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB017	37	12/02/2007	12/02/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB018	36	12/02/2007	12/02/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB019	38	20/02/2007	20/02/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB020	36	20/02/2007	20/02/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB021	38	22/02/2007	24/02/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB022	40	23/02/2007	24/02/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB023	40	27/02/2007	27/02/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB024	37	27/02/2007	27/02/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB025	39	27/02/2007	28/02/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB026	37	27/02/2007	28/02/2007	-	1	-	+	-	-	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Εμπλουτισμός με RosetteSep	Τελευταία ανακαλλιέργεια	Επιτυχία απομόνωσης	Έλεγχος κατά την επιστίβαση	Έλεγχοι στην 3 ^η ανακαλλιέργεια		
							Κυτταρομετρία ροής	Κυτταρομε- τρία ροής	RT-PCR	Διαφοροποί- ηση
CB027	37	04/03/2007	05/03/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB028	40	05/03/2007	05/03/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB029	39	05/03/2007	06/03/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB030	35	05/03/2007	06/03/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB031	35	05/03/2007	06/03/2007	+	2	-	+	-	-	-
CB032	41	06/03/2007	06/03/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB033	36	19/03/2007	20/03/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB034	36	19/03/2007	20/03/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB035	36	19/03/2007	21/03/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB036	39	20/03/2007	21/03/1977	+	1	-	+	-	-	-
CB037	36	22/03/2007	22/03/2007	+	1	-	+	-	-	-
CB038	39	22/03/2007	22/03/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB039	36	02/04/2007	03/04/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB040	41	02/04/2007	03/04/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB041	37	02/04/2007	03/04/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB042	40	02/04/2007	03/04/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB043	41	02/04/2007	04/04/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB044	41	02/04/2007	04/04/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB045	37	11/04/2007	11/04/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB046	39	11/04/2007	11/04/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB047	39	18/04/2007	18/04/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB048	39	18/04/2007	18/04/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB049	35	18/04/2007	19/04/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB050	39	24/04/2007	24/04/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB051	39	24/04/2007	24/04/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB052	41	24/04/2007	25/04/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB053	35	24/04/2007	25/04/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB054	40	03/05/2007	04/05/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB055	41	03/05/2007	04/05/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB056	38	07/05/2007	08/05/2007	+	2	-	-	-	-	-

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Εμπλουτισμός με RosetteSep	Τελευταία ανακαλλιέργεια	Επιτυχία απομόνωσης	Έλεγχος κατά την επιστίβαση	Έλεγχοι στην 3 ^η ανακαλλιέργεια		
							Κυτταρομετρία ροής	Κυτταρομε- τρία ροής	RT-PCR	Διαφοροποί- ηση
CB057	36	07/05/2007	08/05/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB058	35	08/05/2007	08/05/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB059	41	10/05/2007	10/05/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB060	38	10/05/2007	10/05/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB061	40	22/05/2007	22/05/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB062	38	22/05/2007	22/05/2007	-	2	-	+	-	-	-
CB063	35	22/05/2007	23/05/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB064	38	23/05/2007	23/05/2007	-	1	-	+	-	-	-
CB065	35	24/05/2007	25/05/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB066	38	24/05/2007	25/05/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB067	39	28/05/2007	28/05/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB068	37	05/06/2007	05/06/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB069	40	05/06/2007	06/06/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB070	38	06/06/2007	06/06/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB071	40	07/06/2007	07/06/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB072	35	07/06/2007	08/06/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB073	39	12/06/2007	12/06/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB074	37	12/06/2007	12/06/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB075	36	12/06/2007	13/06/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB076	35	14/06/2007	14/06/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB077	36	22/06/2007	22/06/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB078	37	22/06/2007	23/06/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB079	41	28/06/2007	29/06/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB080	41	28/06/2007	29/06/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB081	36	02/07/2007	03/07/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB082	37	02/07/2007	03/07/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB083	39	03/07/2007	03/07/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB084	37	09/07/2007	11/07/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB085	41	09/07/2007	11/07/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB086	35	16/07/2007	16/07/2007	-	1	-	-	-	-	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Εμπλουτισμός με RosetteSep	Τελευταία ανακαλλιέργεια	Επιτυχία απομόνωσης	Έλεγχος κατά την επιστίβαση	Έλεγχοι στην 3 ^η ανακαλλιέργεια		
							Κυτταρομετρία ροής	Κυτταρομε- τρία ροής	RT-PCR	Διαφοροποί- ηση
CB087	35	16/07/2007	16/07/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB088	39	16/07/2007	17/07/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB089	40	16/07/2007	17/07/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB090	39	20/08/2007	21/08/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB091	39	20/08/2007	21/08/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB092	40	20/08/2007	21/08/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB093	37	20/08/2007	21/08/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB094	37	24/08/2007	24/08/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB095	40	26/08/2007	27/08/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB096	35	27/08/2007	27/08/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB097	35	27/08/2007	28/08/2007	-	6	+	-	+	+	+
CB098	35	30/08/2007	30/08/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB099	38	12/09/2007	12/09/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB100	36	12/09/2007	12/09/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB101	40	12/09/2007	12/09/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB102	37	17/09/2007	17/09/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB103	37	17/09/2007	17/09/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB104	36	25/09/2007	26/09/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB105	39	27/09/2007	28/09/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB106	40	03/10/2007	04/10/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB107	38	03/10/2007	04/10/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB108	36	05/10/2007	06/10/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB109	40	09/10/2007	09/10/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB110	38	14/10/2007	16/10/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB111	40	15/10/2007	16/10/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB112	38	16/10/2007	16/10/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB113	37	26/10/2007	26/10/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB114	40	29/10/2007	30/10/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB115	41	29/10/2007	30/10/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB116	37	30/10/2007	30/10/2007	+	1	-	-	-	-	-

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Εμπλουτισμός με RosetteSep	Τελευταία ανακαλλιέργεια	Επιτυχία απομόνωσης	Έλεγχος κατά την επιστίβαση	Έλεγχοι στην 3 ^η ανακαλλιέργεια		
							Κυτταρομετρία ροής	Κυτταρομε- τρία ροής	RT-PCR	Διαφοροποί- ηση
CB117	39	13/11/2007	13/11/2007	-	6	+	-	+	+	+
CB118	36	13/11/2007	13/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB119	40	13/11/2007	13/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB120	40	13/11/2007	14/11/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB121	38	13/11/2007	14/11/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB122	40	13/11/2007	14/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB123	35	20/11/2007	21/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB124	38	20/11/2007	21/11/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB125	36	22/11/2007	23/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB126	36	22/11/2007	23/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB127	38	22/11/2007	23/11/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB128	36	26/11/2007	27/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB129	37	26/11/2007	27/11/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB130	38	27/11/2007	27/11/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB131	37	29/11/2007	30/11/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB132	37	30/11/2007	30/11/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB133	37	03/12/2007	03/12/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB134	36	03/12/2007	04/12/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB135	37	06/12/2007	06/12/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB136	41	06/12/2007	07/12/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB137	37	12/12/2007	13/12/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB138	38	13/12/2007	13/12/2007	+	1	-	-	-	-	-
CB139	37	13/12/2007	14/12/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB140	41	14/12/2007	14/12/2007	+	2	-	-	-	-	-
CB141	41	17/12/2007	18/12/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB142	40	18/12/2007	18/12/2007	-	2	-	-	-	-	-
CB143	37	20/12/2007	21/12/2007	-	1	-	-	-	-	-
CB144	41	08/01/2008	09/01/2008	-	2	-	-	-	-	-
CB145	37	08/01/2008	09/01/2008	-	1	-	-	-	-	-
CB146	37	09/01/2008	10/01/2008	-	2	-	-	-	-	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Εμπλουτισμός με RosetteSep	Τελευταία ανακαλλιέργεια	Επιτυχία απομόνωσης	Έλεγχος κατά την επιστίβαση	Έλεγχοι στην 3 ^η ανακαλλιέργεια		
							Κυτταρομετρία ρόης	Κυτταρομε- τρία ροής	RT-PCR	Διαφοροποί- ηση
CB147	40	10/01/2008	10/01/2008	-	2	-	-	-	-	-
CB148	38	11/01/2008	12/01/2008	-	1	-	-	-	-	-
CB149	36	16/01/2008	16/01/2008	-	1	-	-	-	-	-
CB150	39	16/01/2008	17/01/2008	-	2	-	-	-	-	-
CB151	40	16/01/2008	17/01/2008	-	1	-	-	-	-	-
CB152	40	18/01/2008	18/01/2008	-	1	-	-	-	-	-
CB153	35	21/01/2008	22/01/2008	-	2	-	-	-	-	-
CB154	35	21/01/2008	22/01/2008	-	2	-	-	-	-	-
CB155	36	24/01/2008	24/01/2008	+	1	-	-	-	-	-
CB156	40	29/01/2008	30/01/2008	+	2	-	-	-	-	-
CB157	37	29/01/2008	30/01/2008	+	2	-	-	-	-	-
CB158	36	31/01/2008	31/01/2008	+	1	-	-	-	-	-
CB159	36	31/01/2008	01/02/2008	+	2	-	-	-	-	-
CB160	36	03/02/2008	04/02/2008	+	1	-	-	-	-	-
CB161	35	04/02/2008	04/02/2008	+	1	-	-	-	-	-
CB162	38	04/02/2008	05/02/2008	+	6	+	-	+	+	+
CB163	40	04/02/2008	05/02/2008	+	1	-	-	-	-	-
CB164	35	06/02/2008	07/02/2008	+	1	-	-	-	-	-
CB165	37	06/02/2008	07/02/2008	+	2	-	-	-	-	-
CB166	40	06/02/2008	07/02/2008	+	1	-	-	-	-	-
CB167	41	12/02/2008	13/02/2008	+	2	-	-	-	-	-
CB168	40	12/02/2008	13/02/2008	+	2	-	-	-	-	-
CB169	41	12/02/2008	13/02/2008	-	2	-	-	-	-	-
CB170	37	13/02/2008	14/02/2008	-	2	-	-	-	-	-
CB171	41	13/02/2008	14/02/2008	-	1	-	-	-	-	-
CB172	41	13/02/2008	14/02/2008	-	1	-	-	-	-	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΜΟΝΑΔΕΣ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Καλλιέργεια σε:		
				MCM	FBS	CBS
CB301	38	16/06/2008	17/06/2008	+	+	-
CB302	38	16/06/2008	17/06/2008	+	+	-
CB303	40	16/06/2008	17/06/2008	+	+	-
CB304	36	19/06/2008	20/06/2008	+	+	-
CB305	39	22/06/2008	22/06/2008	+	+	-
CB306	36	02/07/2009	03/07/2009	+	+	-
CB307	37	02/07/2009	03/07/2009	+	+	-
CB308	36	10/07/2009	11/07/2009	+	+	-
CB309	39	10/07/2009	11/07/2009	+	+	-
CB310	39	14/07/2009	15/07/2009	+	+	-
CB311	41	15/07/2009	15/07/2009	+	+	-
CB312	37	21/07/2009	22/07/2009	+	+	-
CB313	35	22/07/2009	22/07/2009	+	+	-
CB314	41	27/07/2009	28/07/2009	+	+	+
CB315	35	27/07/2009	28/07/2009	+	+	+
CB316	35	28/07/2009	28/07/2009	+	+	+
CB317	37	28/07/2009	28/07/2009	+	+	+
CB318	39	31/07/2009	31/07/2009	+	+	-
CB319	37	03/08/2009	04/08/2009	+	-	+
CB320	37	05/08/2009	06/08/2009	+	+	+
CB321	37	06/08/2009	06/08/2009	+	+	-
CB322	37	06/08/2009	07/08/2009	+	+	-
CB323	40	01/09/2009	02/09/2009	+	+	+
CB324	41	01/09/2009	02/09/2009	+	+	-
CB325	38	02/09/2009	02/09/2009	+	-	+
CB326	37	02/09/2009	03/09/2009	+	+	+
CB327	35	02/09/2009	03/09/2009	+	+	+
CB328	39	08/09/2009	09/09/2009	+	+	-
CB329	39	08/09/2009	09/09/2009	+	-	+
CB330	37	09/09/2009	10/09/2009	+	+	+
CB331	40	10/09/2009	11/09/2009	+	-	+
CB332	40	22/09/2009	23/09/2009	+	+	-
CB333	39	23/09/2009	23/09/2009	+	+	+
CB334	39	02/10/2009	03/10/2009	+	+	+
CB335	35	02/10/2009	03/10/2009	+	+	-
CB336	41	03/10/2009	04/10/2009	+	+	+
CB337	35	05/10/2009	06/10/2009	+	+	+

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Καλλιέργεια σε:		
				MCM	FBS	CBS
CB338	37	08/10/2009	09/10/2009	+	+	-
CB339	36	09/10/2009	10/10/2009	+	+	+
CB340	36	14/10/2009	15/10/2009	+	+	+
CB341	40	15/10/2009	16/10/2009	+	+	-
CB342	41	19/10/2009	20/10/2009	+	+	+
CB343	37	27/10/2009	29/10/2009	+	-	+
CB344	39	28/10/2009	29/10/2009	+	+	-
CB345	38	29/10/2009	29/10/2009	+	-	+
CB346	41	09/11/2009	10/11/2009	+	+	+
CB347	38	10/11/2009	11/11/2009	+	+	-
CB348	39	12/11/2009	13/11/2009	+	+	+
CB349	39	12/11/2009	13/11/2009	+	+	+
CB350	40	17/11/2009	18/11/2009	+	-	+
CB351	40	17/11/2009	18/11/2009	+	+	-
CB352	38	17/11/2009	18/11/2009	+	+	+
CB353	39	19/11/2009	19/11/2009	+	+	-
CB354	41	24/11/2009	25/11/2009	+	+	+
CB355	39	24/11/2009	25/11/2009	+	-	+
CB356	41	01/12/2009	02/12/2009	+	+	-
CB357	35	02/12/2009	03/12/2009	+	-	+
CB358	35	08/12/2009	09/12/2009	+	+	+
CB359	35	08/12/2009	09/12/2009	+	+	+
CB360	40	08/12/2009	09/12/2009	+	+	-
CB361	37	11/12/2009	12/12/2009	+	+	+
CB362	40	04/01/2010	05/01/2010	+	+	+
CB363	40	04/01/2010	05/01/2010	+	-	+
CB364	40	13/01/2010	14/01/2010	+	-	+
CB365	39	13/01/2010	14/01/2010	+	-	+
CB366	40	15/01/2010	16/01/2010	+	+	-
CB367	40	19/01/2010	20/01/2010	+	+	+
CB368	35	26/01/2010	27/01/2010	+	+	-
CB369	39	26/01/2010	27/01/2010	+	+	+
CB370	37	03/02/2010	04/02/2010	+	+	+
CB371	35	03/02/2010	04/02/2010	+	+	+
CB372	35	04/02/2010	05/02/2010	+	+	-
CB373	35	05/02/2010	05/02/2010	+	-	-
CB374	41	09/02/2010	10/02/2010	+	+	-
CB375	37	09/02/2010	10/02/2010	+	-	+
CB376	36	09/02/2010	10/02/2010	+	+	-
CB377	36	12/02/2010	13/02/2010	+	+	-
CB378	36	24/02/2010	25/02/2010	+	-	+

