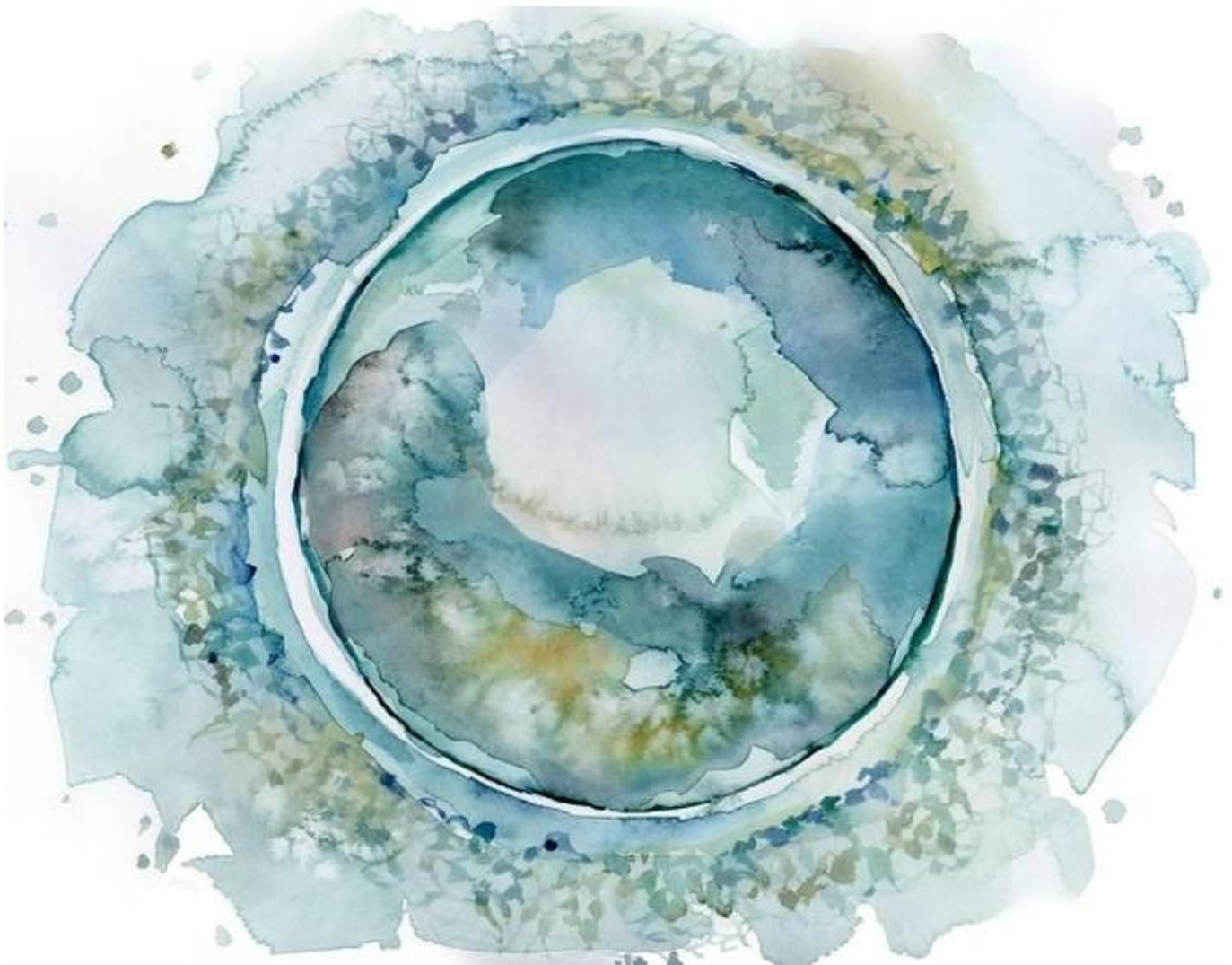


ΕΚΦΡΑΣΗ DAZL, OCT4 ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ ΣΕ ΚΑΙΝΟΤΟΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Π.Μ.Σ. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ
ΠΛΑΤΑΝΙΑ ΒΑΡΒΑΡΑ
Γ.Ν.Α.ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ | ΙΑΤΡΙΚΗ Ε.Κ.Π.Α



ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΚΡΙΣΕΩΣ
ΤΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
Της Μεταπτυχιακής Φοιτήτριας Πλατανιά Βαρβάρα

Εξεταστική Επιτροπή

- , Επιβλέπων
-
-

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή η οποία ορίστηκε απο την ΓΣΕΣ της Ιατρικής Σχολής του Παν. Αθηνών Συνεδρίαση της/...../.....για την αξιολόγηση και εξέταση τ... υποψηφίου κ..., συνεδρίασε σήμερα .../.../....

Η Επιτροπή **διαπίστωσε** ότι η Διπλωματική Εργασία τ. Κ... με τίτλο.....

....., είναι πρωτότυπη, επιστημονικά και τεχνικά άρτια και η βιβλιογραφική πληροφορία ολοκληρωμένη και εμπειριστατωμένη.

Η εξεταστική επιτροπή αφού έλαβε υπ' όψιν το περιεχόμενο της εργασίας και τη συμβολή της στην επιστήμη, με ψήφους προτείνει την απονομή στον παραπάνω Μεταπτυχιακό Φοιτητή την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Master's).

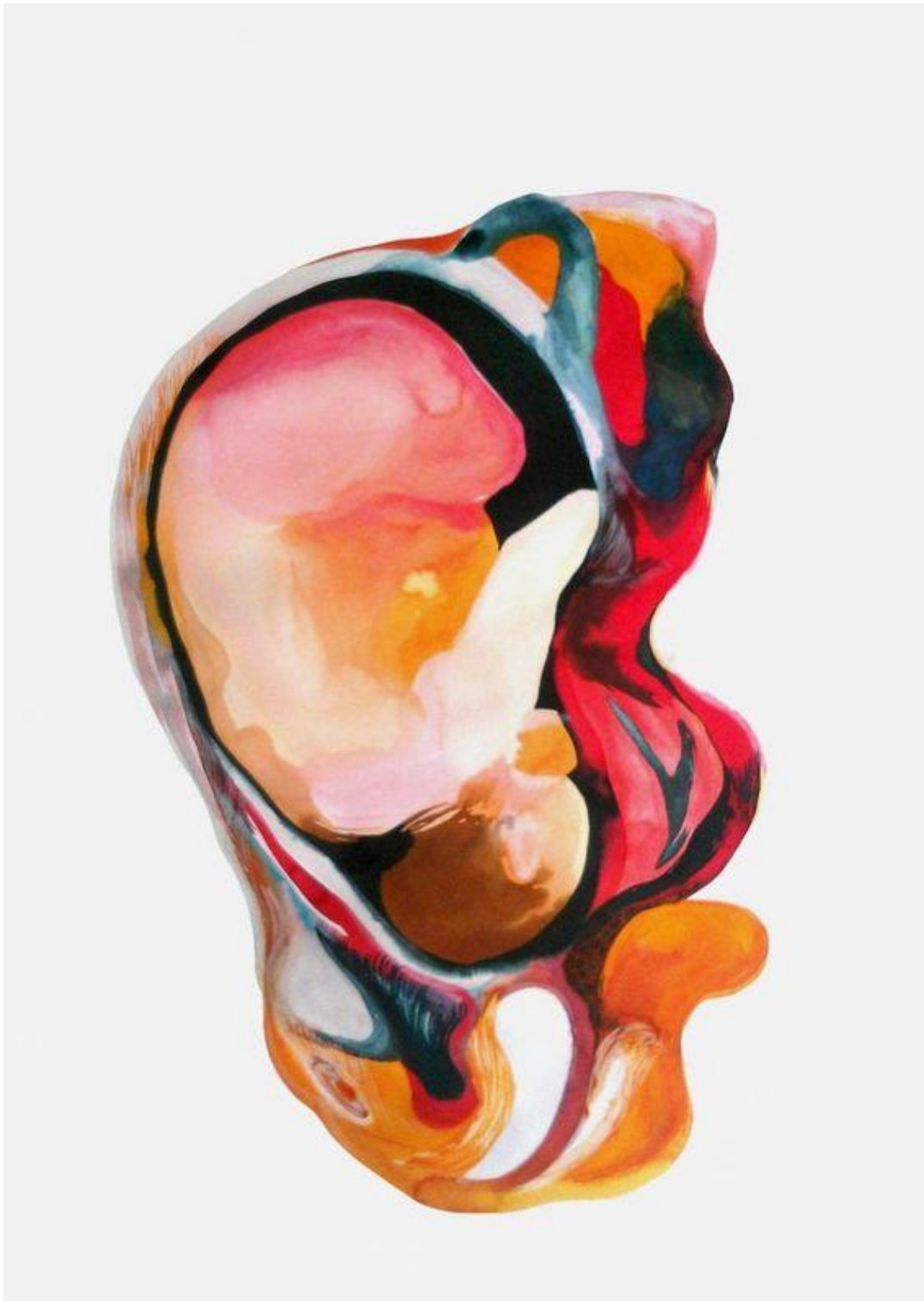
Στην ψηφοφορία για την βαθμολογία ο υποψήφιος έλαβε για τον βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» ψήφους, για τον βαθμό «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ» ψήφους, και για τον βαθμό «ΚΑΛΩΣ» ψήφους Κατά συνέπεια, απονέμεται ο βαθμός «.....».

Τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

....., Επιβλέπων (Υπογραφή) _____

....., (Υπογραφή) _____

....., (Υπογραφή) _____



L'art est fait pour troubler, la science rassure

Georges Braque
(13 May 1882 - 31 Aug 1967)



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικών και Καποδιστριακών
Πανεπιστημίων Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΔΡ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΝΤΙΝΟΠΟΥΛΟΥ, ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΟΣ,
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΔΡΑΚΑΚΗΣ ΠΕΤΡΟΣ
ΑΝΑΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΝΤΟΜΑΛΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΛΑΤΑΝΙΑ ΒΑΡΒΑΡΑ

ΑΘΗΝΑ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2019

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	8
Abstract.....	9
A. Εισαγωγή	
1. Τα βλαστικά κύτταρα.....	11
1.1. Κατηγορίες βλαστικών κυττάρων	13
1.2. Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESC's).....	14
1.3. Πηγές εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.....	15
2. Αμνιακό υγρό.....	22
2.1. Κυτταρικοί πληθυσμοί αμνιακού υγρού.....	23
2.2. Βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού.....	24
2.3. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού.....	25
2.4. Εφαρμογές AF-MSCs: κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία.....	27
2.5. Εύρος διαφοροποίησης AF-MSCs.....	30
2.6. Ρόλος MSCs στην Αναγεννητική Ιατρική.....	31
3. Γονίδια υπό μελέτη.....	33
3.1. Παράγοντες που διέπουν την αυτοανανέωση των πολυδύναμων βλαστικών Κυττάρων.....	33
3.2. Τα γονίδια της οικογένειας DAZL.....	38
3.3. Οωκυτοκίνη.....	44
4. Σκοπός.....	48
B. Υλικά και μέθοδοι	
5. Υλικά.....	51
5.1. Βιολογικό υλικό.....	51
5.2. Καλλιεργητικά υλικά.....	52
6. Κυτταροαλλιέργειες Αμνιακού.....	54
6.1. Εμβολιασμός (set up).....	55
6.2. Ανακαλλιέργεια.....	56
6.3. Συγκομιδή και κατάψυξη κυττάρων (harvest).....	58
7. Μοριακές τεχνικές.....	60
7.1. Απομόνωση RNA.....	60
7.2. Αντίστροφη μεταγραφή-Σύνθεση Cdna.....	61
7.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	62
7.4. Ποσοτική PCR.....	70
7.5. Ηλεκτροφόρηση DNA.....	75
Γ. Αποτελέσματα	
8.1. Αποτελέσματα καλλιέργειας κυττάρων αμνιακού υγρού.....	82
8.2. Αποτελέσματα real time PCR.....	85
Δ. Συζήτηση.....	88
Ε. Βιβλιογραφία.....	92

Ευχαριστίες

Νοέμβρης 19

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική” της Ιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πειραματικό μέρος διενεργήθηκε στο εργαστήριο Αναγεννητικής Ιατρικής καθώς και στο εργαστήριο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α’ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. “Αλεξάνδρα”.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Λουτράδη, καθώς και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Πέτρο Δρακάκη που μου προσέφεραν τη δυνατότητα να συμμετέχω στο συγκεκριμένο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών. Η συμμετοχή μου στο συγκεκριμένο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ήταν μια εμπειρία που πέρα από τις ανεκτίμητες γνώσεις που μου προσέφερε, συνέβαλε σημαντικά στην αλλαγή του τρόπου σκέψης μου πάνω στην έρευνα και την επιστήμη της Αναπαραγωγικής και Αναγεννητικής Ιατρικής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Στεφανίδη. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω σε ένα άρτια οργανωμένο εργαστήριο, παρέχοντάς μου όλα τα απαραίτητα εφόδια προκειμένου να πραγματοποιήσω την έρευνά μου.

Η ανάθεση του θέματος και η επίβλεψη της εργασίας έγιναν από την Δρ. Βάλια Ντινοπούλου, την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριο. Η καθοδήγησή της ήταν ουσιαστική καθόλη την πορεία μου. Μου έδωσε όλα τα απαραίτητα εφόδια για μια σωστή και συγκροτημένη επιστημονική σκέψη που θα με βοηθήσουν στη

μελλοντική μου πορεία. Αποτελεί πρότυπο ερευνητή για εμένα και χαίρομαι γιατί δουλεύοντας υπό την καθοδήγηση της αγάπησα ακόμα περισσότερο την επιστήμη που επέλεξα. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω και σε προσωπικό επίπεδο για το ενδιαφέρον της και τη βοήθειά της όποτε χρειάστηκα κάτι.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Δέσποινα Μαυρογιάννη, Μοριακή Βιολόγο του εργαστηρίου Εξωσωματικής Γονιμοποίησης για την αμέριστη βοήθεια, επιστημονική γνώση και υποστήριξη που προσέφερε, με τη συνεχή παρουσία της στο χώρο του εργαστηρίου

Θα ήταν παράλειψή μου αν στο σημείο αυτό ξεχνούσα να ευχαριστήσω του συνάδελφους μου στο εργαστήριο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. Πρώτα από όλους τον υποψήφιο διδάκτορα Ράμι Ραουάσντε, η άψογη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα, η βοήθειά του σε θεωρητικά και πρακτικά προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αποτελούν για μένα πολύτιμη παρακαταθήκη για το μέλλον. Επίσης τις Μεταπτυχιακές φοιτήτριες Ιωάννα Ματζάκου, Παναγιώτα Μπατσάκη και Έλενα Πάντη που με μόνο γνώμονα την αλληλεγγύη συνέβαλλαν τα μέγιστα στην επιτυχή ολοκλήρωση των πειραμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου, οι οποίοι στεκόταν πάντα δίπλα μου, διακριτικά, σε όλη την διάρκεια κι αυτής της προσπάθειάς. Ήταν οι άνθρωποι που με την αγάπη τους, την υπομονή τους και την διαρκή υποστήριξή τους έκαναν τις δύσκολες στιγμές να μοιάζουν ευκολότερες.