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Καλλιέργεια σε:		
				MCM	FBS	CBS
CB379	39	25/02/2010	25/02/2010	+	-	+
CB380	40	26/02/2010	26/02/2010	+	+	+
CB381	36	07/03/2010	09/03/2010	+	+	+
CB382	36	08/03/2010	09/03/2010	+	+	-
CB383	39	09/03/2010	09/03/2010	+	+	-
CB384	37	15/03/2010	16/03/2010	+	+	-
CB385	41	15/03/2010	16/03/2010	+	+	+
CB386	40	15/03/2010	16/03/2010	+	-	+
CB387	38	15/03/2010	16/03/2010	+	+	-
CB388	37	18/03/2010	19/03/2010	+	+	-
CB389	41	23/03/2010	24/03/2010	+	-	+
CB390	36	24/03/2010	25/03/2010	+	+	+
CB391	38	28/03/2010	28/03/2010	+	+	+
CB392	41	28/03/2010	29/03/2010	+	+	+
CB393	35	14/04/2010	15/04/2010	+	-	+
CB394	37	15/04/2010	16/04/2010	+	+	+
CB395	38	20/04/2010	21/04/2010	+	+	+
CB396	41	22/04/2010	23/04/2010	+	-	+

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Όγκος ορού (CBS) που παρασκευάστηκε (σε mL)
CB401	39	24/07/2009	24/07/2009	59
CB402	36	24/07/2009	24/07/2009	48
CB403	35	26/07/2009	27/07/2009	43
CB404	41	26/07/2009	27/07/2009	58
CB405	35	27/07/2009	27/07/2009	41
CB406	40	24/08/2009	25/08/2009	65
CB407	41	24/08/2009	25/08/2009	59
CB408	36	25/08/2009	25/08/2009	46
CB409	36	25/08/2009	25/08/2009	53
CB410	35	14/09/2009	15/09/2009	55
CB411	37	14/09/2009	15/09/2009	39
CB412	38	14/09/2009	15/09/2009	62
CB413	41	15/09/2009	15/09/2009	37
CB414	39	12/10/2009	13/10/2009	51
CB415	37	12/10/2009	13/10/2009	53
CB416	39	12/10/2009	13/10/2009	39
CB417	41	13/10/2009	14/10/2009	56
CB418	37	13/10/2009	14/10/2009	62
CB419	41	08/11/2009	09/11/2009	60
CB420	37	09/11/2009	10/11/2009	54
CB421	40	09/11/2009	10/11/2009	39
CB422	35	10/11/2009	11/11/2009	61
CB423	40	03/12/2009	03/12/2009	51
CB424	35	03/12/2009	03/12/2009	42
CB425	40	03/12/2009	03/12/2009	53
CB426	40	11/01/2010	12/01/2010	55
CB427	39	11/01/2010	12/01/2010	57
CB428	37	15/02/2010	16/02/2010	46
CB429	38	15/02/2010	16/02/2010	49
CB430	40	03/05/2010	04/05/2010	43
CB431	38	04/05/2010	04/05/2010	39
CB432	39	04/05/2010	04/05/2010	37
CB433	37	04/05/2010	04/05/2010	64
CB434	35	05/05/2010	06/05/2010	58
CB435	41	08/06/2010	09/06/2010	50
CB436	40	08/06/2010	09/06/2010	40
CB437	35	08/06/2010	09/06/2010	56
CB438	38	08/06/2010	09/06/2010	37
CB439	35	09/06/2010	10/06/2010	42
CB440	37	09/06/2010	10/06/2010	47
CB441	40	09/06/2010	10/06/2010	51
CB442	38	09/06/2010	10/06/2010	49

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V: ΣΥΛΛΟΓΕΣ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ

	Ηλικία Κύησης (εβδ.)	Ημερομηνία Συλλογής	Ημερομηνία Απομόνωσης	Χρήση για μελέτη:		
				Θρεπτικών υλικών	Μεθόδων απομόνωσης	Κρυοσυ- ντήρησης
CORD001	39	10/05/2010	11/05/2010	+	-	-
CORD002	37	10/05/2010	11/05/2010	+	-	-
CORD003	37	10/05/2010	11/05/2010	+	-	-
CORD004	39	10/05/2010	11/05/2010	+	-	-
CORD005	39	17/05/2010	18/05/2010	+	-	-
CORD006	36	17/05/2010	18/05/2010	+	-	-
CORD007	36	17/05/2010	18/05/2010	+	-	-
CORD008	37	17/05/2010	18/05/2010	+	-	-
CORD009	38	20/05/2010	21/05/2010	+	-	-
CORD010	40	20/05/2010	21/05/2010	+	-	-
CORD011	37	20/05/2010	21/05/2010	+	-	-
CORD012	40	20/05/2010	21/05/2010	+	-	-
CORD013	37	26/05/2010	27/05/2010	+	-	-
CORD014	39	26/05/2010	27/05/2010	+	-	-
CORD015	41	26/05/2010	27/05/2010	+	-	-
CORD016	41	03/06/2010	04/06/2010	+	-	-
CORD017	36	03/06/2010	04/06/2010	+	-	-
CORD018	36	03/06/2010	04/06/2010	+	-	-
CORD019	37	03/06/2010	04/06/2010	+	-	-
CORD020	40	03/06/2010	04/06/2010	+	-	-
CORD021	36	12/10/2010	13/10/2010	-	+	+
CORD022	41	12/10/2010	13/10/2010	-	+	+
CORD023	40	12/10/2010	13/10/2010	-	+	+
CORD024	38	12/10/2010	13/10/2010	-	+	+
CORD025	38	18/10/2010	19/10/2010	-	+	+
CORD026	38	18/10/2010	19/10/2010	-	+	+
CORD027	41	18/10/2010	19/10/2010	-	+	+
CORD028	38	25/10/2010	25/10/2010	-	+	+
CORD029	40	25/10/2010	25/10/2010	-	+	+
CORD030	41	25/10/2010	25/10/2010	-	+	+

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI: ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

	McCoy's 5A	α -MEM
	g/L	g/L
Inorganic Salts		
Calcium Chloride	0.09995	0.2
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.0976876	0.09767
Potassium Chloride	0.4	0.4
Sodium Bicarbonate	2.2	—
Sodium Chloride	6.46	6.8
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.504	0.122
Amino Acids		
L-Alanine	0.01336	0.025
L-Arginine • HCl	0.04214	0.126
L-Asparagine • H ₂ O	0.04503	0.05
L-Aspartic Acid	0.01997	0.03
L-Cysteine	0.02424	—
L-Cysteine • HCl • H ₂ O	—	0.1
L-Cystine • 2HCl	—	0.0313
L-Glutamic Acid	0.02207	0.075
L-Glutamine	—	0.292
Glycine	0.00751	0.05
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.02096	0.042
Hydroxy-L-proline	0.01967	—
L-Isoleucine	0.03936	0.052
L-Leucine	0.03936	0.052
L-Lysine • HCl	0.03654	0.0725
L-Methionine	0.01492	0.015
L-Phenylalanine	0.01652	0.032
L-Proline	0.01727	0.04
L-Serine	0.02628	0.025
L-Threonine	0.01787	0.048
L-Tryptophan	0.00306	0.01
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.0261	0.0519
L-Valine	0.01757	0.046

	McCoy's 5A	α -MEM
Vitamins		
Ascorbic Acid	0.0005625	—
L-Ascorbic Acid • Na	—	0.05
p-Aminobenzoic Acid	0.001	—
D-Biotin	0.0002	—
Biotin	—	0.0001
Choline Chloride	0.005	0.001
Folic Acid	0.01	0.001
myo-Inositol	0.036	0.002
Niacinamide	0.0005	0.001
Nicotinic Acid	0.0005	—
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.0002	0.001
Pyridoxal • HCl	0.0005	0.001
Pyridoxine • HCl	0.0005	—
Riboflavin	0.0002	0.0001
Thiamine • HCl	0.0002	0.001
Vitamin B12	0.002	0.00136
Other		
Adenosine	—	0.01
Cytidine	—	0.01
2'-Deoxyadenosine	—	0.01
2'-Deoxycytidine • HCl	—	0.011
2'-Deoxyguanosine	—	0.01
D-Glucose	3	1
Guanosine	—	0.01
Phenol Red • Na	0.011	0.011
Pyruvic Acid • Na	—	0.11
Thioctic Acid	—	0.0002
Thymidine	—	0.01
Uridine	—	0.01
Peptone	0.6	—
Glutathione (reduced)	0.0005	—

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII: ΔΕΙΓΜΑ ΣΥΝΑΙΝΕΣΗΣ

	
Πληροφορίες	CBB I 005.004.003/15.2
Συναίνεση για τη Δωρεά Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση	



1. Εισαγωγή

Εφόσον επιθυμείτε και συμφωνείτε να συμμετάσχετε στο πρόγραμμα Δωρεάς Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για μη συγγενική αλλογενή χρήση (δωρεά προς οποιονδήποτε ασθενή) της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.), που διενεργείται στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.), οι ακόλουθες πληροφορίες και ενημέρωση που σας παρέχονται, σας εξηγούν το σκοπό αυτής της Δωρεάς, το τι θα σας ζητηθεί να κάνετε και, επιπλέον, σας κάνει γνωστά τα οφέλη ή τους τυχόν κινδύνους από τη συμμετοχή σας. Πριν αποφασίσετε εάν θέλετε να κάνετε τη Δωρεά, η ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. σας ενημερώνει πλήρως, αντικειμενικά, με σαφή και κατανοητό τρόπο, προφορικά και γραπτά, αλλά και σας προτρέπει να απευθυνθείτε σ' αυτήν και να υποβάλετε οποιαδήποτε πρόσθετη ερώτηση ανά πάσα στιγμή κατά τη διάρκεια της κύησης και έως τον τοκετό (Δευτέρα έως Παρασκευή, 09:00 - 11:00 και 14:00 - 15:00, **210-6597697**).

2. Σκοπός της Δωρεάς Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος

Το αίμα που προέρχεται, μέσω του ομφάλιου λώρου, από τον πλακούντα, ο οποίος αποκολλάται και απορρίπτεται μετά τον τοκετό, περιέχει ειδικά κύτταρα («αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα»), τα οποία μπορούν στη συνέχεια να απομονωθούν για μελλοντική χρήση, και, εφόσον ελεγχθούν και είναι ασφαλή, να δοθούν δωρεάν σε οποιονδήποτε ασθενή είναι ιστοσυμβατός και πάσχει από σοβαρές ασθένειες του αίματος ή ορισμένους τύπους καρκίνου ή αυτοάνοσα νοσήματα. Η ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α., για το γενικό καλό, συλλέγει, ελέγχει, επεξεργάζεται, απομονώνει, κρυοκαταψύχει και αποθηκεύει αυτά τα ειδικά κύτταρα και τα διαθέτει για μεταμόσχευση σε όσους ασθενείς τα έχουν ανάγκη για τη ζωή και την υγεία τους, στην Ελλάδα και το εξωτερικό.

3. Συμμετοχή

Η ΔΩΡΕΑ Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. είναι απολύτως εθελοντική, ελεύθερη και χωρίς αντάλλαγμα (δωρεάν). Το αίμα δίνεται στο λήπτη ανωνύμως. Το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα που αποθηκεύεται στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α., καθώς και οι συγκεκριμένες προσωπικές πληροφορίες και δεδομένα που το συνοδεύουν, διασφαλίζονται με την τήρηση του απορρήτου και της εμπιστευτικότητας των προσωπικών και ευαίσθητων δεδομένων. Επιπλέον, όλες οι εξετάσεις αίματος γίνονται χωρίς κόστος για εσάς. Ωστόσο θα πρέπει να γνωρίζετε ότι ένας μεγάλος αριθμός Δωρεών απορρίπτονται για ιατρικούς ή άλλους λόγους ακαταλληλότητας (π.χ. χαμηλός αριθμός κυττάρων, μη συμπλήρωση εντύπων), καθώς αποθηκεύονται μόνο οι καλύτερες συλλογές Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για ενδεχόμενη μελλοντική χρήση. Επίσης θα πρέπει να γνωρίζετε ότι οι 34 εβδομάδες αποτελούν τον ελάχιστο χρόνο κύησης που απαιτείται για τη λήψη του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος.

Η απόφασή σας να μη συμμετάσχετε στο Πρόγραμμα Δωρεάς για μη συγγενική αλλογενή χρήση της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. ή να διακόψετε και να εγκαταλείψετε το Πρόγραμμα είναι απολύτως σεβαστή, δεν υπόκειται σε κριτική και δεν έχει καμία επίπτωση στην ιατρική σας περίθαλψη. Η απόφασή σας ανακαλείται ελεύθερα γραπτώς και απευθύνεται προς την ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. οποιαδήποτε στιγμή, χωρίς συνέπειες. Αν ανακαλέσετε τη συναίνεσή σας και δεν παραδώσετε στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα υποχρεούστε να επιστρέψετε άθικτη την ειδική συσκευή συλλογής αίματος.

4. Διαδικασία Συλλογής

Η λήψη του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος γίνεται στο Μαιευτήριο μόλις γεννηθεί το παιδί και δεν έχει καμία επίπτωση στην υγεία της μητέρας ή του παιδιού, ανεξάρτητα από το αν ο τοκετός έγινε με φυσιολογικό τρόπο ή με καισαρική τομή. Ο ομφάλιος λώρος αποκόπτεται αμέσως μετά τον τοκετό από το νεογνό που παραλαμβάνεται από το προσωπικό της αίθουσας τοκετού. Στο διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την αποκόλληση του πλακούντα από τη μήτρα της μητέρας μπορεί να γίνει η λήψη του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (in utero συλλογή) από την ομφαλική φλέβα με τη χρήση ειδικού ασκοῦ συλλογής, ο οποίος φέρει δύο βελόνες και παραδίδεται μετά τη λήψη του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος από εσάς στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. Η διάρκεια της λήψης δεν ξεπερνά το ένα λεπτό.

έντυπο για συμπλήρωση
επιστρέφεται στην ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.

1

Σελ. 187

**Πληροφορίες**

CBB I 005.004.003/15.2

Συναίνεση για τη Δωρεά Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση**5. Ενέργειες της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.**

Αν αποφασίσετε να συμμετάσχετε στο Πρόγραμμα Δωρεάς της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α., τότε θα πρέπει να γνωρίζετε, να συμφωνείτε, να αποδέχεστε και να συναινείτε στο ότι το προσωπικό της Τράπεζας:

α. Θα μελετήσει το πρόσφατο ιατρικό ιστορικό, το δικό σας και του παιδιού σας (κυοφορούμενου), καθώς και θα υποβάλει ερωτήσεις σχετικά με την εγκυμοσύνη σας, το ιατρικό και κοινωνικό σας ιστορικό. Οι εν λόγω ερωτήσεις, γίνονται για να αποφευχθεί η μετάδοση ιογενών παραγόντων στο λήπτη. Ανάλογες ερωτήσεις άλλωστε συνήθίζονται και στους θελοντές αιμοδότες για την ασφάλεια του αίματος. Το προσωπικό της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. δεσμεύεται από το απόρρητο και την προστασία των προσωπικών σας δεδομένων.

β. Θα υποβάλει τα δείγματα αίματος που έχουν ληφθεί από τη μητέρα στο Μαιευτήριο (δύο φιαλίδια για πήγμα και ένα φιαλίδιο γενικής), καθώς και από το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού σας (ασκός συλλογής) σε έλεγχο για συγκεκριμένους ιογενείς παράγοντες. Στόχος της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α είναι ο αποκλεισμός μολύνσεων από βακτήρια, μύκητες ή άλλους ιογενείς παράγοντες που θα μπορούσαν να διαβιβαστούν από εσάς στο Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα.

Οι εξετάσεις για ιογενείς παράγοντες είναι υποχρεωτικές από το νόμο σε όσους δωρίζουν αίμα ή ιστό. Αυτές περιλαμβάνουν την Ηπατίτιδα Β (αντιγόνο επιφανείας Ηπατίτιδας Β) (HBsAg) (δείκτης λοίμωξης από τον ιό της Ηπατίτιδας Β), αντισώματα για τον ιό της Ηπατίτιδας C (HCV), ιούς ανοσοανεπάρκειας (HIV «Aids») και Τ-λεμφοτρόποι ιοί (HTLV). Επιπλέον, εξετάσεις πραγματοποιούνται για τον ιό του Δυτικού Νεύλου (WNV), για λοίμωξη από το παράσιτο που προκαλεί τη νόσο του Chagas (T.Cruzi, το παράσιτο μεταδίδεται από τα έντομα και είναι κοινό για τη Νότια και Κεντρική Αμερική) και για πρόσφατη ή κατά το παρελθόν μόλυνση με σύφιλη.

γ. Θα ενημερώσει το γιατρό που θα μας υποδείξετε για τυχόν θετικά αποτελέσματα των παραπάνω εξετάσεων μετά τη γέννηση του παιδιού σας και σε διάστημα 6 έως 12 μηνών. Μπορείτε να επιλέξετε να μην ενημερωθείτε. Ωστόσο σας συνιστούμε να το κάνετε για λόγους πρόληψης ή τυχόν αντιμετώπισης νόσου.

δ. Θα ζητήσει στοιχεία για την υγεία του παιδιού σας, 6 μήνες μετά τη γέννησή του, από τον παιδίατρό σας ή τον προσωπικό ιατρό σας που θα μας υποδείξετε. Σε περίπτωση που προκύψει κάποιο πρόβλημα υγείας στην οικογένειά σας ή στο παιδί σας μπορείτε να επικοινωνήσετε και εσείς με τη Διευθύντρια-Ιατρό της ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α., Δρ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκιόκα (Δευτέρα έως Παρασκευή, 08:30 πμ – 15:00 μμ, 210 6597342) ή να μας παραπέμψετε στον Ιατρό σας. Ο λόγος αναζήτησης αυτών των πρόσθετων και εκ των υστέρων στοιχείων υγείας γίνεται για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια του αίματος και να μην επηρεαστεί ο δυνητικός λήπτης.

ε. Θα συντηρήσει (καταψύξει) και αποθηκεύσει τις μονάδες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος μετά από ενδελεχή έλεγχο όλων των αποτελεσμάτων για να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για μεταμόσχευση σε ασθενείς που το έχουν ανάγκη.

στ. Θα διαθέσει για ιατρική έρευνα (διερεύνηση κυτταρικών πληθυσμών και μελέτη του βιολογικού τους ρόλου), για ποιοτικό έλεγχο ή θα απορρίψει τη μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, εφόσον κάποια από τα αποτελέσματα των εξετάσεων δείχνουν ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για μεταμόσχευση ή δεν ανταποκρίνεται στους Διεθνείς Όρους και Προϋποθέσεις (Πρότυπα-Standard) που περιγράφονται από το Διεθνή Οργανισμό Κυτταρικών Θεραπειών Fact-NetCord, καθώς και από την Αμερικανική Ένωση Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA).

Σε κάθε περίπτωση, η ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α σας διαβεβαιώνει ότι τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα («βλαστοκύτταρα», «stem cells») του μωρού σας δεν θα κλωνοποιηθούν.

ζ. Θα υποβάλει το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα και τα δείγματα αίματος που έχουν ληφθεί από τη μητέρα σε έλεγχο για συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες και θα συλλέξει πληροφορίες που αφορούν την εθνότητα.

✓ Στο Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα, αλλά και σε δείγμα από το αίμα της μητέρας θα γίνει προσδιορισμός γενετικών δεικτών (αντιγόνων) που ονομάζονται HLA (Ανθρώπινα Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα). Αυτά καθορίζουν τον βαθμό της ιστικής συμβατότητας μεταξύ δότη (μονάδας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος) και λήπτη (ασθενή). Καθώς η συχνότητα των HLA αντιγόνων ποικίλει στους πληθυσμούς διαφόρων εθνοτήτων, κάθε πληροφορία που αφορά τον τόπο καταγωγής μελών της οικογένειάς σας θα βοηθήσει στη διεκρίνιση των πληθυσμιακών ομάδων που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από το Ομφαλοπλακουντιακό σας Αίμα.

✓ Το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού σας θα υποβληθεί σε έλεγχο για κοινές γενετικές νόσους των κυττάρων του αίματος, όπως είναι αυτές που αφορούν διαταραχές στην παραγωγή της αιμοσφαρίνης (π.χ. μεσογειακή αναμία, θαλασσαιμία κ.ά.). Σε περίπτωση απόκλισης των αποτελεσμάτων από τα προσδοκώμενα, τότε η ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α. θα ενημερώνει τον ιατρό της οικογένειας σύμφωνα με την ακολουθούμενη σε παγκόσμια κλίμακα τακτική.



Πληροφορίες

CBB I 005.004.003/15.2

Συναίνεση για τη Δωρεά Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση

η. Θα αποθηκεύσει δείγμα από το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα και τεμάχιο από τον ομφάλιο λώρο, καθώς και δείγμα από το δικό σας αίμα για μελλοντικούς ελέγχους.

- ✓ Με την αποθήκευση δείγματος αίματος από το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα εξασφαλίζεται η δυνατότητα για μελλοντικό έλεγχο για ιογενείς και γενετικές ασθένειες, οι οποίες θα μπορούσαν να μεταδοθούν στο λήπτη.
- ✓ Η φύλαξη τμήματος του ομφάλιου λώρου εξασφαλίζει περαιτέρω βιολογικό υλικό για απομόνωση, όταν έχουν εξαντληθεί τα ήδη υπάρχοντα αποθέματά του, καθώς χρειάζεται να γίνουν αρκετές επαναληπτικές εξετάσεις για την πιστοποίηση της HLA (ιστικής-αντιγονικής) ταυτότητας του νεογνού.
- ✓ Αν το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα που έχετε δωρίσει στην ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α χορηγηθεί σε κάποιον λήπτη, τότε επιπρόσθετες εξετάσεις μπορεί να ζητηθούν από το Μεταμοσχευτικό Κέντρο. Σε κάθε περίπτωση η ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α θα προσπαθήσει να σας ενημερώσει εάν οι επιπρόσθετες αυτές εξετάσεις δείχνουν νόσημα ή λοίμωξη που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν στο παιδί σας και να επηρεάσουν την υγεία του. Είναι υποχρέωσή σας να ειδοποιείτε την ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α εγγράφως και με κάθε πρόσφορο μέσο για οποιαδήποτε μεταβολή στην οποία συμπεριλαμβάνεται και η διεύθυνση κατοικίας ή διαμονής, αριθμός τηλεφώνου κ.α.

6. Κίνδυνοι και Οφέλη

- ✓ Δεν υπάρχουν σοβαροί κίνδυνοι για τη μητέρα και το παιδί που να συνδέονται με τη συμμετοχή σας στο Πρόγραμμα Δωρεάς Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α.
- ✓ Η ποσότητα αίματος που λαμβάνεται από τη μητέρα είναι μικρή (όχι μεγαλύτερη των 10 ml) και δεν επηρεάζει την υγεία της. Όπως σε κάθε αιμοληψία, η λήψη αίματος από τη μητέρα μπορεί να προκαλέσει έναν ανεπαίσθητο πόνο, πιθανώς μια μικρή μελανιά, ζαλάδα (τάση λιποθυμίας), σπάνια λιποθυμία και ακόμη σπανιότερα, λοίμωξη.
- ✓ Δεν υπάρχει εγγύηση ότι το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα θα αποθηκευτεί, αν δεν είναι ασφαλές ή κατάλληλο. Σε περίπτωση που η ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α κρίνει ότι το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα που δωρίσατε πρέπει να απορριφθεί, δεν σας επιστρέφεται. Σε αυτήν την περίπτωση καταστρέφεται, εκτός αν έχετε συναινέσει να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα ή σε ποιοτικό έλεγχο της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α.
- ✓ Η Δωρεά του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος δεν σας εξασφαλίζει προτεραιότητα στην περίπτωση που το παιδί σας ή άλλο μέλος της οικογένειάς πρέπει να μεταμοσχευθεί με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, καθώς ιατρικοί λόγοι και κυρίως το κριτήριο της ιστοσυμβατότητας μεταξύ νεογνού δότη και ασθενή λήπτη, καθορίζουν τις προϋποθέσεις που μια μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος πρέπει να πληροί για να μεταμοσχευθεί. Γι' αυτόν το λόγο κάθε συμμετοχή στο Πρόγραμμα Δωρεάς για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α. συμβάλλει στην αύξηση του αριθμού των διαθέσιμων μονάδων Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για μεταμόσχευση, αυξάνοντας σημαντικά την πιθανότητα να βρεθεί μία συμβατή για εσάς και την οικογένειά σας, όταν είναι απαραίτητο. Σε αντίθετη περίπτωση, ο αριθμός των διαθέσιμων μονάδων Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για μεταμόσχευση μειώνεται.
- ✓ Αν δωρίσετε το Ομφαλοπλακουντιακό σας Αίμα για Μη Συγγενική αλλογενή χρήση, δε θα είναι διαθέσιμο σε εσάς ή στην οικογένειά σας, αν απαιτηθεί αργότερα στη ζωή. Όμως, σε αυτήν την περίπτωση, ο θεράπων Ιατρός θα κινήσει τις θεσμοθετημένες από τον Ελληνικό νόμο διαδικασίες μέσω του Εθνικού Οργανισμού Μεταμοσχεύσεων (ΕΟΜ), ο οποίος θα αναζητήσει από τις Παγκόσμιες Δεξαμενές Δωρητών Μυελού των Οστών και Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, τους καταλληλότερους, για το συγκεκριμένο ασθενή, δότες αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (μπορεί να είναι είτε Δότης Μυελού των Οστών είτε Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος).
- ✓ Άμεσο όφελος για εσάς ή το παιδί σας από τη συμμετοχή σας στο Πρόγραμμα Δωρεάς για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α. είναι πως μπορείτε να μάθετε για μία λοίμωξη ή γενετική ασθένεια, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει εσάς ή το παιδί σας και η οποία ίσως να μην εντοπιζόταν διαφορετικά. Αυτή η έγκαιρη διάγνωση για εσάς ή το παιδί σας μπορεί να οδηγήσει σε θεραπεία και βελτίωση της υγειονομικής σας περιθαλψης.
- ✓ Με τη Δωρεά σας βοηθάτε να δώσουμε σε ασθενείς που ζουν στην Ελλάδα και χρειάζονται μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, μια ευκαιρία να βρουν το συντομότερο δυνατόν μια κατάλληλη μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος και μια ευκαιρία για θεραπεία και υγιή ζωή. Είναι μια πράξη φιλαλληλίας και αλληλεγγύης.
- ✓ Αν τυχόν απορριφθεί η μονάδα σας από την ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α. και εσείς έχετε συναινέσει να χρησιμοποιηθεί το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού σας για ερευνητικούς σκοπούς, θα συμβάλετε, με αυτήν την απόφασή σας, στη βελτίωση της μεταμόσχευσης με Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα, προς όφελος όλων.

7. Εναλλακτικές Επιλογές

- ✓ Αν θέλετε να επιλέξετε το πρόγραμμα "Κατευθυνόμενης Δωρεάς" (για συγγενική αλλογενή χρήση) της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α., θα πρέπει να συντρέχουν ειδικοί λόγοι: Το πρώτο σας παιδί πρέπει να έχει μια γενετική πάθηση (π.χ. θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναμία), οπότε το δικό του Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να το θεραπεύσει, γιατί η κληρονομική του πάθηση θα είναι παρούσα στα κύτταρα του αίματός του. Όμως, αν το δεύτερό σας παιδί γεννηθεί χωρίς αυτήν την πάθηση, το



Πληροφορίες

CBB I 005.004.003/15.2

Συναίνεση για τη Δωρεά Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση

Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του μπορεί να συλλεχθεί και να αποθηκευθεί χωρίς κανένα κόστος από την ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για να θεραπεύσει τον/την αδελφό/ή ή άλλο μέλος της οικογένειας που σχετίζεται γενετικά με τον Δότη.