Για το Νίκο και την Βούλα,
Που ήταν, είναι, και θα είναι
Μια αστείρευτη πηγή έμπνευσης

Περίληψη

Τα MSCs (Mesenchymal Stem Cells- Μεσεγχυματικά Βλαστικά κύτταρα) αποτελούν έναν πληθυσμό πολυδύναμων κυττάρων και εμφανίζουν ιδιότητες πολυδυναμίας και αυτοανανέωσης σε επιμέρους ιστούς της μεσεγχυματικής σειράς. Επιπλέον παρουσιάζουν την ικανότητα της *in vivo* αποκατάστασης του ιστού από τον οποίο προέρχονται. Επομένως τα MSCs αποτελούν μια σημαντική πηγή πολυδύναμων κυττάρων για τη συστηματική εφαρμογή αυτόλογης κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας. Συνεπώς, η μελέτη και ο προσδιορισμός εναλλακτικής πηγής MSCs κρίνεται απαραίτητος.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε σε μια καινοτόμο τεχνική καλλιέργειας του AF (Amniotic Fluid- Αμνιακού υγρού), στην οποία ο εμβρυϊκός ορός βοοειδών αντικαθίσταται με ορό αμνιακού υγρού, με σκοπό την ταυτοποίηση, την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό κυττάρων AF-MSCs like (Amniotic Fluid Stem Cells - Βλαστικά κύτταρα Αμνιακού υγρού).

Κύτταρα από ανθρώπινο αμνιακό υγρό καλλιεργήθηκαν και AF-MSCs like ταυτοποιήθηκαν με μικροσκοπία. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης των δεικτών πολυδυναμίας Oct-4, DAZL καθώς και του υποδοχέα της ωκυτοκίνης. Η μοριακή ανάλυση με RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου) έδειξε υψηλή έκφραση του Oct-4 και σημαντική έκφραση του DAZL και του υποδοχέα της ωκυτοκίνης.

Η έκφραση του δείκτη πολυδυναμίας Oct-4 υποδεικνύει την παρουσία AF-MSCs κυττάρων κατάλληλων για άμεση χρήση στην αναγεννητική ιατρική λόγω έλλειψης ορού ζωικής προέλευσης. Η έκφραση του δείκτη DAZL υποδηλώνει την παρουσία πληθυσμού κυττάρων παρόμοιων με γεννητικά κύτταρα. Οι υποδοχείς ωκυτοκίνης εκφράζονται σε αρχικά στάδια ανάπτυξης των θηλαστικών, υποδηλώνοντας ότι η ωκυτοκίνη μπορεί να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε γενετικές κυτταρικές σειρές σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης θηλαστικών.

Abstract

Human mesenchymal stem cells (MSCs) constitute a multipotent cell population and are able to differentiate into various lineages of mesenchymal tissues. Studies have indicated the capability of MSCs for in vitro regeneration of their tissue of origin. It is evident that MSCs play an important role in the systematic application of autologous cell and gene therapy. Amniotic fluid (AF) represents a noncontroversial MSCs source.

The present study, focused on an innovative technique of cultured AF, in which fetal bovine serum is replaced with amniotic fluid serum, to achieve the identification, isolation and characterization of AF stem cell like cells.

Cells from human amniotic fluid were cultured and AF-MSCs like cells were identified with microscopy. Cells were isolated and analyzed for gene expression of pluripotency markers Oct-4, DAZL and oxytocin receptor.

RT-PCR results indicated high expression of Oct-4 and a significant expression of DAZL and oxytocin receptor.

The expression of pluripotency marker Oct-4 indicates the presence of AF-MSCs like cells suitable for direct use in regenerative medicine due to the fact of animal origin free serum. DAZL expression indicates the presence of germ cells like cells. Oxytocin receptors are expressed in early mammalian developmental stages, suggesting that oxytocin may be involved in the differentiation of stem cells into the germ cell lines at the very early stages of the mammalian development.

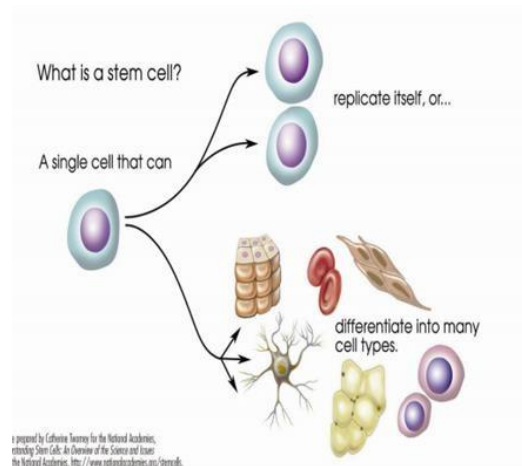


Α. Εισαγωγή

1.Τα βλαστικά κύτταρα

Η αντίστροφη παρακολούθηση της πορείας κάθε κυττάρου του ανθρωπίνου σώματος μας οδηγεί προς τα πίσω σε ένα γονιμοποιημένο ωάριο που προήλθε από την ένωση ενός ωαρίου με ένα σπερματοζώαριο. Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από 200 διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης διάφοροι τύποι βλαστοκυττάρων γεννούν εξειδικευμένα ή διαφοροποιημένα κύτταρα, όπως τα νευρικά κύτταρα, τα κύτταρα του δέρματος, του αίματος, και των μυών, που διεκπεραιώνουν συγκεκριμένες λειτουργίες του οργανισμού. Τα βλαστικά κύτταρα είναι αρχέγονα, πολυδύναμα κύτταρα των ζωικών οργανισμών, που διατηρούν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο.(Thomson et al. 1995)

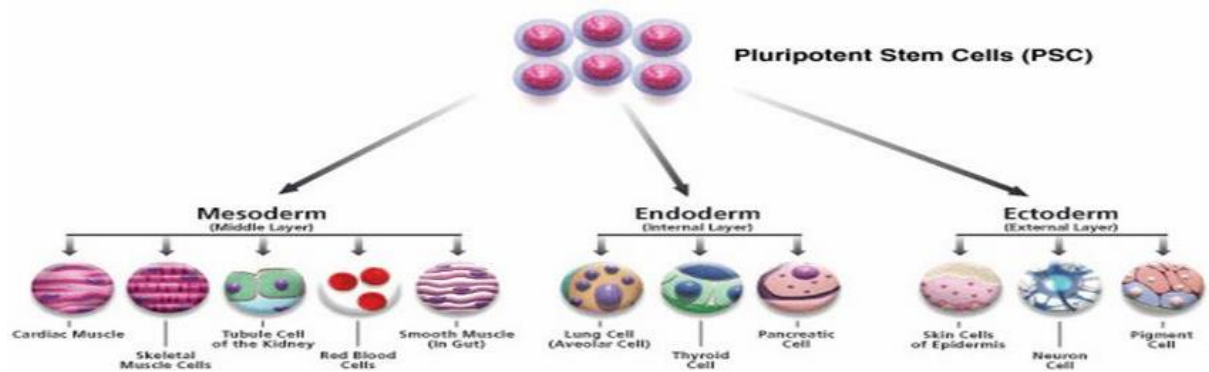
Εικόνα 1.1.: Τα βλαστικά κύτταρα διαθέτουν τις μοναδικές ιδιότητες της αυτοανανέωσης (self-renewal) και της πολυδυναμίας (pluripotency), δηλαδή την ικανότητα να αυτοανανεώνονται απεριόριστα και να διαφοροποιούνται δυναμικά παράγοντας διαφορετικού τύπου «απογόνους» (pluripotent κύτταρα).