- ✓ Αν επιθυμείτε να φυλάξετε το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα για εσάς ή για ένα μέλος της οικογένειάς σας, ρωτήστε τον ιατρό σας για την Ιδιωτική Φύλαξη (χρήση) της μονάδας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος του νεογνού σας. Σε αυτήν την περίπτωση, η ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α δεν θα πραγματοποιήσει καμία από τις διαδικασίες ή τους ελέγχους που περιγράφονται ανωτέρω. Οι "Ιδιωτικές Τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος" είναι οργανισμοί που συλλέγουν, επεξεργάζονται και αποθηκεύουν Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα προς χρήση από στενά οικογενειακά μέλη μόνο. Αυτοί οι οργανισμοί χρεώνουν αμοιβή για την υπηρεσία αυτή. Αν επιλέξετε να αποθηκεύσετε τη μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος του νεογνού σας αποκλειστικά για την οικογένειά σας, πρέπει να επικοινωνήσετε απευθείας μαζί τους.

8. Απόρρητο και εμπιστευτικότητα

1. Ένας αριθμός ταυτοποίησης (barcode/ γραμμικός κώδικας) ορίζεται για το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού σας και αποτελεί το σύνδεσμο αναφοράς μεταξύ εσάς και της Δωρεάς Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος. Εξουσιοδοτημένο, μόνο, προσωπικό της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α επιτρέπεται να έχει πρόσβαση σε αυτούς τους συνδέσμους, καθώς και οι επιθεωρητές του FACT και του Εθνικού Οργανισμού Μεταμοσχεύσεων, κατά τη διάρκεια και για τους σκοπούς της επιθεώρησης. Όλα τα παραπάνω πρόσωπα δεσμεύονται από την τήρηση του απορρήτου.
2. Ο αριθμός ταυτοποίησης (barcode/γραμμικός κώδικας) θα μπορούσε να βοηθήσει το προσωπικό της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α να σας εντοπίσει και να επικοινωνήσει μαζί σας για τον έλεγχο ρουτίνας ή στην απίθανη περίπτωση που πρέπει να ενημερωθείτε για μία ασυνήθιστη, απρόβλεπτη μόλυνση ή μια γενετική ασθένεια που θα μπορούσε να είναι σημαντική για την υγεία του παιδιού σας.
3. Όλα τα ιατρικά ιστορικά και αυτό το έγγραφο της Συναίνεσης, τα οποία έχουν τα προσωπικά σας στοιχεία και τα στοιχεία του παιδιού σας, θα κρατηθούν στην ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α με εμπιστευτικότητα και σεβασμό των προσωπικών σας δεδομένων. Για την προστασία των προσωπικών σας στοιχείων, θα κρατήσουμε όλες τις πληροφορίες που περιέχουν προσωπικά και ευαίσθητα δεδομένα εμπιστευτικά σε ένα ασφαλές μέρος, με επιτρεπόμενη πρόσβαση μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό δεσμευόμενο από το απόρρητο. Θα αποθηκεύσουμε όλες τις υπόλοιπες πληροφορίες που συλλέξαμε για εσάς και όλα τα αποτελέσματα εξετάσεων σε μια ασφαλή ηλεκτρονική βάση δεδομένων με επιτρεπόμενη πρόσβαση μόνο από εξουσιοδοτημένο προσωπικό, δεσμευόμενο από το απόρρητο.
4. Ορισμένες πληροφορίες για εσάς και το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού σας μπορεί να τις μοιραστούμε με Αρμόδιες Διαπιστευμένες Υπηρεσίες ή Αρχές (Εθνικό Οργανισμό Μεταμοσχεύσεων (Ελλάδας), Εθνικό Οργανισμό Μεταμοσχεύσεων (Η.Π.Α.), Netcord, Παγκόσμια Δεξαμενή Δωρητών Μυελού, Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων) και το Συμβούλιο αξιολόγησης του Ιδρύματος, σύμφωνα με τους ισχύοντες νόμους και κανονισμούς. Ωστόσο, δε θα προσδιορίσουμε την ταυτότητα τη δική σας ή του παιδιού σας, εκτός και αν (όπως προαναφέρθηκε) θα πρέπει να επικοινωνήσουμε μαζί σας για κάποιο λόγο που σχετίζεται με την υγεία του παιδιού σας ή για λόγους δημόσιας υγείας. Δεν θα μεταφέρουμε στα Μεταμοσχευτικά Κέντρα οποιαδήποτε πληροφορία που θα μπορούσε να αποτελέσει σύνδεσμο με εσάς ή και το παιδί σας. Δεν θα αναφέρουμε το όνομά σας ή το όνομα του παιδιού σας, σε καμία δημοσίευση.
5. Αν συμφωνήσετε να συμμετάσχετε σε αυτό το Πρόγραμμα και υπογράψετε αυτή τη Συναίνεση, δίνετε τη συγκατάθεσή σας, μας επιτρέπετε και μας εξουσιοδοτείτε να συλλέξουμε, να χρησιμοποιήσουμε και να μοιραστούμε τις πληροφορίες σας, σύμφωνα με τους όρους του παρόντος εντύπου.

9. Πιθανή Μεταφορά Μονάδων Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος

Αν στο μέλλον, η ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α διακόψει για οιονδήποτε λόγο προσωρινά ή οριστικά τη λειτουργία της, το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA) αναλαμβάνει τη δέσμευση ότι οι μονάδες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος που ήδη έχουν αποθηκευτεί θα παραμείνουν αποθηκευμένες στις εγκαταστάσεις του για να δοθούν για μεταμόσχευση. Επιπλέον αν το IIBEAA στο μέλλον παύσει τη λειτουργία του για οιονδήποτε λόγο προσωρινά ή οριστικά ή αδυνατεί αντικειμενικά να διαχειριστεί την αποθήκευση των μονάδων Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, τότε το Ίδρυμα αναλαμβάνει να τις παραδώσει σε άλλη Δημόσια Τράπεζα ή κατάλληλο Δημόσιο Νοσοκομείο Τριτοβάθμιας Περίθαλψης μαζί με όλες τις συναφείς πληροφορίες τους. Σε κάθε περίπτωση η εν λόγω μεταφορά και παράδοση των μονάδων Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος θα εγγυάται την εμπιστευτικότητα των δεδομένων των δικών σας και του παιδιού σας. Η δοθείσα, εγγράφως, συναίνεση στην ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α εξακολουθεί να ισχύει και μετά τη μεταφορά τους στους προαναφερόμενους φορείς.

10. Δίνετε την εξουσιοδότησή σας στο προσωπικό της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α

Με την υπογραφή σας στο παρόν έντυπο σε απολύτως εθελοντική βάση (δωρεάν), εκούσια, ελεύθερα και με δέσμευση από την ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α για την τήρηση του απορρήτου και την προστασία των προσωπικών σας δεδομένων, συμφωνείτε και συναίνετε να συμμετάσχετε στο Πρόγραμμα Δωρεάς για Μη συγγενική αλλογενή χρήση της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α. Αναγνωρίζετε, αποδέχεστε και βεβαιώνετε ότι προηγουμένως ενημερωθήκατε και λάβατε κάθε προφορική και γραπτή πληροφορία που περιλαμβάνεται στο φυλλάδιο και τα έντυπα του φακέλου που



Πληροφορίες

CBB I 005.004.003/15.2

Συναίνεση για τη Δωρεά Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση

σας έχουν παραδοθεί. Επίσης, αναγνωρίζετε, αποδέχεστε και βεβαιώνετε ότι προηγουμένως λάβατε γνώση και κατανοήσατε την ενημέρωση που προηγείται, στο παρόν έντυπο, σχετικά με το Πρόγραμμα Δωρεάς για Μη συγγενική αλλογενή χρήση της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α και ότι συζητήσατε για τους κινδύνους, τις εναλλακτικές επιλογές και τα οφέλη που προκύπτουν από τη συμμετοχή σας στο Πρόγραμμα και λάβατε ικανοποιητικές και σαφείς απαντήσεις σε όλες τις ερωτήσεις σας.

Μπορείτε να υποβάλετε ερωτήσεις οποιαδήποτε στιγμή, όχι μόνο πριν αλλά και μετά την υπογραφή της Συναίνεσης ή να μας ενημερώσετε σχετικά με πιθανό πρόβλημα, το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει την καταλληλότητα του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος προς μεταμόσχευση (Δευτέρα έως Παρασκευή, 09:00 - 11:00 και 14:00 - 15:00, **210-6597697**). Με βάση αυτή τη συναίνεσή σας, επιτρέπεται στο προσωπικό της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α, όπως διεξοδικά αναφέρεται παραπάνω, να μελετήσει το ιατρικό σας ιστορικό, να συλλέξει και να καταγράψει κάθε πληροφορία που θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για το Πρόγραμμα Δωρεάς της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α, όπως είναι, για παράδειγμα, η εμφάνιση παρενεργειών μετά από κάποια θεραπευτική παρέμβαση.

Συναίνεση της Μητέρας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη έχω διαβάσει με προσοχή και κατανοήσει πλήρως όλες τις παραπάνω πληροφορίες, προφορικές και γραπτές που περιλαμβάνονται στο φυλλάδιο και στα έντυπα του φακέλου που μου έχουν παραδοθεί, καθώς και την ενημέρωση που προηγείται σ' αυτό το έντυπο, έχω συζητήσει για τους κινδύνους και τα οφέλη που προκύπτουν από τη συμμετοχή μου στο Πρόγραμμα και έχω λάβει ικανοποιητικές απαντήσεις σε όλες τις ερωτήσεις μου.

Συμφωνώ, αποδέχομαι και συναινώ να συμμετάσχω εθελοντικά στο Πρόγραμμα Δωρεάς για αλλογενή χρήση της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α και να δωρίσω το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού μου με σκοπό τη χρήση του προς μεταμόσχευση σε οποιονδήποτε ασθενή (τρίτο μη συγγενικό πρόσωπο) θα μπορούσε να ωφεληθεί από αυτό. Εάν όμως δεν είναι κατάλληλο, τότε συναινώ να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα (διερεύνηση κυτταρικών πληθυσμών και μελέτη του βιολογικού τους ρόλου) ή στο εργαστήριο για ποιοτικό έλεγχο. Συμφωνώ και συναινώ πως μπορώ να αποσύρω ελεύθερα τη Συναίνεσή μου οποιαδήποτε στιγμή χωρίς καμιά συνέπεια. Σε αυτή την περίπτωση, όμως, η ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α είναι υποχρεωμένη να καταστρέψει τη μονάδα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, καθώς και τα δείγματα αίματος που τη συνοδεύουν. Με την υπογραφή αυτής της συμφωνίας - συναίνεσης, κατανοώ ότι δεν παραιτούμαι των νόμιμων δικαιωμάτων μου.

Για τη μεταφορά του εξοπλισμού στο τμήμα της IBET, αναλαμβάνω εξ' ολοκλήρου τα έξοδα αποστολής και ουδεμία ευθύνη φέρει η Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος.

Συμφωνώ και δίνω τη συναίνεσή μου για να γίνει η συλλογή του Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος του παιδιού μου και να χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με τους όρους που περιγράφονται σε αυτό το έντυπο.



Δωρίζω οικειοθελώς το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού μου στην ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α., με σκοπό να χρησιμοποιηθεί σε οποιονδήποτε ασθενή έχει ανάγκη από μεταμόσχευση και θα μπορούσε να ωφεληθεί από αυτό.



Στην περίπτωση που δεν είναι κατάλληλο για κλινική χρήση, συμφωνώ και συναινώ άνευ ανταλλάγματος να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα ή στο εργαστήριο για ποιοτικό έλεγχο, χωρίς να χρησιμοποιηθούν τα προσωπικά δεδομένα τα δικά μου ή του παιδιού μου.

ΔΗΛΩΣΗ ΜΗΤΕΡΑΣ ΔΟΤΡΙΑΣ ΓΙΑ ΜΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ

ΣΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΗ ΣΥΓΓΕΝΙΚΗΣ ΑΛΛΟΓΕΝΟΥΣ ΔΩΡΕΑΣ



Δεν επιθυμώ να συμμετάσχω στο Πρόγραμμα Μη-Συγγενικής Αλλογενούς Δωρεάς της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α. καθώς και σε οποιαδήποτε ερευνητική δραστηριότητα και δεν επιθυμώ να διατηρηθεί σύνδεση με τα δικά μου προσωπικά δεδομένα ή αυτά του παιδιού.



Δεν επιθυμώ να συμμετάσχω στο Πρόγραμμα Μη Συγγενικής Αλλογενούς Δωρεάς της ΕΛ.Τ.Ο.Π.Α., αλλά το Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα του παιδιού μου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ερευνητικούς σκοπούς χωρίς να διατηρηθεί σύνδεση με τα δικά μου προσωπικά δεδομένα ή αυτά του παιδιού μου.

Ημερομηνία/...../.....