Πολυδυναμία

Πολυδυναμία ονομάζετε η δυνατότητα των βλαστικών κυττάρων να διαφοροποιούνται προς οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο θέλουμε ή έχει ανάγκη ο οργανισμός. Τα βλαστικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να διαιρούνται συνεχώς και να διαφοροποιούνται προς διάφορους κυτταρικούς τύπους. Σε κάθε διαίρεσή τους, τα κύτταρα που δημιουργούνται έχουν την δυνατότητα είτε να παραμείνουν βλαστικά, είτε να διαφοροποιηθούν προς άλλο κυτταρικό τύπο, που είναι πιο εξειδικευμένος. Έτσι λοιπόν είναι δυνατόν ένα βλαστοκύτταρο να διαιρεθεί και να μας δώσει ένα θυγατρικό βλαστικό κύτταρο και ένα κύτταρο, το οποίο συνεχίζει τις μιτωτικές διαιρέσεις και παράγει μια κυτταρική σειρά, που θα διαφοροποιηθεί προς τον κυτταρικό τύπο που μας ενδιαφέρει. Το θυγατρικό

βλαστικό κύτταρο είναι αυτό που συνεχίζει να διατηρεί τη δυνατότητα της συνεχούς διαίρεσης και της διαφοροποίησης. (Wang et al. 2006)



Εικόνα 1.2.: Δυναμικό διαφοροποίησης πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων προς ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα και εν συνεχεία προς πλήθος κυτταρικών σειρών.

Αυτοανανέωση

Τα βλαστικά κύτταρα (stem cells) έχουν την ικανότητα της συνεχούς αυτοανανέωσης και της ασύμμετρης διαίρεσης σε ένα θυγατρικό κύτταρο πανομοιότυπο με το μητρικό και σε ένα άλλο πιο δεσμευμένο προγονικό από το οποίο θα προέλθουν τα TA cells (Transit Amplifying Cells-Μεταβατικά πολλαπλασιαστικά κύτταρα) καθώς οι πλέον ώριμοι διαφοροποιημένοι φαινότυποι. Τα TA cells διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης, αποκτούν, ωστόσο, περισσότερο διαφοροποιημένες λειτουργίες. Τελικά χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετατρέπονται σε TD (Terminally Differentiated- Τελικός Διαφοροποιημένα) (S. He, Nakada, and Morrison 2009)

1.1. Κατηγορίες βλαστικών κυττάρων

Κατηγορίες βλαστικών κυττάρων ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης:

Τα ολοδύναμα (Totipotent) βλαστοκύτταρα είναι τα αρχικά κύτταρα που προκύπτουν απ' τις πρώτες διαιρέσεις μετά την γονιμοποίηση του ωαρίου και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα δημιουργίας ολόκληρου οργανισμού συμπεριλαμβανομένων και του εμβρυϊκού ιστού και του πλακούντα. Μόνο το γονιμοποιημένο ωάριο και οι απόγονοι των δύο πρώτων διαιρέσεων είναι totipotent, είναι ικανά δηλαδή να σχηματίσουν το έμβρυο καθώς και εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Μετά από τέσσερις περίπου ημέρες, τα totipotent κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται σχηματίζοντας την βλαστοκύστη και μια ομάδα κυττάρων που ονομάζεται εσωτερική μάζα κυττάρων ICM (Inner Cell Mass- Εσωτερική Κυτταρική Μάζα) από όπου και αναπτύσσεται το έμβρυο. Τα κύτταρα της εσωτερικής στιβάδας, δεν είναι ολοδύναμα πλέον αλλά πολυδύναμα.

Τα πολυδύναμα (Pluripotent) βλαστοκύτταρα προέρχονται από τα totipotent μετά από πάροδο λίγων ημερών. Διαχωρίζονται στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και στα εμβρυϊκά γεννητικά (germ stem) κύτταρα. Είναι αληθή βλαστοκύτταρα γιατί μπορεί να διαφοροποιηθούν σε οποιονδήποτε τύπο κυττάρων, εκτός των totipotent. Με την πρόοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης μετατρέπονται σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο χάνοντας το απεριόριστο δυναμικό διαφοροποίησής τους. Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς και όργανα του σώματος, όπως στον εγκέφαλο, στον μυελό των οστών, στο ήπαρ, το αίμα και τα αιμοφόρα αγγεία, το δέρμα και τους σκελετικούς μύες. Αυτά τα βλαστοκύτταρα συμβάλλουν στην αναγέννηση των ιστών. Η ικανότητα διαφοροποίησης τους είναι περιορισμένη καθώς όταν διαιρείται ένα τέτοιο βλαστοκύτταρο σε δυο, το ένα παραμένει ως βλαστοκύτταρο και το άλλο διαφοροποιείται για να αναγεννήσει μέρος του ιστού που έχει καταστραφεί.

Τα μονοπολικά ή μονοδύναμα, (unipotent) βλαστοκύτταρα είναι αυτά που δεν μπορούν να εξελιχθούν σε κανένα τύπο κυττάρων παρά μόνο στον τύπο στον οποίο έχουν προγραμματιστεί για ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό, αλλά διατηρούν την ιδιότητα της ανανέωσης. (de Kretser 2007)

Κατηγορίες βλαστικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη:

Τα ESCs (Embryonic Stem Cells- Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα) είναι αρχέγονα, αδιαφοροποίητα κύτταρα που δημιουργούνται με την γονιμοποίηση του ωαρίου και προέρχονται απ' την ICM. Από τα κύτταρα αυτά θα σχηματιστεί το έμβρυο. Ενώ από τα κύτταρα που βρίσκονται εκτός της ICM και εντός της βλαστοκύστης και αποτελούν το τροφοεξώδερμα θα σχηματιστεί ο πλακούντας. Τα ESCs αποτελούν τους θεμελίους λίθους του σώματος μας.

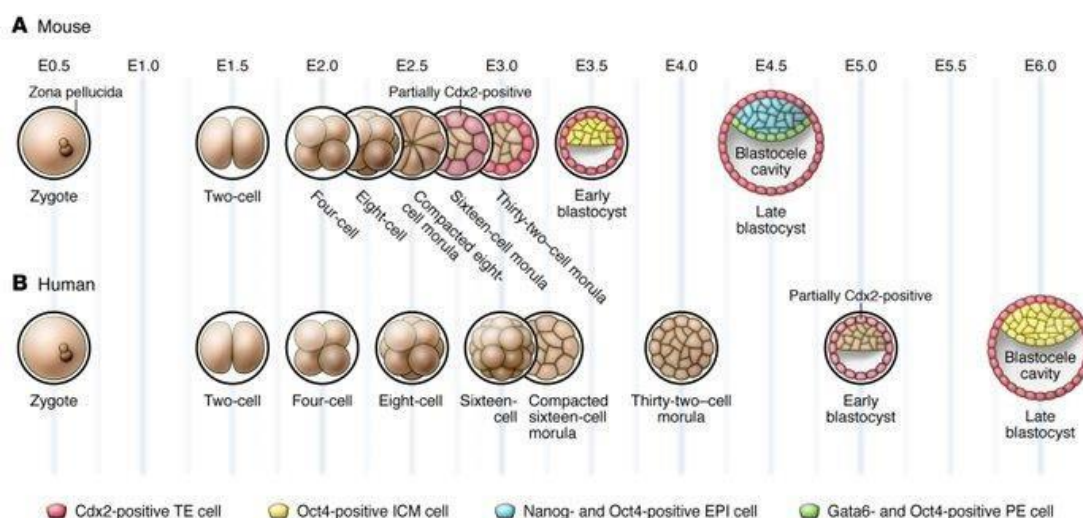
Τα ASCs (Adult Stem Cells- Ενήλικα βλαστικά κύτταρα) είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα, που βρίσκονται σε όλο το σώμα τόσο σε νεαρά όσο και σε ενήλικα ζώα. Πολλαπλασιάζονται με κυτταρική διαίρεση και έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τους ιστούς καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ASCs είναι σημαντικά για την ανάπτυξη, επούλωση και αντικατάσταση των κυττάρων που έχουν καταστραφεί ή υποστεί κακώσεις. Κύρια πηγή των ASCs είναι ο BM (Bone Marrow- Μυελός των οστών). Τα ASCs υποδιαιρούνται σε δύο υποομάδες, τα heSCs (hematopoietic stem cells- αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα) τα οποία δίδουν γένεση στα κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος και τα MSCs από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων, τα κύτταρα του οστίτη ιστού, των μυών, ενώ συγχρόνως παρέχουν στρωματική υποστήριξη για τα heSCs (Buckingham, Meilhac, and Zaffran 2005).