Υπογραφή Μητέρας-Δοτριάς



ελληνική τράπεζα
ομφαλοπλακουντιακού αίματος



Πληροφορίες

CBB I 005.004.003/15.2

Συναίνεση για τη Δωρεά Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος για Μη Συγγενική Αλλογενή Χρήση

ΕΝΤΥΠΟ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΟΤΗ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΗΤΕΡΑΣ - ΔΟΤΡΙΑΣ

Όνομα Μητέρας	Ημ/νία Γέννησης
Πατρικό Επώνυμο Μητέρας Δότριας	
Όνομα Πατρός Μητέρας Δότριας	
Όνομα Μητρός Μητέρας Δότριας	
ΑΜΚΑ Μητέρας Δότριας	
Οδός	Αριθμός
T.K. Πόλη	Χώρα
Τηλέφωνο Οικίας	Κινητό
	Εβδομάδες Κύησης

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΤΕΡΑ ΝΕΟΓΝΟΥ

Όνοματεπώνυμο	Ημ/νία Γέννησης
Οδός	Αριθμός
T.K. Πόλη	
Τηλέφωνο Οικίας	Κινητό

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΑΙΕΥΤΗΡΑ/ΜΑΙΑΣ/ΜΑΙΕΥΤΗ

Όνοματεπώνυμο	Μαιευτήριο
Οδός	Αριθμός
T.K. Πόλη	
Τηλέφωνο	Κινητό

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΥ ΙΑΤΡΟΥ

Όνοματεπώνυμο	
Οδός	Αριθμός
T.K. Πόλη	

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΥ (Ή ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΥ ΙΑΤΡΟΥ)

Όνοματεπώνυμο	
Οδός	Αριθμός
T.K. Πόλη	

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΙΑΤΡΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΘΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΗΣΕΙ Η ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α ΓΙΑ ΝΑ ΑΝΑΦΕΡΘΟΥΝ ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟΡΡΗΤΑ Ή ΠΑΡΑΔΟΞΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (π.χ. θετική εξέταση HIV) ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Όνοματεπώνυμο	
Οδός	Αριθμός
T.K. Πόλη	

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ

Βρίσκομαι σε νηφάλια κατάσταση και υπογράφω πριν την αναμενόμενη ημερομηνία τοκετού. (τουλάχιστον δύο (2) ημέρες πριν από τον τοκετό)

Ημερομηνία/...../..... Υπογραφή Μητέρας

ΜΑΡΤΥΡΑΣ Συναίνεσης Δωρεάς Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος

Όνοματεπώνυμο	☐ Ιατρός
.....	☐ Νοσηλεύτης
.....	☐ Άλλο.....
Ημερομηνία/...../.....	Υπογραφή Μάρτυρα

ΣΤ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Πρωτότυπες δημοσιεύσεις σε ξένα περιοδικά με κριτές

- **Chatzistamatiou TK**, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, Panagouli E, Koussoulakos SL, Stavropoulos-Giokas C. “Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. 2014;54:3108-3120

2. Βιβλία – Κεφάλαια σε βιβλία

- Catherine Stavropoulos-Giokas, **Theofanis K. Chatzistamatiou**, Efstathios Michalopoulos et al. “The Future of Cord Blood Banks”. In C. Stavropoulos-Giokas, D. Charron and C. Navarrete (eds.) *Cord Blood Stem Cells Medicine*, Chapter 21, pp.291-303, London: Academic Press, 2015

3. Ανηρτημένες ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

- **TK Chatzistamatiou**, C Gamaloutsos, AC Papassavas, T Kokkinos, C Stavropoulos-Giokas (2007). “Umbilical Cord: An Abundant Source For Mesenchymal Stem Cells”. 2nd ESH (European School of Haematology) – EBMT Euroconference on Biobanking, Cascais, Portugal.
- **TK Chatzistamatiou**, C Gamaloutsos, AC Papassavas, T Kokkinos, C Stavropoulos-Giokas (2007). “Umbilical Cord Is A More Abundant Source Of Mesenchymal Stem Cells Than Cord Blood”. 13th Annual Meeting of the International Society for Cellular Therapy, Sydney, Australia
- **T Chatzistamatiou**, C Gamaloutsos, C Stavropoulos-Giokas and A Papassavas. (2008) “Wharton's Jelly vs Cord Blood derived MSCs: characterization and differentiation capacity”. 34th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Florence, Italy
- C Gamaloutsos, **T Chatzistamatiou**, A Papassavas and C Stavropoulos-Giokas . (2008) “Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cells in clinical use:

influence of freezing and storage on their characteristics and functions”. 34th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Florence, Italy

- S Michalopoulos, **T Chatzistamatiou**, C Saliagopoulou, A Thiakos, A Papassavas and C Stavropoulos-Giokas . (2009) “Expansion of MSCs Seeded in Biological Scaffolds”. 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Göteborg, Sweden
- P Papassavas, C Saliagkopoulou, **T Chatzistamatiou**, E Michalopoulos, A Theiakos, E Rologi, E Panagouli, T Dineri, and C Stavropoulos-Gioka. (2010) “Development of Mesenchymal Stem Cell Bank: A model for the second dimension of cord blood banks in the 21st century”. 24th EFI Conference, Florence, Italy (**Best Poster Award**)

TRANSPLANTATION AND CELLULAR ENGINEERING

Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank

Theofanis K. Chatzistamatiou,¹ Andreas C. Papassavas,¹ Efstathios Michalopoulos,¹ Christos Gamaloutsos,¹ Panagiotis Mallis,¹ Ioanna Gontika,¹ Effrosyni Panagouli,¹ Stauros L. Koussoulakos,² and Catherine Stavropoulos-Giokas¹

BACKGROUND: Mesenchymal stem or stromal cells (MSCs) are a heterogeneous population that can be isolated from many tissues including umbilical cord Wharton's jelly (UC-WJ). Although initially limited in studies such as a hematopoietic stem cell transplantation adjuvant, an increasing number of clinical trials consider MSCs as a potential anti-inflammatory or a regenerative medicine agent. It has been proposed that creating a repository of MSCs would increase their availability for clinical applications. The aim of this study was to assess the optimal isolation and cryopreservation procedures to facilitate WJ MSC banking.

STUDY DESIGN AND METHODS: Cells were isolated from UC-WJ using enzymatic digestion or plastic adhesion methods. Their isolation efficacy, growth kinetics, immunophenotype, and differentiation potential were studied, as well as the effects of freezing. Flow cytometry for common MSC markers was performed on all cases and differentiation was shown with histocytochemical staining. Finally, the isolation efficacy on cryopreserved WJ tissue fragments was tested.

RESULTS: MSC isolation was successful using both isolation methods on fresh UC-WJ tissue. However, UC-WJ MSC isolation from frozen tissue fragments was impossible. Flow cytometry analysis revealed that only MSC markers were expressed on the surface of the isolated cells while differentiation assays showed that they were capable of trilinear differentiation. All the above characteristics were also preserved in isolated UC-WJ MSCs over the cryopreservation study period.

CONCLUSION: These data showed that viable MSCs can only be isolated from fresh UC-WJ tissue, setting the foundation for clinical-grade banking.

Mesenchymal stem or stromal cells (MSCs) have been initially known for forming the hematopoietic supportive stroma of the bone marrow.^{1,2} MSCs can also be isolated from different sources such as adipose tissue,³ amniotic fluid,^{4,5} umbilical cord (UC) blood,⁶⁻⁸ the umbilical vein,⁹ and UC's Wharton's jelly (WJ).^{10,11} All these alternative sources for MSCs have been discovered in the past 20 years, but scientific knowledge is developing significantly in this rapidly evolving field. Even though many of the original studies denoted that the MSCs obtained from different tissues have the same characteristics as their marrow-isolated counterparts,^{3,4,12} more recent ones indicate that there might be differences on the proliferative capacity¹³ or even the therapeutic potential of the cells,^{13,14} depending on their origin.

ABBREVIATIONS: CDT(s) = cell doubling time(s); FP-I (-II) = frozen Primoculture I (II) cells; HSC(s) = hematopoietic stem cell(s); MSC(s) = mesenchymal stem or stromal cell(s); P-I (-II) = Primoculture I (II); UC-WJ = umbilical cord Wharton's jelly.

From the ¹Hellenic Cord Blood Bank, Biomedical Research Foundation Academy of Athens; and the ²Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

Address reprint requests to: Theofanis K. Chatzistamatiou, Hellenic Cord Blood Bank (HCBB), Foundation for Biomedical Research of Academy of Athens, 4 Sorranou Efessiou Street, 11527, Athens, Greece; e-mail: tchatzi@bioacademy.gr.

Received for publication December 20, 2013; revision received April 3, 2014, and accepted April 11, 2014.

doi: 10.1111/trf.12743

© 2014 AABB

TRANSFUSION 2014;54:3108-3120.

In general, MSCs have the capacity to differentiate in vitro and in vivo into several mesenchymal tissues, such as bone, cartilage, and fat, and can migrate and engraft into injured tissues.^{15,16} These characteristics make MSCs an interesting regenerative medicine tool. Recent advances involve their use in tissue regeneration¹⁷⁻²¹ and wound healing^{22,23} either through a trophic effect^{24,25} exerted by the MSCs in site of injury or through tissue engineering applications.²⁶⁻²⁸ Moreover, their immunomodulatory properties have placed them into focus for the treatment of immune-related conditions such as multiple sclerosis,²⁹ Type 1 diabetes mellitus,³⁰ and Crohn's disease.³¹ Most importantly, since the first case report in 2004 describing durable remission of steroid-resistant acute graft-versus-host disease (GVHD)³² after MSCs infusion, multiple Phase II clinical trials³³⁻³⁶ have provided a strong rationale for what now tends to become a routine medical practice in many European jurisdictions.³⁷ Finally, MSCs can be used in the laboratory, for the production of induced pluripotent stem cells,³⁸ or as a feeding layer support for the growth of induced pluripotent stem³⁹ and hematopoietic stem cells (HSCs).^{40,41}

Under this scope, and in view of the rapidly increasing applications of MSCs, the idea of banking controlled, ready-to-use cells appears appealing. However, for a large-scale banking of clinical-grade MSCs to be possible, the existence of an abundant cell source, easily accessible with noninvasive methods, is necessary. UC-WJ could play that role. The clear advantages of UC-WJ, compared to other sources of MSCs, are the ease of procurement of the cell source that involves no invasive procedures, the fact that UC-WJ MSCs appear to be immune privileged⁴² and could, therefore, be used in an allogeneic setting, and finally their greater expansion potential.⁴³ Additionally, UC is routinely collected, with every cord blood unit donation, and cryopreserved in the Hellenic Cord Blood Bank, as a source of biologic backup material for testing. A piece of this UC could potentially serve for the isolation and banking of MSCs from WJ. Although recent studies have either addressed the question of the optimal MSC isolation method from the UC^{44,45} or validated cryopreservation conditions for UC-WJ MSCs,^{46,47} to our knowledge, there are no data combining these two critical variables for the MSC banking.

Thus, the aim of this study was to test whether freezing and storage, along with different isolation methods may affect the growth kinetics and the phenotypic and the functional characteristics of UC-WJ MSCs. The possibility of banking UC tissue rather than isolated MSCs was also envisaged. This quest is of great clinical relevance for the development of a UC-WJ MSCs bank within a cord blood bank. This MSC bank would enhance the main HSC banking activity providing with MSCs to be used for the expansion of HSCs and/or the treatment of GVHD. More importantly, the MSC bank could also allow a diversifica-

tion of services, supplying with MSCs other clinical applications such as regenerative medicine or tissue engineering.

MATERIALS AND METHODS

Collection of UC

After informed consent was obtained from the mothers by experienced midwives trained in cord blood collection, fresh UCs (5 to 10 cm) were collected from normal deliveries (gestational ages, 36-40 weeks) and stored into Earl's balanced salt solution (EBSS, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) complemented with 100 U penicillin/1000 U streptomycin (Gibco) and processed in less than 24 hours. The collections were performed in accordance with the ethical standards of the Greek National Ethical Committee and were approved by our institution's ethical board. The UC tissues were processed according to the schematic representation presented in Fig. 1.

UC preparation and culture of isolated cells

Initial treatment of UC-WJ consisted of removing blood vessels by blunt dissection, and the remaining connective tissue (WJ) was trimmed with scissors and scalpels into 2- to 3-mm³ pieces. Part of these tissue fragments was processed using two different protocols, while the rest of the tissue fragments were immediately frozen and processed after 1 week, 1 month, and 6 months (Fig. 1). Specifically:

Protocol 1: enzymatic isolation of UC-WJ-derived cells

Initially, UC tissue fragments were treated for 16 hours (overnight) at 37°C with 0.2% collagenase (Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO) and 0.1% hyaluronidase (Sigma-Aldrich) and then treated with 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) for 30 minutes at 37°C with agitation. After trypsin digestion, cells were washed in Earl's balanced salt solution, resuspended in culture medium, and counted. They were then divided into two equal parts. One part (approx. 3.75×10^5 cells) was directly frozen in liquid nitrogen (F). The other part was plated at a density of 5×10^3 cells/cm² in 75-cm² flasks and cultured with growth medium consisting of α -minimum essential medium (α -MEM, Gibco) supplemented with 2 mmol/L L-glutamine (Gibco), 100 U penicillin/1000 U streptomycin, and 15% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and cultured (Primoculture I [P-I]) under standard conditions (37°C, 5% CO₂ [vol/vol] in air). Upon reaching subconfluency (approx. 20 days) cells were separated into two equal parts. One part of the cells was frozen (FP-I) for further use and the second part of P-I was processed for differentiation and immunophenotypic assays.

Protocol 2: WJ explant culture

In an alternate isolation method UC tissue fragments were placed into six-well plates (Costar, Corning Life Sciences,

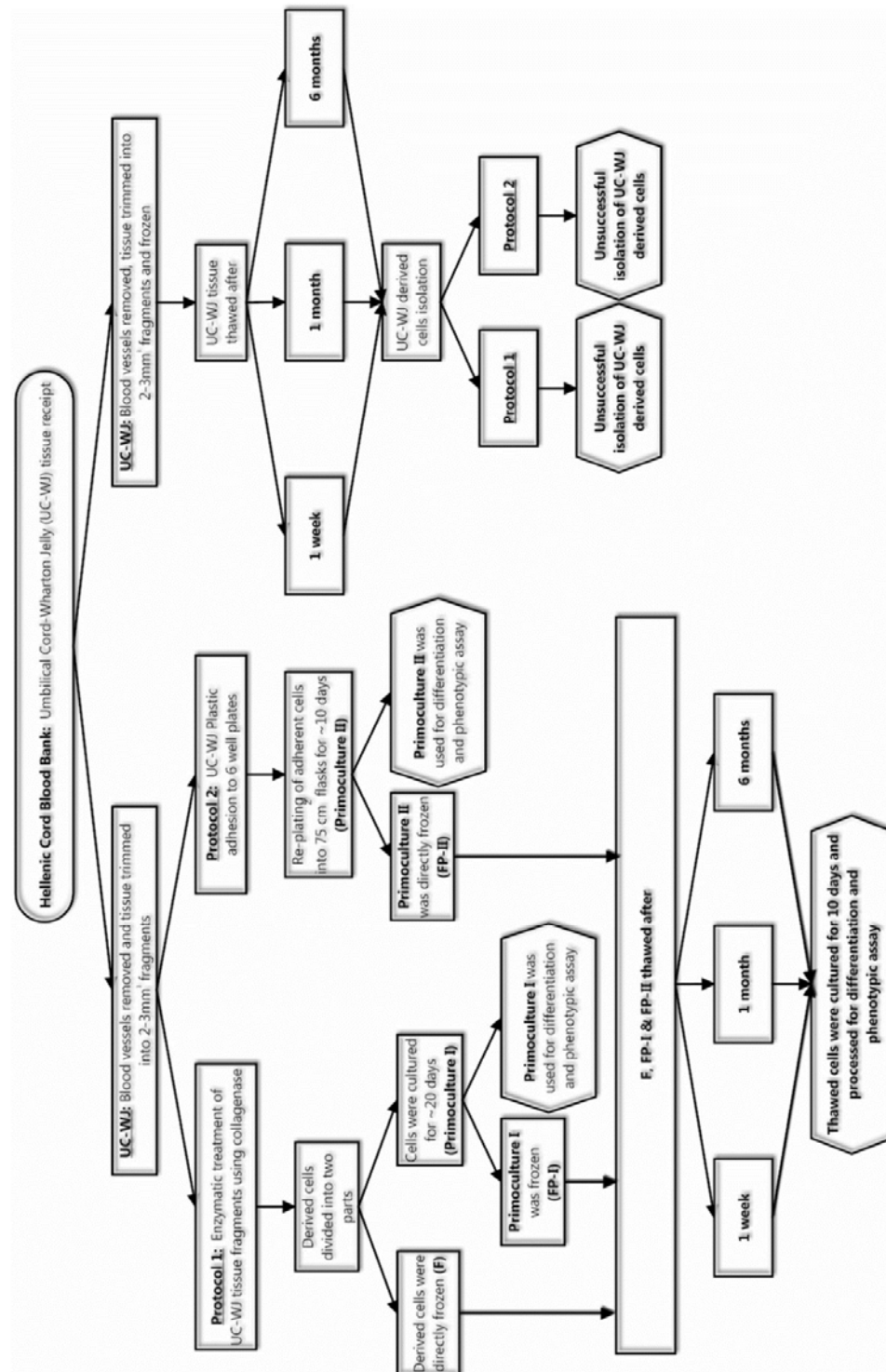


Fig. 1. Flow chart of the experimental design.