1.2. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs)

Σχηματισμός βλαστοκύστης- Αναπτυξιακά στάδια

Η βλαστοκύστη είναι το μη εμφυτευμένο έμβρυο που έχει αναπτυχθεί 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση ενός ωαρίου από ένα σπερματοζώαριο. Η βλαστοκύστη περιέχει όλα τα υλικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη ενός πλήρους οργανισμού. Εσωτερικά εντοπίζεται η ICM που αποτελείται από 30-34 κύτταρα που χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα, λόγω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται προς όλους τους τύπους κυττάρων του οργανισμού. Με τον όρο έμβρυο αναφερόμαστε σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης από τη γονιμοποίηση και εν

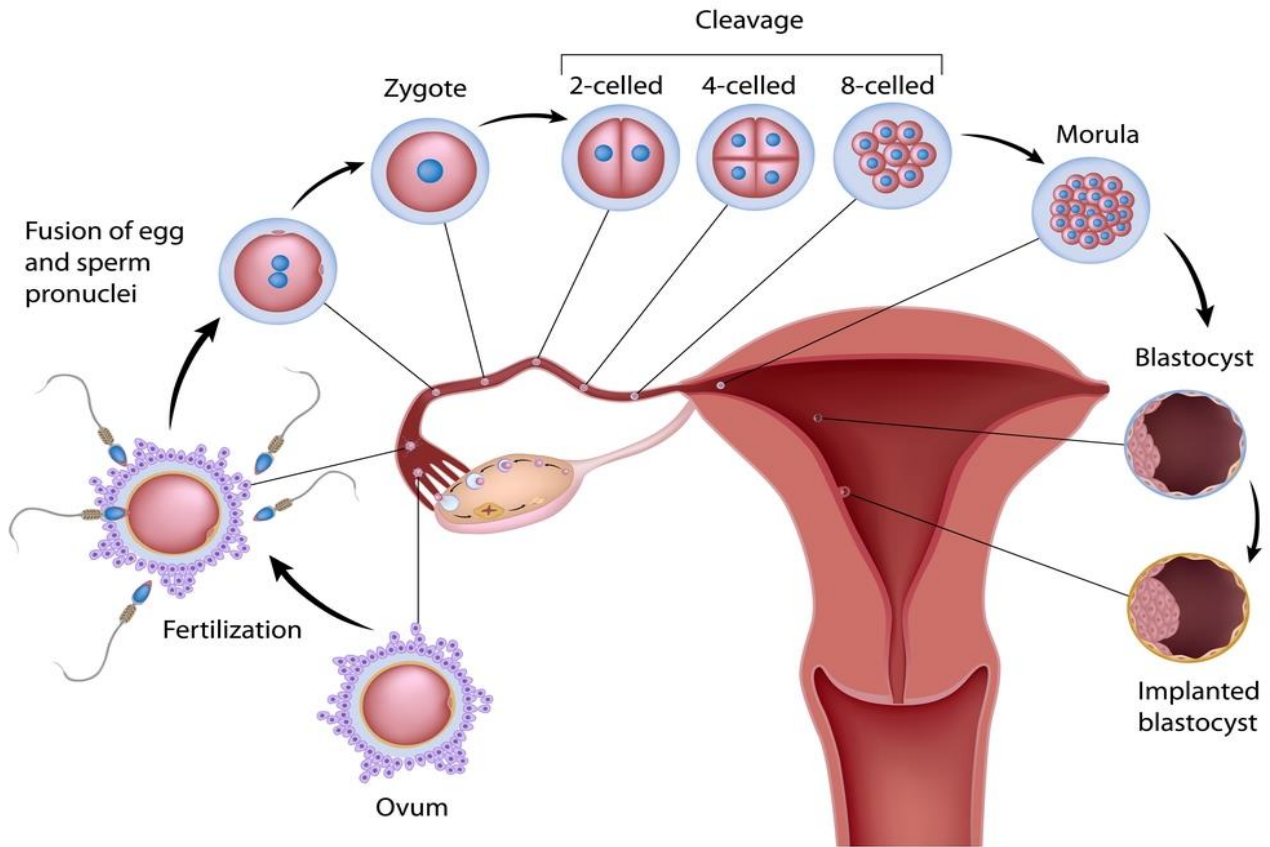
συνεχεία. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν τους όρους μορίδιο και βλαστοκύστη όταν αναφέρονται σε καθορισμένα στάδια της ανάπτυξης, πριν την εμφύτευση. Στη φυσιολογική ανάπτυξη, η βλαστοκύστη εμφυτεύεται στο τοίχωμα της μήτρας ώστε να γίνει έμβryo και να συνεχίσει να αναπτύσσεται σε ώριμο οργανισμό. Τα εξωτερικά κύτταρα της θα αρχίσουν να σχηματίζουν τον πλακούντα, ενώ τα εσωτερικά θα αρχίσουν να διαφοροποιούνται προς όλο και περισσότερο εξειδικευμένα κύτταρα του οργανισμού .



Εικόνα 1.3.: Έκφραση μεταγραφικών παραγόντων και δεικτών κατά την πορεία σχηματισμού ώριμης βλαστοκύστης σε έμβryo ποντικού και ανθρώπινο έμβryo.

A- Ποντικός: Το γονιμοποιημένο ωάριο υποβάλλεται σε τρεις διαιρέσεις και παράγει ένα έμβryo οκτώ κυττάρων (μορίδιο) το οποίο στη συνέχεια υφίσταται συμπίκνωση. Από το στάδιο των οκτώ κυττάρων και μετά διαμορφώνονται δυο διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί, ο ένας καταλαμβάνει το εσωτερικό του εμβρύου και ο άλλος το εξωτερικό. Η βλαστική κοιλότητα αρχίζει να σχηματίζεται στο εσωτερικό του εμβρύου στο στάδιο των 32 κυττάρων και συνεχίζει να αυξάνεται καθώς το έμβryo μεγαλώνει και ωριμάζει μέχρι το στάδιο της ώριμης βλαστοκύστης. Ο CDX2 κατά το στάδιο των 32-κυττάρων αυξορρυθμίζεται εξωτερικά, ενώ η έκφραση του Oct4 περιορίζεται στην εσωτερική κυτταρική μάζα ICM κατά το στάδιο πρόδρομης βλαστοκύστης. Στο στάδιο της ώριμης βλαστοκύστης, και ενώ συνεχίζετε η οικουμενική έκφραση του Oct4, η ICM περιέχει έναν πληθυσμό Nanog-θετικών κυττάρων επιβλάστης και έναν πληθυσμό κυττάρων πρωτογενούς ενδοδέρματος Gata6-θετικών.

B- Άνθρωπος: Η ανάπτυξη είναι παρόμοια στα αρχικά στάδια και στο ανθρώπινο έμβρυο με την διαφορά ότι συμπύκνωση μοριδίου ξεκινά στο στάδιο 16-κυττάρων και το μοντέλο έκφρασης των CDX2 και Oct4 δεν εκφράζονται μέχρι το στάδιο της ώριμης βλαστοκύστης.

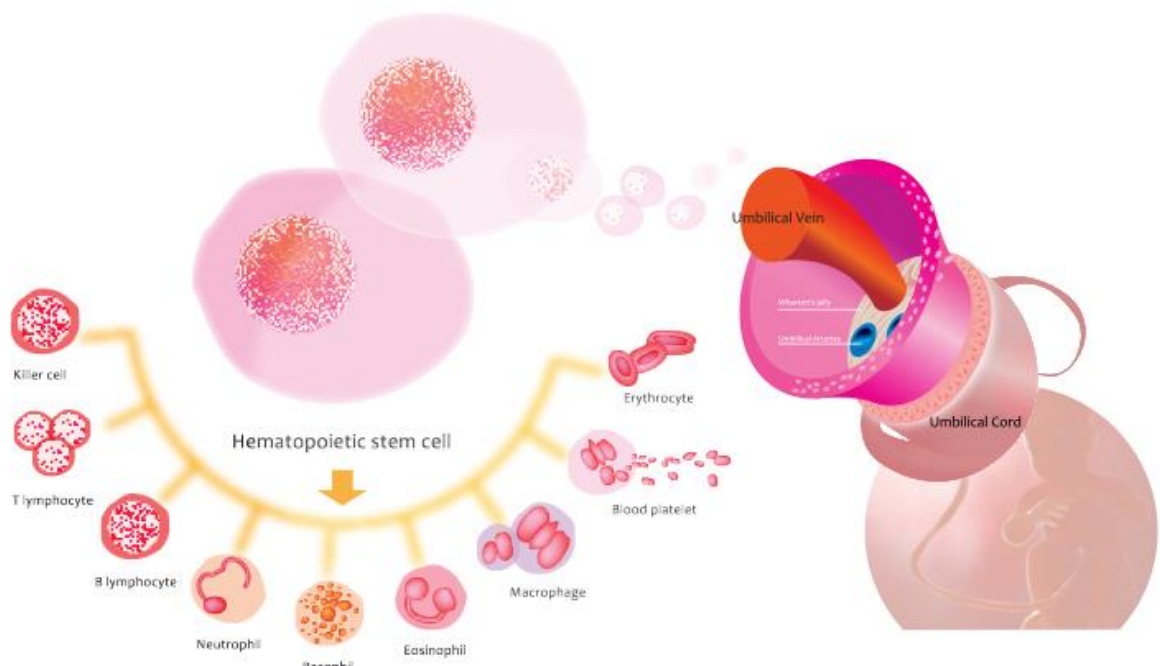


Εικόνα 1.4.: Αναπτυξιακά στάδια σχηματισμού προεμφυτευτικής βλαστοκύστης. Στο στάδιο της βλαστοκύστης έχει σχηματιστεί η εσωτερική κυτταρική μάζα ICM η οποία χρησιμοποιείτε σαν πηγή εμβρυονικών βλαστοκυττάρων

1.3. Πηγές Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων (MSCs)

Ομφαλοπλακουντιακό αίμα:

Μία από τις σημαντικότερες πηγές ESCs αποτελεί το UCB (Umbilical Cord Blood-ομφοπλακουντιακό αίμα). Τα πλεονεκτήματα του έναντι του BM είναι ο τρόπος απομόνωσης του ο οποίος είναι ηθικά αποδεκτός από το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας, καθώς επίσης και το δυναμικό της απομόνωσης ESCs που είναι ανάλογο του αριθμού των γεννήσεων που το καθιστά αυτόματα μία από τις μεγαλύτερες πηγές βλαστικών κυττάρων και μία αποτελεσματική πηγή βλαστικών κυττάρων στην κυτταρική θεραπεία. Τέλος το UCB έχει και το πλεονεκτήμα των μειωμένης ανοσολογικής απόκρισης. (McGuckin et al. 2005a). Συνεπώς αποτελεί μία άριστη πηγή heSCs σε περιπτώσεις αλλογενούς μεταμόσχευσης, αφού προκλινικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία υψηλού ποσοστού $CD34^+CD38^-$ κυττάρων στο UCB (Broxmeyer et al. 1989), αποδεικνύοντας την παρουσία προγονικών κυττάρων που είναι άφθονα στο αίμα του νεογνού.



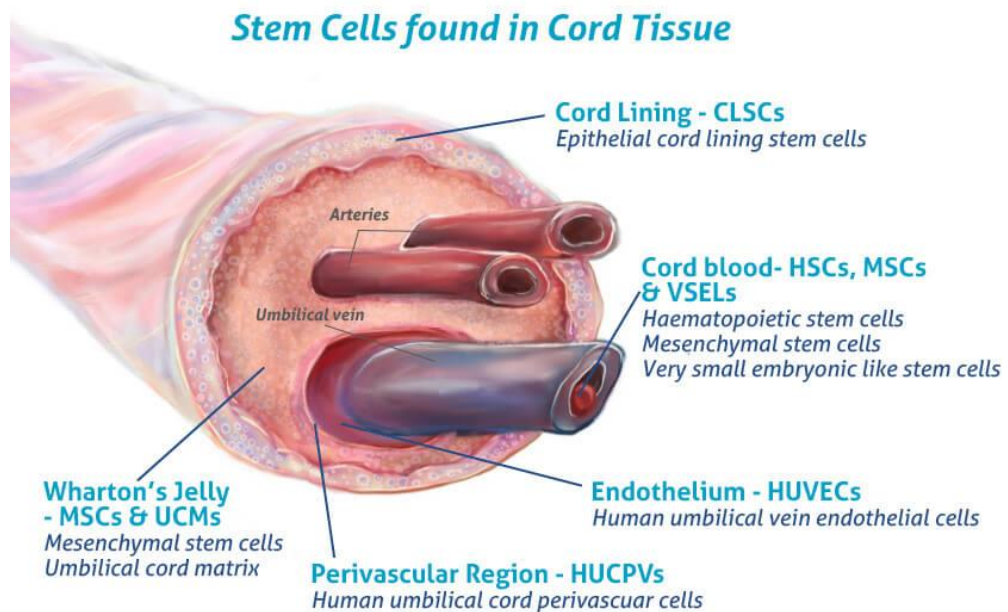
Εικόνα 1.5. Το ομφοπλακουντιακό αίμα ως πηγή ESCs καθώς και το δυναμικό διαφοροποίησής τους.

Ο BM και το UCB έχουν εδραιωθεί ως οι κύριες πηγές MSCs και περιέχουν προγονικά κύτταρα κατάλληλα για θεραπευτικές εφαρμογές. Πρόσφατες συγκριτικές μελέτες των δύο

πηγών έχουν αποδείξει ότι τα UCB-MSCs (Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells – Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ομφοπλακουντιακού αίματος) εμφανίζουν υψηλότερο δυναμικό οστεογένεσης, αλλά μειωμένη ικανότητα λιπογένεσης συγκρινόμενα με τα BM-MSCs (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells – Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα Μυελού των οστών) (Y.-J. Chang et al. 2006). Επιπλέον, επειδή τα UCB-MSCs είναι λιγότερο ώριμα από τα BM-MSCs έχουν λιγότερες πιθανότητες να προκαλέσουν ανοσολογικές αντιδράσεις σε διαδικασίες μεταμόσχευσης (Kang et al. 2006). Στα μειονεκτήματα των UCB-MSCs πρέπει να συμπεριληφθούν οι δύσκολες συνθήκες απομόνωσης και καλλιέργειάς τους, καθώς και το μικρό ποσοστό τους στα δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Αυτό το γεγονός προβάλλει έντονη την ανάγκη για την εύρεση εναλλακτικών πηγών MSCs, που θα έχουν βελτιωμένες ιδιότητες και θα επιτρέψουν την αποτελεσματική τους χρήση στην κυτταρική θεραπεία (Jeong et al. 2005).

Έλυτρο του Wharton

Μία ενδιαφέρουσα πηγή MSCs αποτελεί και το έλυτρο του Wharton, το οποίο συνιστά το συνδετικό ιστό που περιβάλλεται από τις δύο αρτηρίες και τη μία φλέβα του ομφαλίου λώρου (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Έλυτρο του Wharton. Θέση του στον ομφάλιο λώρο και ρόλος του ως πηγή stem cells.