Canton, MA) and cultured with growth medium under standard conditions. Upon appearance of sufficient number of adherent cells (approx. 5 days) in the tissue culture plates, those were detached using 0.25% trypsin-EDTA solution, washed, and replated (Primoculture II [P-II]) into 75-cm² flasks (Costar). On reaching 80% of confluence (approx. 10 days) cells were trypsinized, washed, and resuspended in their culture medium. These UC-WJ-derived cells were also divided into two equal parts. The first part of the P-II cells was frozen (FP-II) for further use, whereas the second part was further processed for differentiation and immunophenotypic assays.

Freezing procedures

All UC-WJ-derived cells, at the end of Ps-I and -II, were placed in a precooled (4°C) cryopreservation solution consisting of 10% DMSO, 5% glycerol, and 20% FBS in α -minimum essential medium to a final concentration of 10⁶ cells/mL. Moreover, 10 to 20 UC-WJ unprocessed tissue fragments of 2 to 3 mm³ were placed in 1 mL of the same medium. Freezing of the cells initiated immediately, placing them in a container designed to gradually drop temperature by 1°C/min (Mr Frosty, Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA) down to -80°C while unprocessed tissue fragments were kept at 4°C for 30 minutes before being placed in the freezing container, to allow for the cryoprotectant to penetrate the tissue. Thus, cells and tissue temperature gradually reached -80°C and then were subsequently stored in the liquid phase of liquid nitrogen at -196°C for 1 week, 1 month, and 6 months.

Cell viability counts and growth rate determination

Fresh and cryopreserved cell viability counts were determined using trypan blue staining. An automated cell counter system (Countess, Invitrogen, Paisley, UK) was used for the counts. Additionally, growth rate, for each culture, was calculated by means of cell doubling time (CDT). The equation for CDT determination was

$$CDT = \frac{\log_{10}(N/N_0)}{\log_{10}(2)} \times (T),$$

where N is the number of cells at the end of the culture, N₀ is the number of cells seeded, and T is the culture duration in hours.

Immunophenotyping analysis of MSCs

For further characterization, cell surface antigen phenotyping was performed to all cultured cells using flow cytometry. Cells were labeled with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD105 (Serotec, Oxford,

UK), CD29 (Dako, Glostrup, Denmark), CD44 (Dako), CD58 (Immunotech, Beckman Coulter, Marseille, France), and CD51 (Immunotech) and with phycoerythrin-conjugated anti-CD90 (Immunotech), CD73 (Pharmingen, Becton Dickinson France S.A.S. Belgian Branch, Erembodegem, Belgium), CD34 (Immunotech), and HLA Class I (Dako) mouse anti-human monoclonal antibodies (MoAbs). Epitopes CD45 and HLA Class II were assessed with PC5-conjugated mouse anti-human MoAbs (IOtest, Immunotech). Mouse isotype antibodies served as control (Pharmingen) and 10,000 labeled cells were acquired. Stained cells were counted in a flow cytometer (Epics XL, Beckman Coulter, Marseille, France) and the results were analyzed with the software (EXPO32 ADC, Beckman Coulter).

Differentiation procedures

Differentiation capacity was assessed by attempting to differentiate UC-WJ-derived cells into the adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages. Osteogenic differentiation was induced on cultured UC-WJ-derived cells using basal medium (MesenCult, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) supplemented with 15% (vol/vol) osteogenic stimulatory supplements (StemCell Technologies), 10⁻⁸ mol/L dexamethasone (StemCell Technologies), and 50 µg/mL ascorbic acid (StemCell Technologies). Osteogenic differentiation was assessed with Alizarin red S (Sigma-Aldrich) staining. Adipogenic differentiation was induced on cultured UC-WJ-derived cells with the use of the commercially available adipogenic differentiation kit (StemCell Technologies). Accumulation of lipid vacuoles was visualized with 0.5% (vol/vol) oil red O. Finally, for chondrogenic differentiation a micromass culture system was used. Chondrogenic medium consisted of high-glucose DMEM (Gibco) supplemented with 100 nmol/L dexamethasone (StemCell Technologies), 35 µg/mL ascorbic acid-2-phosphate (StemCell Technologies), 10 ng/mL transforming growth factor-β1 (Sigma-Aldrich), liquid medium supplement (ITS⁺ premix, Sigma-Aldrich), and 1 mmol/L sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). Chondrogenic differentiation was assessed with alcian blue (Fluka, Sigma-Aldrich) staining of pellet paraffin-embedded microsections.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± SD. The Kolmogorov-Smirnov test was employed to investigate the normality of the variables distribution. If the F distribution was significant, the groups were compared by the two-sample t test (equal variance hypothesis was controlled using the Fisher or the Levene's test according to the variables distribution). A p value of less than 0.05 was considered to be significant. Computer software (Minitab Statistical

CHATZISTAMATIOU ET AL.

TABLE 1. Cell culture kinetics of freshly isolated and thawed UC-WJ MSCs

	Fresh cells		Thawed cells	
MSCs	P-I		FP-I	
Freezing duration		1 week	1 month	6 months
Number	10	10	10	10
Number of isolated cells ($\times 10^5$)	1.75 ± 0.94	NA	NA	NA
Mean cell viability (%)	83 ± 17	75 ± 21	81 ± 12	79 ± 16
% of cultures with cell growth (number)	100 (10)	100 (10)	100 (10)	100 (10)
CDT (hr)	$141.30 \pm 43.45^\dagger$	123.06 ± 46.16	121.25 ± 2.40	148.63 ± 25.40
Final cell yield ($\times 10^6$)	3.42 ± 1.8	NA	NA	NA
MSCs	P-II		FP-II	
Freezing duration		1 week	1 month	6 months
Number	10	10	10	10
Number of isolated cells ($\times 10^5$)	3.02 ± 0.66	NA	NA	NA
Mean cell viability (%)	93 ± 5	71 ± 17	73 ± 25	83 ± 16
% of cultures with cell growth (number)	100 (10)	100 (10)	100 (10)	100 (10)
CDT (hr)	$87.22 \pm 19.28^\ddagger$	$134.43 \pm 45.50^\ddagger$	$127.80 \pm 26.41^\ddagger$	$143.41 \pm 46.69^\ddagger$
Final cell yield ($\times 10^6$)	4.57 ± 1.9	NA	NA	NA
MSCs			F	
Freezing duration		1 week	1 month	6 months
Number	10	10	10	10
Number of isolated cells ($\times 10^5$)	1.75 ± 0.94	NA	NA	NA
Mean cell viability (%)	83 ± 17	53 ± 19	62 ± 25	49 ± 22
% of cultures with cell growth (number)	Not cultured	10 (1)	0 (0)	10 (1)
CDT (hr)	Not cultured	209.27	NA	259.88

* Overview of the culture kinetics of fresh (P-I and P-II) and thawed (FP-I, FP-II, and F) UC-WJ MSCs. Generally, both isolation methods had comparable results as shown by P-I and P-II comparison with the exception of CDT that was calculated lower in P-II UC-WJ MSCs in respect to P-I cells. When those cells were frozen and then thawed (FP-I and FP-II) they remained equivalent for every cryopreservation period studied. Finally, comparison of postfreezing FP cells with their corresponding prefreezing P cells presented only minor differences between FP-II and P-II CDTs. In contrast, F UC-WJ MSCs showed poor results at all levels and no further statistical analysis was possible.

$^\dagger p = 0.120$.

$^\ddagger p = 0.021$, $p = 0.028$, and $p = 0.011$ for cells cryopreserved 1 week, 1 month, and 6 months, respectively.

Software, Release 13.1, Minitab, Inc., State College, PA) was used to perform the statistical analysis.

RESULTS

Isolation of UC-WJ MSCs from UC-WJ tissue fragments

Two protocols were used for MSC isolation from both fresh and thawed UC-WJ tissue fragments (Fig. 1). The use of Protocol 1 on thawed UC-WJ tissue fragments resulted in the appearance of a few viable cells migrating on the plastic culture surface. However, these cells did not proliferate and did not have any distinctive morphologic characteristics. Similarly with Protocol 2 (enzymatic digestion), no viable cells were recovered from thawed UC-WJ fragments. In contrast, all attempts to isolate MSCs from fresh UC-WJ tissue were successful (Table 1). The number of P-II UC-WJ MSCs recovered applying Protocol 2 was $3.02 \times 10^5 \pm 0.66 \times 10^5$ cells per cm of fresh tissue (Table 1), while a mean of $1.75 \times 10^5 \pm 0.94 \times 10^5$ viable P-I UC-WJ MSCs were recovered per cm of fresh tissue applying Protocol 1. Furthermore, P-II UC-WJ MSCs grew significantly ($p = 0.120$) faster than P-I UC-WJ MSCs with mean CDTs of 87.22 ± 19.28 and 141.30 ± 43.45 hours, respectively. The final yield of P-II cells at confluence was $4.57 \times 10^6 \pm 1.90 \times 10^6$ cells after 10 days of culture, while

the final population of P-I UC-WJ MSCs at confluence was $3.42 \times 10^6 \pm 1.80 \times 10^6$ after 20 days of culture (Table 1).

As a first approach toward the comparative characterization of MSCs, we analyzed the morphology of cells developed in cultures using all protocols. Thus, a characteristic spindle shape-like morphology was observed in both early P-I (Fig. 2A) and P-II UC-WJ MSCs (Fig. 2B) and confluent cultures (Figs. 2C and 2D, respectively).

Culture characteristics of cryopreserved UC-WJ MSCs

After an initial period of cryopreservation of 1 week, 1 month, and 6 months all FP-I and FP-II, as well as F-UC-WJ MSCs were retrieved from liquid nitrogen and cultured. When $83 \pm 17\%$ viable P-I UC-WJ MSCs were cryopreserved, 75 ± 21 , 81 ± 12 , and $79 \pm 16\%$ viable FP-I UC-WJ MSCs were recovered at thawing after 1 week, 1 month, and 6 months, respectively (Table 1), showing a good preservation of the cells' viability in liquid nitrogen. Similarly, good preservation of viability was observed when 71 ± 17 , 73 ± 25 , and $83 \pm 16\%$ viable FP-II UC-WJ MSCs were recovered for the same periods as mentioned, while prefreezing P-II cell viability was $93 \pm 5\%$ (Table 1). However, this was not the case for F UC-WJ MSCs; their viability dropped to 53 ± 19 , 62 ± 25 , and $49 \pm 22\%$ (after 1 week, 1 month, and 6 months of cryopreservation,

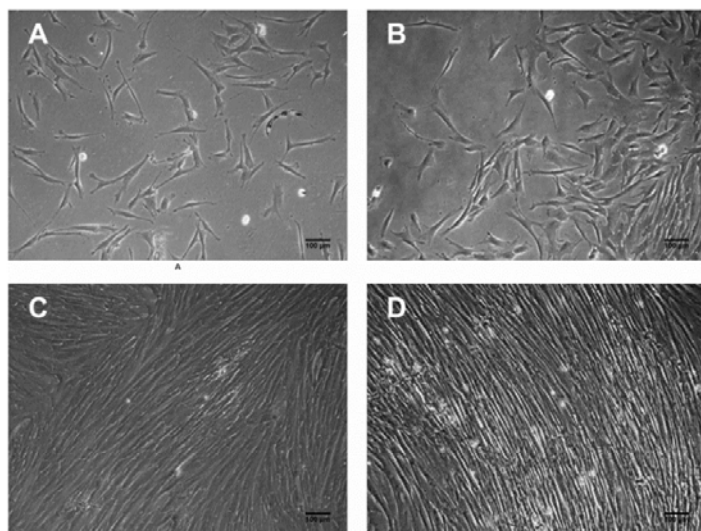


Fig. 2. Morphologic appearance of UC-WJ MSCs. The P-I (A) and P-II (B) took on the appearance of long spindle-shaped fibroblast cells and began to form colonies after the first 5 days of culture. P-I became confluent after 20 days (C) and P-II after 10 days (D), while their morphologic aspect was maintained (magnification = $\times 100$).

respectively) even though it had been measured to be $83 \pm 17\%$ at the time of freezing (Table 1). In addition FP-I and FP-II UC-WJ MSCs were successfully cultured independently of the cryopreservation period and their CDTs were comparable to each other (Table 1). Adherent cells with a characteristic spindle shape-like morphology were already visible on the fifth day of culture of FP-I (Figs. 3A-3C) and FP-II UC-WJ MSCs (Figs. 3E-3G) cryopreserved for 1 week, 1 month, and 6 months. This morphology was maintained for the entire culture period until cells reached confluence (Figs. 3D and 3H). In contrast, of all F UC-WJ MSC cryopreserved samples, only in one case of 1 week (Fig. 3I) and that of 6 months (Fig. 3J) adherent wide cells, with irregular, rather than spindle-like shape, appeared on the 5th day of culture, but cells grew slowly and never reached confluence.

Immunophenotypic characterization

Immunophenotyping was carried out using a panel of antibodies to a number of surface antigens routinely used for the characterization of MSCs. All UC-WJ MSCs were analyzed at the end of the primoculture period, that is, on Day 20 (P-I) or Day 10 (P-II) from culture initiation. Thawed cells (FP-I and FP-II UC-WJ MSCs) were analyzed on first passage (i.e., on Day 10) after thawing. Both P-I and P-II UC-WJ-derived cell lines presented an MSC characteristic phenotype (Fig. 4). They were negative for hematopoietic markers CD34, CD45, and HLA Class II.

Additionally, all UC-WJ MSC lines were found to be positive for integrins CD29 and CD51 and for matrix receptors CD44, CD58, and CD105 and positive for CD90, CD73, and HLA Class I. Freezing and thawing for all periods studied did not seem to affect the immunophenotype and all UC-WJ MSCs lines were found to retain the same expression patterns as shown by the results presented in Table 2. Direct comparison of prefreezing P-I and P-II UC-WJ MSCs with the postthawing FP-I and FP-II UC-WJ MSCs, respectively, showed some minor variability in the intensity of several markers' expression. Thus, regarding P-I UC-WJ MSCs, $91.3 \pm 4.4\%$ of the cells were positive for CD29, while $80.9 \pm 2.4\%$ of FP-I UC-WJ MSCs thawed after 1 month of cryopreservation were positive for the same marker. In contrast, CD51 expression was higher ($85.5 \pm 6.0\%$ instead of $64.0 \pm 7.1\%$) in FP-I UC-WJ MSCs thawed after 1 month of cryopreservation and remained high in cells cryopreserved for 6 months

($81.6 \pm 2.2\%$). The marker CD90 was expressed in $92.8 \pm 0.2\%$ of FP-I UC-WJ MSCs thawed at 6 months and only in $86.7 \pm 4.4\%$ of P-I MSCs. Similarly, in cells isolated with Protocol 2, CD51 expression showed greater variability between fresh P-II ($95.8 \pm 3.3\%$ positive cells) and thawed FP-II UC-WJ MSCs cryopreserved for 1 week and 6 months (79.4 ± 17.4 and $84.8 \pm 11.7\%$ positive cells, respectively). Finally, CD44 expression in FP-II UC-WJ MSCs cryopreserved for 1 month was measured to be $79.8 \pm 17.6\%$, which was significantly lower than the $96.5 \pm 3.6\%$ observed in P-II UC-WJ MSCs.

Differentiation potential of UC-WJ MSCs

The differentiation potential of MSCs isolated using the protocols described in Fig. 1 was analyzed under particular culture conditions that favor osteogenic, adipogenic, or chondrogenic differentiation. MSCs obtained at completion of P-I and P-II or FP-I and FP-II cultures were exposed to osteogenic medium for 3 weeks and their osteogenic differentiation potential was observed in their distended cell bodies, in close proximity to each other. Alizarin red S stain specific for calcium mineralization showed direct evidence of calcium deposits as amorphous accumulations in P-I (Fig. 5A) and P-II (Fig. 5D) at the end of the third week. The osteogenic differentiation potential was also maintained in FP-I (Fig. 5G) and FP-II UC-WJ MSCs (Fig. 5J) no matter the cryopreservation period as it was shown in the representative result in 5 months of

CHATZISTAMATIOU ET AL.

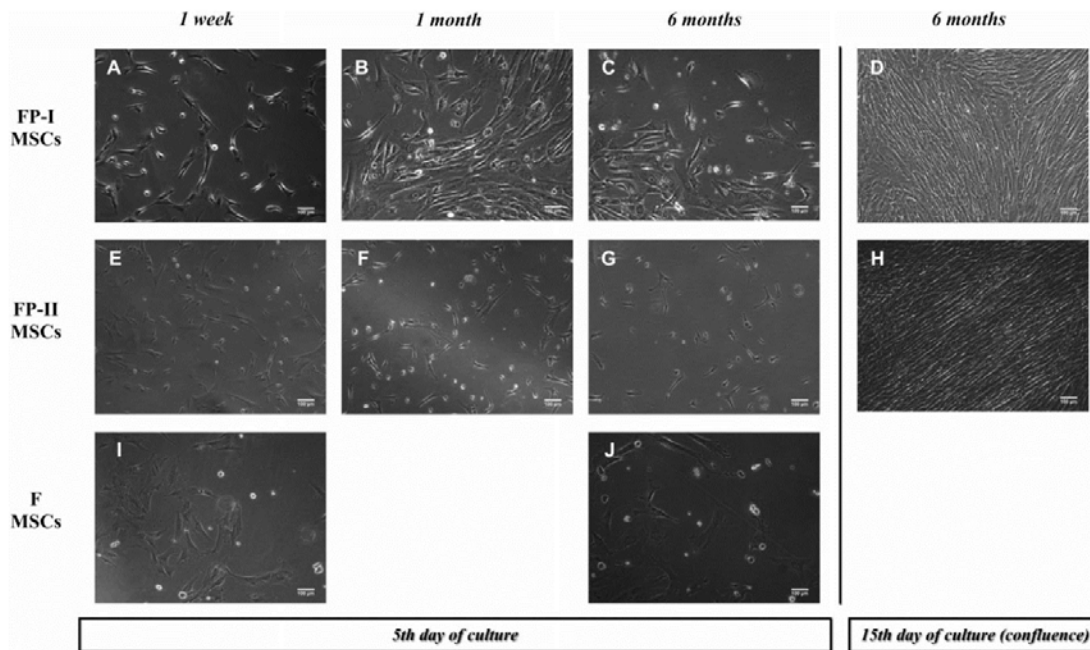


Fig. 3. Representative morphology of all cultured FP-I and FP-II UC-WJ MSCs. On the fifth day of culture, FP-I cells cryopreserved for 1 week (A), 1 month (B), and 6 months (C) as well as FP-II cells cryopreserved for the same periods (E, F, and G, respectively) had the spindle shape-like characteristic morphology of MSCs. This morphology was maintained throughout the culture period of 15 days until confluency as shown by representative pictures of FP-I (D) and FP-II (H) confluent cells (cryopreserved for 6 months). In contrast, in cultures of F UC-WJ MSC cryopreserved for 1 week (I) and 6 months (J), cells appeared wider and with an irregular shape, showing no spindle shape-like morphology, in the early stages (5 days), and they never reached confluence (magnification = $\times 100$).

cryopreservation. On the other hand, although all cell lines were cultured for up to 21 days in adipogenic medium they did not produce a mature adipocyte phenotype. Oil red O staining revealed the presence of limited number of lipidic inclusions, in P-I (Fig. 5B), P-II (Fig. 5F), FP-I (Fig. 5H), and FP-II UC-WJ MSCs (Fig. 5K).

The differentiation potential toward the chondrogenic lineage was assessed, culturing UC-WJ MSCs (P-I, P-II, FP-I, and FP-II) in a pellet micromass system. Incubation of MSC pellets in chondrogenic medium for 3 weeks yielded a matrix-rich micromass accompanied by accumulation of proteoglycans and glycosaminoglycans as evidenced by alcian blue staining (Figs. 5C, 5E, 5I, and 5L).

DISCUSSION

MSCs have been in the focus of biomedical science for the past few years. Even though details of the mechanisms implicated in their therapeutic action are not yet clarified, they are used in an increasing number of clinical trials. Since the initial isolation of MSCs from the UC tissue, WJ is

being considered as a one of the most important alternatives to marrow due to the great abundance and the easy procurement of the biologic material as well as the intrinsic characteristics of UC-WJ MSCs. This study attempted to evaluate the optimal MSC isolation and cryopreservation method from UC-WJ, as a first step toward a clinical-grade MSC banking.

We compared two different methods for MSC isolation from UC-WJ. The first was based on enzymatic digestion of the connective tissue as previously described^{10,11} (Protocol 1) while the other was an explant culture method (Protocol 2). Although MSC isolation was 100% successful using both methods, allowing mean recoveries of $1.75 \times 10^5 \pm 0.94 \times 10^5$ and $3.02 \times 10^5 \pm 0.66 \times 10^5$ cells/cm tissue treated, respectively, primocultures of UC-WJ MSCs isolated with the explant method (P-II) grew faster with a mean CDT of 87.22 ± 19.28 hours while mean CDT for P-I cells isolated with the enzymatic digestion method was 141.30 ± 43.45 hours. This result agrees with recently published data showing increased MSC yield and viability of explant cultures when compared to enzymatic isolation.⁴⁴

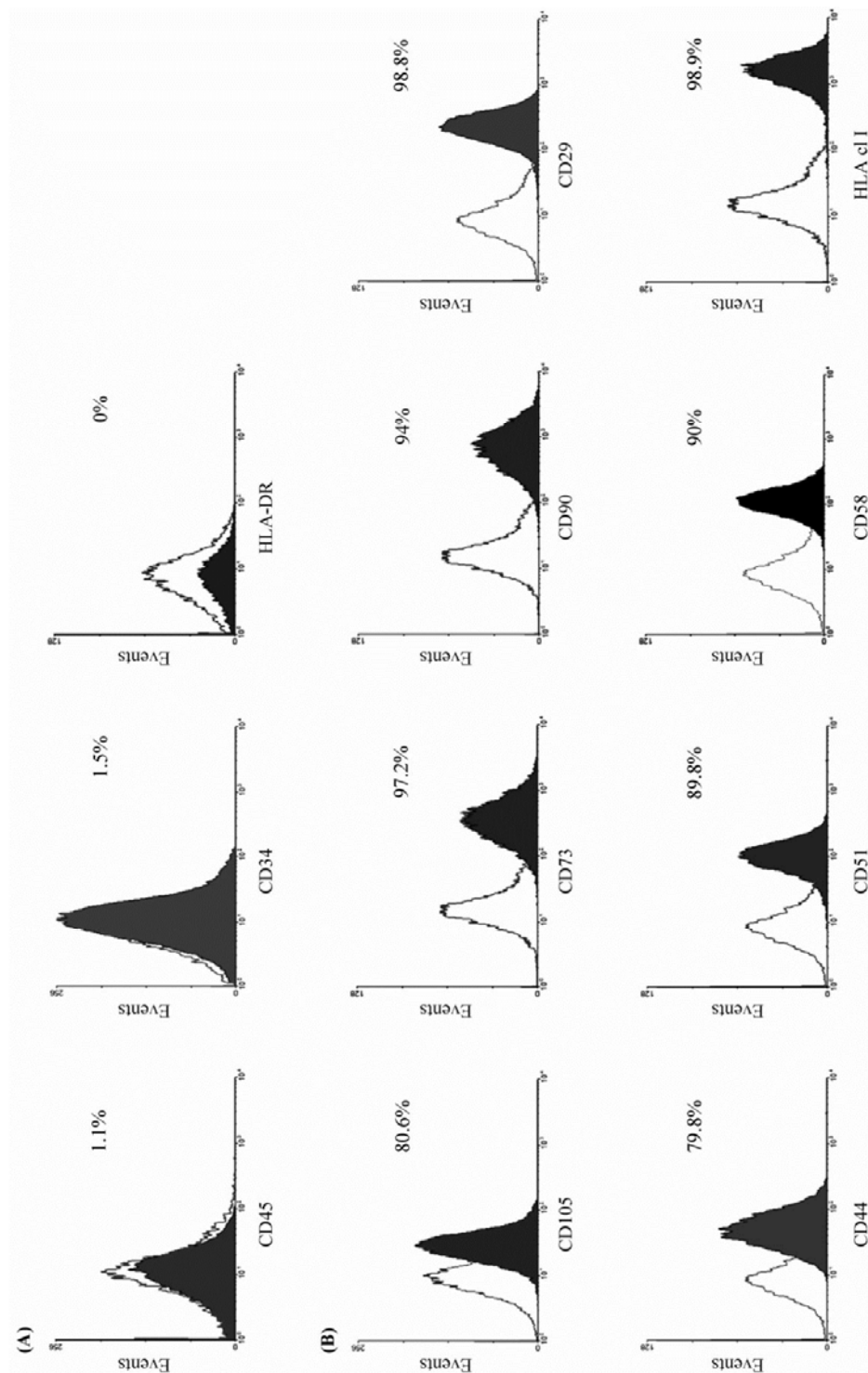


Fig. 4. Flow cytometric analysis of UC-WJ MSCs. All UC-WJ MSCs examined expressed the same immunophenotype. The surface antigens of UC-WJ MSCs were positive for CD29, CD44, CD51, CD75, CD90, CD105, and HLA Class I and negative for CD34, CD45, and HLA-DR. The graph represents FP-II UC-WJ MSCs at Passage 1 cryopreserved for 6 months. The results confirmed that the cells were of a nonhematopoietic MSC lineage. Solid lines represent isotype controls, and filled curves, specific staining.

CHATZISTAMATIOU ET AL.

TABLE 2. Flow cytometry analysis of UC-WJ MSCs*

Freezing time:	Percentage of marker expression									
	P-I MSCs		P-II MSCs		FP-I MSCs		FP-II MSCs		F MSCs	
	1 week	6 months	1 month	1 week	6 months	1 month	1 month	1 week	6 months	1 week
CD105	80.6 ± 8.4	94.9 ± 3.3	83.9 ± 1.7	88.4 ± 1.8	89.9 ± 9.1	92.4 ± 3.8	92.2 ± 4.2	86.7	90.8	86.7
CD90	86.7 ± 2.4	97.0 ± 2.8	94.4 ± 3.7	92.8 ± 0.2†	95.1 ± 4.9	95.2 ± 4.9	90.9 ± 7.2	90.8	90.8	90.8
CD73	95.0 ± 1.4	91.7 ± 6.0	94.7 ± 1.7	93.8 ± 0.8	91.4 ± 5.4	93.0 ± 6.4	98.0 ± 1.6	86.9	86.9	86.9
CD29	91.3 ± 4.4	97.7 ± 3.2	80.9 ± 2.4†	87.1 ± 8.0	97.5 ± 1.0	92.0 ± 6.3	98.8 ± 1.0	92.9	92.9	92.9
CD44	79.9 ± 8.1	96.5 ± 3.6	88.5 ± 4.1	91.8 ± 3.3	93.0 ± 1.8	79.8 ± 17.6†	94.6 ± 6.0	71.5	71.5	71.5
CD51	64.0 ± 7.1	95.8 ± 3.3	85.5 ± 6.0†	81.6 ± 2.2†	79.4 ± 17.4†	92.8 ± 3.6	84.8 ± 11.7†	91.2	91.2	91.2
CD58	74.4 ± 7.6	88.0 ± 14.1	81.8 ± 1.9	88.7 ± 7.3	96.1 ± 3.7	86.9 ± 8.4	90.0 ± 9.5	81.1	81.1	81.1
HLA Class I	91.3 ± 4.4	96.3 ± 5.6	87.3 ± 5.2	94.3 ± 0.1	96.1 ± 3.7	93.3 ± 10.5	88.5 ± 15.4	98.1	98.1	98.1
CD34	2.2 ± 2.0	3.1 ± 3.9	2.4 ± 2.0	3.6 ± 4.1	2.5 ± 2.5	1.8 ± 2.1	1.9 ± 2.4	2.1	2.1	2.1
CD45	1.4 ± 2.8	1.2 ± 0.9	0.1 ± 0.5	1.6 ± 1.0	1.8 ± 1.6	0.2 ± 0.1	1.3 ± 1.8	0.3	0.3	0.3
HLA Class II	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.5	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.4	0.01	0.01	0.01

* Percentages of all UC-WJ MSCs expressing surface markers as determined by flow cytometry. The percentage of expression for each marker is indicated as the mean of all UC-WJ tissue fragments (n = 10) of each group.