Τα MSCs από το έλυτρο του Wharton εκφράζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά των MSCs και όχι των heSCs και μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα,

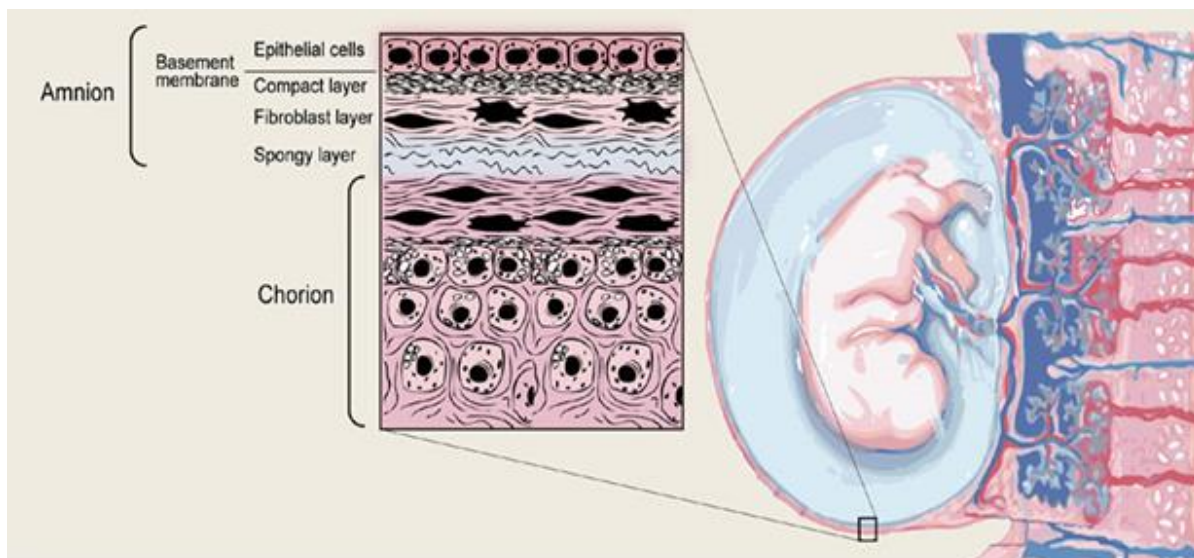
χονδροκύτταρα και καρδιομυοκύτταρα (Mitchell et al. 2003). Επιπλέον, μπορούν να οδηγήσουν στη γένεση νευρικών κυττάρων που έχει αποδηχθεί ότι είναι δυνατό να επιδιορθώσουν αντίστοιχους ιστούς σε πειραματικό μοντέλο αρουραίου με Parkinson (Y.-S. Fu et al. 2006). Επιπροσθέτως, μελέτες ανθρωπίνων κυττάρων από το έλυτρο του Wharton επιβεβαίωσαν ότι αυτά τα κύτταρα εκφράζουν εμβρυϊκούς δείκτες, όπως το OCT-4, SOX-2, Rex-1 και NANOG (Weiss et al. 2006) και δεν οδηγούν στη δημιουργία νεοπλασμάτων, μετά τη μεταμόσχευσή τους σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με μυϊκή βλάβη (Conconi et al. 2006). Εντούτοις, πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες σχετικά με την *in vivo* εφαρμογή των συγκεκριμένων κυττάρων, ώστε να διασφαλιστεί η θεραπευτική τους σημασία (Pappa and Anagnostou 2009).

Πλακούντας:

Ο πλακούντας αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη πηγή MSCs. Πιο συγκεκριμένα προέρχεται από το τροφοεκτόδερμα και σχηματίζει την τροφοβλάστη, που περιλαμβάνει την κυτιοτροφοβλάστη και τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Οι αμιγείς πληθυσμοί βλαστοκυττάρων, που προέρχονται από τον ανθρώπινο πλακούντα περιλαμβάνουν τα χοριονικά μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα και τους χοριονικούς τροφοβλάστες, που χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα (Parolini et al. 2008). Έχειδειχθεί ότι τα MSCs που προέρχονται από τον πλακούντα είναι πιο αποτελεσματικά στην ανάπτυξη εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων συγκριτικά με τα BM-MSCs (S. J. Kim et al. 2007). Τα χαρακτηριστικά των προερχομένων από τον πλακούντα βλαστοκυττάρων περιλαμβάνουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες (C. Li et al. 2007; D. Li et al. 2007) σε συνδυασμό με έκφραση δεικτών πολυδυναμίας SSEA-4, Nano 3, OCT-4 και Rex-1 (Battula et al. 2007; Fukuchi et al. 2004). Επιπροσθέτως, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν υψηλό δυναμικό διαφοροποίησης (Parolini et al. 2008) και δύνανται να οδηγήσουν στη δημιουργία νευρογλοιακών κυττάρων (B. L. Yen et al. 2008; C.-M. Chang et al. 2007), παγκρεατικών κυττάρων (C.-M. Chang et al. 2007), ηπατοκυττάρων (Chien et al. 2006) καθώς και καρδιακών βαλβίδων (Schmidt et al. 2006), όταν αναπτυχθούν σε κατάλληλα ικριώματα. Τέλος, συγκρινόμενα με τα BM-MSCs, τα βλαστοκύτταρα προερχόμενα από τον πλακούντα εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα εποίκισμού σε *in vivo* πειράματα, πιθανώς λόγω του μορίου VL-4 (Brooke et al. 2008).

Αμνιακή μεμβράνη:

Η αμνιακή μεμβράνη ή άμνιον έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί ως μία νέα, εναλλακτική πηγή βλαστικών κυττάρων. Ειδικότερα η αμνιακή μεμβράνη δεν έχει αγγεία, προέρχεται από την επιβλάστη και συνίσταται από 3 στιβάδες (**Εικόνα 1.7**).



Εικόνα 1.7: Ανατομία της εμβρυϊκής μεμβράνης

Οι τρεις στιβάδες είναι η εσωτερική επιθηλιακή στιβάδα, που συνίσταται από τα AECs (Amniotic Epithelial Cells- Αμνιακά Επιθηλιακά Κύτταρα), η ενδιάμεση βασική μεμβράνη, που δεν περιέχει κύτταρα και ένα εξωτερικό στρώμα, που βρίσκεται δίπλα στο χόριον και συνίσταται από AM-MSCs (Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells –Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα Αμνιακής Μεμβράνης). Τα AM-MSCs προέρχονται από τα κύτταρα της επιβλάστης και για αυτό το λόγο διατηρούν τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων κατά τη γέννηση, που σχετίζονται με μειωμένη έκφραση του αντιγόνου HLA, που υποδηλώνει μειωμένη πιθανότητα απόρριψης του μοσχεύματος.

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα AECs, σε μικρό ποσοστό (10%), και όχι τα AM-MSCs, εκφράζουν τους βλαστικούς δείκτες SSEA-4, Tra 1-80, POU και NANOG (Plancheran et al. 2007). Επιπλέον, σε in vivo μελέτες έχειδειχθεί ότι τα AM-MSCs, σε αντίθεση με τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα δεν προκαλούν τερατώματα, μετά από παρακολούθηση 10 εβδομάδων (Plancheran et al. 2007). Η πλαστικότητα των AM-MSCs έχει προσφάτως μελετηθεί σε καλλιέργειες, όπου διαπιστώθηκε η ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης (Marcus et al. 2008). Επιπλέον, το εξωτερικό στρώμα της αμνιακής

μεμβράνης αποτελεί μία πλούσια πηγή MSCs, που δύνανται να διαφοροποιηθούν προς ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro ή προς καρδιομυοκύτταρα και ηπατοκύτταρα in vitro και in vivo (Tamagawa et al. 2007). Μία επιπλέον σημαντική ιδιότητα των AM-MSCs είναι η ικανότητά τους να εμφανίζουν μία ανοσορυθμιστική επίδραση στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (Wolbank et al. 2007). Η λειτουργία αυτή συμβαίνει μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απελευθέρωση νιτρικού οξειδίου από τα MSCs ως απάντηση στις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, λόγω της ενεργοποίησης των T κυττάρων (Keating 2008).

Συνεπώς, οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των MSCs, προερχομένων από την αμνιακή μεμβράνη, καθιστούν την πηγή αυτή ως υποψήφια για μελλοντικές αλλογενείς μεταμοσχεύσεις στο πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής.