† Significant at the p value specified.

The fact that MSCs were recovered at the end of explant cultures could explain the above findings, since the cells (P-II UC-WJ MSCs) were already in an exponential growth phase when Primocultures 2 initiated. In contrast, UC-WJ MSCs were put into P-I directly after an enzymatic digestion stress. Nevertheless, sufficient numbers of cells were recovered for cryopreservation using both methods ($3.42 \times 10^6 \pm 1.80 \times 10^6$ and $4.57 \times 10^6 \pm 1.90 \times 10^6$ for Isolation Methods 1 and 2, respectively). Those cells had MSC immunophenotype, expressing the characteristic surface markers CD105, CD93, CD70, CD29, CD44, CD51, CD58, and HLA Class I antigen, at a comparable level while they were negative for hematopoietic markers CD45, CD34, and HLA Class II. Both P-I and P-II MSCs were capable of at least bilinear differentiation to osteocytes and to chondrocytes but they did not undergo complete adipogenic differentiation after 21 days of induction. This observation is in accordance with previous reports that MSCs of fetal origin have diminished adipogenic differentiation potential.^{48,49}

Trypan blue staining indicated that the cell viability was maintained after FP-I and FP-II UC-WJ MSCs have been thawed. For FP-I UC-WJ-MSCs, postthawing viability ranged from a mean of $75 \pm 21\%$ to a mean of $81 \pm 12\%$ depending on the cryopreservation period while the range of FP-II UC-WJ MSCs postthawing mean viability was from $71 \pm 17\%$ to $83 \pm 16\%$. The phenotypic characteristics of thawed cells were maintained regardless of the cryopreservation period as confirmed by flow cytometric analysis.

In cases where statistical difference in the surface antigen expression was observed, before freezing and after thawing, a high SD characterized the measurements. This was true for CD51 expression, which consistently showed great variation between samples. Similarly, discrepancies linked to the measurement method could account for the significant difference observed in CD44 expression of 1-month cryopreserved FP-II UC-WJ MSCs. Other differences in the surface marker expression of individual cell groups, namely, CD29 and CD90 in FP-I UC-WJ MSCs cryopreserved for 1 and 6 months, respectively, did not appear to have any biologic significance. Finally, differentiation potential of FP-I and FP-II UC-WJ MSCs was the same as that of P-I and P-II UC-WJ MSCs since they promptly differentiated into osteocytes and chondrocytes while adipogenic differentiation was not complete after the induction period.

All attempts to isolate MSCs from fresh tissue were successful; however, this was not the case with cryopreserved tissue fragments. While other groups have reported isolating MSCs from thawed umbilical tissue,^{46,50} in this study we have been unable to verify these results. Despite this discrepancy, the team of Da-Croce and colleagues⁴⁶ have mentioned morphologic changes to the frozen tissue fragments and low viability of cells recovered

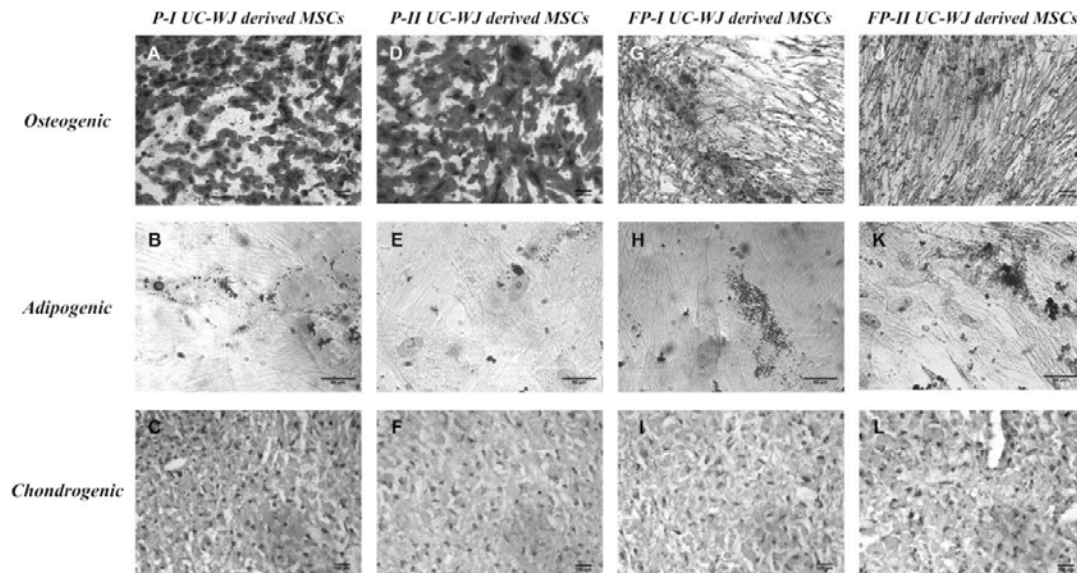


Fig. 5. Differentiation potential of fresh P-I, P-II, FP-I, and FP-II UC-WJ MSCs after 21 days of osteogenic, adipogenic, and chondrogenic induction. Calcium deposit and osteoid formation is shown by alizarin red staining in P-I (A), P-II (D), and FP-I (G) and FP-II (J) UC-WJ MSCs thawed after 6 months of cryopreservation. In contrast, there was a limited presence of lipid vesicles shown by oil red O stain of the same cells (B, E, H, and K, respectively) cultured in adipogenic favoring conditions. Finally, an alcian blue staining of the extracellular matrix in all P-I (C), P-II (F), and 6-month cryopreserved FP-I (I) and FP-II (L) UC-WJ MSCs showed the presence of proteoglycans and glycosaminoglycans in the extracellular matrix after chondrogenic induction (magnification: A, C, D, E, G, I, J, and L = $\times 100$; B, E, H, and K = $400\times$).

after thawing and suggested the need for further evaluation of freezing variables such as cryoprotectant's concentration and cooling rates, variables that could account for our failure to isolate cells. Nevertheless, banking of cells instead of tissue might be of greater value for future clinical applications, since it allows storage of a fully characterized and controlled, ready-to-use, product.

Another important point that this study permitted us to clarify was the benefit of culturing the MSCs before freezing. In contrast to P-I and P-II UC-WJ-derived cells that were successfully recovered in 100% of the cases after freezing and thawing, cells cryopreserved immediately after enzymatic isolation failed to grow in culture. Only 10% of F-UC-WJ MSCs, thawed after 1 week and 6 months, and none of the stored samples thawed after 1 month of cryostorage could be recovered. Probably submitting the cells into the successive stress of prolonged enzymatic tissue digestion and freezing compromised their viability, while the primocultures allowed the MSCs to recover before cryopreservation. This hypothesis is in concordance with the low viabilities observed after thawing for the F-UC-WJ MSCs ranging from $49 \pm 22\%$ to $62 \pm 25\%$.

Overall, this study allowed the conclusion that the optimal banking procedure for UC-WJ MSCs requires culture and expansion of the cells before cryopreservation. Although no biologic factors favor one isolation method over another, we consider that the explant technique is preferable because it is simpler and without enzymatic digestion, and therefore, causes less stress to the cells. Furthermore, the overall cost of the second isolation method is significantly lower and this is a factor that should be taken under consideration, especially for large-scale clinical banking.

Considering the rapidly increasing number of studies on MSCs from the UC that provide with a rationale for their use in a wide range of cellular therapy^{30,38,51-53} or regenerative medicine⁵⁴⁻⁵⁷ applications, banked cells might prove to be a valuable resource. We believe that our results are a first step toward the development of banking protocols for clinical-grade MSCs for novel applications. Finally, the development of MSC banks within cord blood banks could provide an important boost in stem cell banking, especially since there are indications that UC-WJ MSCs can play a significant role in CD34+ cell expansion⁵⁸ and cryopreservation⁵⁹ and GVHD incidence

CHATZISTAMATIOU ET AL.

reduction,⁶⁰ adding a new tool in the inventory of clinical hematology.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-47.
2. Till JE, McCullough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-22.
3. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101-9.
4. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22:1338-45.
5. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;19:1450-6.
6. Erices A, Conget P, Minguel JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-42.
7. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-75.
8. Yang SE, Ha CW, Jung M, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy* 2004;6:476-86.
9. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21:105-10.
10. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006;91:1017-26.
11. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004;22:1330-7.
12. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005;33:1402-16.
13. Jin HJ, Bae YK, Kim M, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* 2013;14:17986-8001.
14. Ryu HH, Kang BJ, Park SS, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *J Vet Med Sci* 2012;74:1617-30.
15. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003;101:2999-01.
16. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. 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;5:1028-38.
17. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8932-7.
18. Le Blanc K, Gotherstrom C, Ringden O, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* 2005;79:1607-14.
19. Williams AR, Suncion VY, McCall F, et al. Durable scar size reduction due to allogeneic mesenchymal stem cell therapy regulates whole-chamber remodeling. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000140.
20. Akram KM, Samad S, Spiteri MA, et al. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. *Respir Res* 2013;14:9.
21. Zhu XY, Lerman A, Lerman LO. Concise review: mesenchymal stem cell treatment for ischemic kidney disease. *Stem Cells* 2013;31:1731-6.
22. Dash S, Dash N, Guru B, et al. Towards reaching the target: clinical application of mesenchymal stem cell (MSC) for diabetic foot ulcers (DFUS). *Rejuvenation Res* 2014;17:40-53.
23. Zografou A, Papadopoulos O, Tsigris C, et al. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats. *Ann Plast Surg* 2013;71:225-32.
24. Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, et al. Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. *J Gastroenterol* 2013;49:270-82.
25. Tamari M, Nishino Y, Yamamoto N, et al. Acceleration of wound healing with stem cell-derived growth factors. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:e369-75.
26. Mendez JJ, Ghaedi M, Steinbacher D, et al. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized lung scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2014;20:1735-46.

27. Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, et al. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med* 2012;4: 141ra93.
28. Bray LJ, George KA, Huttmacher DW, et al. A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus. *Biomaterials* 2012;33:3529-38.
29. Karussis D, Kassir I, Kurkalli BG, et al. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 2008;265:131-5.
30. Hu J, Yu X, Wang Z, et al. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr J* 2013;60:347-57.
31. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009;52:79-86.
32. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363: 1439-41.
33. Le Blanc K, Frasson F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371: 1579-86.
34. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:200-7.
35. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81:1390-7.
36. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:804-11.
37. Galipeau J. The mesenchymal stromal cells dilemma—does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy* 2013;15:2-8.
38. Adegani FJ, Langroudi L, Arefian E, et al. A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Mol Biol Rep* 2013;40:3693-703.
39. Havasi P, Nabioni M, Soleimani M, et al. Mesenchymal stem cells as an appropriate feeder layer for prolonged in vitro culture of human induced pluripotent stem cells. *Mol Biol Rep* 2013;40:3023-31.
40. Robinson SN, Ng J, Niu T, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:359-66.
41. Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion* 2008;48:2638-44.
42. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008;26:2865.
43. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, et al. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 2010;5:e9016.
44. Yoon JH, Roh EY, Shin S, et al. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int* 2013; 2013:428726.
45. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2012;48:75-83.
46. Da-Croce L, Gambarini-Paiva GH, Angelo PC, et al. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell Tissue Bank* 2013;14:65-76.
47. Balci D, Can A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Cur Stem Cell Res Ther* 2013; 8:6.
48. Ragni E, Viganò M, Parazzi V, et al. Adipogenic potential in human mesenchymal stem cells strictly depends on adult or foetal tissue harvest. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45:2456-66.
49. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007;25:319-31.
50. Friedman R, Betancur M, Boissel L, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:1477-86.
51. Corrao S, La Rocca G, Lo Iacono M, et al. New frontiers in regenerative medicine in cardiology: the potential of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013;8:39-45.
52. Garzón I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, et al. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18:408-19.
53. Du T, Zou X, Cheng J, et al. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:59.

CHATZISTAMATIOU ET AL.

54. Chen X, Zhang F, He X, et al. Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. *Injury* 2013;44:540-9.
55. Baba K, Yamazaki Y, Ishiguro M, et al. Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived fibrin: a preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg* 2013; 41:775-82.
56. Tam K, Cheyyatraviendran S, Venugopal J, et al. A nanoscaffold impregnated with human Wharton's Jelly stem cells or its secretions improves healing of wounds. *J Cell Biochem* 2014;115:794-803.
57. Fong CY, Tam K, Cheyyatraivendran S, et al. Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. *J Cell Biochem* 2014;115:290-302.
58. Klein C, Strobel J, Zingsem J, et al. Ex vivo expansion of hematopoietic stem- and progenitor cells from cord blood in coculture with mesenchymal stroma cells from amnion, chorion, Wharton's jelly, amniotic fluid, cord blood, and bone marrow. *Tissue Eng Part A* 2013;19:2577-85.
59. Lin HD, Bongso A, Gauthaman K, et al. Human Wharton's jelly stem cell conditioned medium enhances freeze-thaw survival and expansion of cryopreserved CD34+ cells. *Stem Cell Rev* 2013;9:172-83.
60. Fan X, Gay FP, Ong SY, et al. Mesenchymal stromal cell supported umbilical cord blood ex vivo expansion enhances regulatory T cells and reduces graft versus host disease. *Cytotherapy* 2013;15:610-9. ■