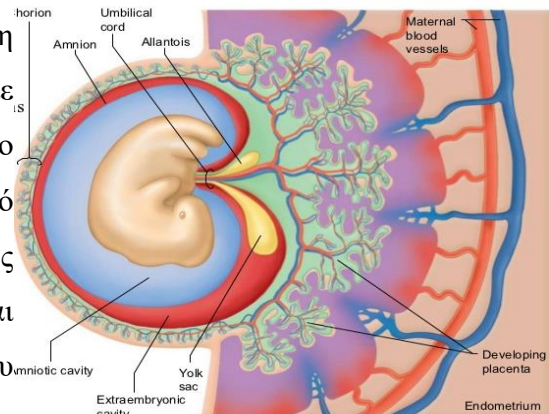
Αμνιακό υγρό:

Το αμνιακό υγρό είναι ένα υδατώδες υγρό που περιβάλλει το αναπτυσσόμενο έμβρυο μέσα στην εμβρυϊκή κοιλότητα. Επιτρέπει στο έμβρυο να αναπτύσσεται ελεύθερα και να μετακινείται εντός της μήτρας, το προφυλάσσει από κακώσεις και δρα ως μέσο μεταφοράς υγρών μεταξύ εμβρύου και μητέρας (Underwood, Gilbert, and Sherman 2005).

2. Αμνιακό υγρό

Στον άνθρωπο το αμνιακό υγρό αρχίζει να εμφανίζεται τη δεύτερη εβδομάδα της κύησης ως μία λεπτή στιβάδα υγρού ανάμεσα στα κύτταρα και την επιβλάστη. Ανάμεσα στην 8^η και 10^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, το υγρό αρχίζει σταδιακά να εξαπλώνεται και να διαχωρίζει την επιβλάστη (μελλοντικό έμβρυο) από την αμνιοβλάστη (μελλοντικό άμνιο) σχηματίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την αμνιακή κοιλότητα (Miki and Strom 2006). Τελικά αυξάνεται σημαντικά σε μέγεθος και μετά την 4^η εβδομάδα κύησης περιβάλλει ολοκληρωτικά το έμβρυο. Κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού της κύησης το αμνιακό υγρό προέρχεται από την ενεργό μεταφορά νατρίου και χλωρίου

διαμέσου της αμνιακής μεμβράνης και του μη κερατινοποιημένου δέρματος του εμβρύου, με ταυτόχρονη παθητική μεταφορά νερού. Κατά το δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης το αμνιακό υγρό συνίσταται από εμβρυϊκά ούρα, απεκκρίσεις της αναπνευστικής και γαστρεντερικής οδού, καθώς και ουσίες ανταλλαγής, μέσω του αμνιακού σάκου (Delo et al. 2006) (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1.: Σχηματισμός αμνιακής κοιλότητας και αμνιακού υγρού

Το αμνιακό υγρό αρχικώς συνίσταται από νερό και ηλεκτρολύτες (98-99%) αλλά εμπεριέχει και χημικές ουσίες (π.χ. γλυκόζη, λιπίδια, πρωτεΐνες, ορμόνες και ένζυμα), καθώς και κύτταρα.

Το ανθρώπινο αμνιακό υγρό (amniotic fluid, AF) χρησιμοποιείται στην προγεννητική διάγνωση τα τελευταία 70 χρόνια. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλές, αξιόπιστο και αποτελεσματικό εργαλείο για την πρόβλεψη πολλών γενετικών και αναπτυξιακών ασθενειών (“Midtrimester Amniocentesis for Prenatal Diagnosis. Safety and Accuracy” 1976). Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις ότι το αμνιακό υγρό μπορεί εκτός από ένα διαγνωστικό εργαλείο να αποτελέσει και πηγή για θεραπεία συγγενών ενηλίκων ασθενειών (Prusa and Hengstschlager 2002).

2.1. Κυτταρικοί πληθυσμοί αμνιακού υγρού

Τα κύτταρα του αμνιακού υγρού προέρχονται από εξωεμβρυϊκές δομές, όπως είναι ο πλακούντας και η εμβρυϊκή μεμβράνη, καθώς και από εμβρυϊκούς ιστούς (Gosden 1983). Αν και τα κύτταρα του αμνιακού υγρού εκφράζουν δείκτες και των τριών γαμετικών στιβάδων, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η ακριβή τους προέλευση. Αρκετοί υποστηρίζουν ότι τα κύτταρα του αμνιακού υγρού διαχέονται στην αμνιακή κοιλότητα από το αναπτυσσόμενο δέρμα, το αναπνευστικό σύστημα, καθώς και τη γαστρεντερολογική και ουρολογική περιοχή (Delo et al. 2006). Το αμνιακό υγρό συνίσταται από ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς με μεγάλο μορφολογικό εύρος, που ποικίλλει ανάλογα με το χρονικό διάστημα της κύησης και την ανάπτυξη του εμβρύου (Hoehn and Salk 1982). Εάν κατά τη διάρκεια της κύησης εμφανιστεί κάποια εμβρυϊκή νόσος ο αριθμός των κυττάρων μπορεί να μειωθεί δραματικά ή να αυξηθεί υπερβολικά.

Τα περισσότερα κύτταρα του αμνιακού υγρού τελικά διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά κύτταρα και τροφοβλάστες (Miki et al. 2005). Τα ανθρώπινα αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από τους αμνιοβλάστες την 8^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση σχηματίζουν την έσω στιβάδα του αμνιακού σάκου. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν και προς τις τρεις γαμετικές στιβάδες και αποτελούν μέρος του κυτταρικού πληθυσμού του αμνιακού υγρού (Hou et al. 2003).

Τα κύτταρα του AF, βάσει μορφολογικών, βιοχημικών και αναπτυξιακών κριτηρίων έχουν περαιτέρω διαχωρισθεί σε :

- 1.Επιθηλιοειδή κύτταρα, E-τύπου που προέρχονται από το δέρμα και το ουροποιητικό σύστημα του εμβρύου (33,7%).
- 2.Κύτταρα αμνιακού υγρού, AF-τύπου που προέρχονται από τις εμβρυϊκές μεμβράνες και την τροφοβλάστη (60,8%).
- 3.Ινοβλαστικά κύτταρα, F-τύπου που προέρχονται από τον ινώδη συνδετικό ιστό και τους δερματικούς ινοβλάστες(5,5%) (Hoehn and Salk 1982).

Τα κύτταρα AF-τύπου και E-τύπου εμφανίζονται στην αρχή της καλλιέργειας. Τα AF-τύπου κύτταρα διατηρούνται κατά τη διαδικασία της καλλιέργειας, ενώ τα κύτταρα E-τύπου

σταδιακά μειώνονται. Τα κύτταρα F-τύπου δεν απομονώνονται από κάθε αμνιοπαρακέντηση και συνήθως εμφανίζονται πιο αργά στην καλλιέργεια (Prusa and Hengstschlager 2002).

Στην περίπτωση εμβρυϊκών διαταραχών μπορεί να εντοπιστούν και άλλα κύτταρα στο αμνιακό υγρό, όπως είναι τα νευρικά κύτταρα που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια ελλείψεων των νευρικών σωλήνων και τα περιτοναϊκά κύτταρα στην περίπτωση δυσπλασίας του γαστρικού τοιχώματος (Aula et al. 1980).

Η πλειονότητα των κυττάρων του αμνιακού υγρού είναι πλήρως διαφοροποιημένα και έχουν περιορισμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού (Siegel et al. 2007). Στις αρχές της δεκαετίας του 90 δύο ερευνητικές ομάδες ανέφεραν την παρουσία μικρών υποπληθυσμών AF κυττάρων με υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Αρχικά η ομάδα του Torricelli υποστήριξε την παρουσία αιμοποιητικών προγόνων στο αμνιακό υγρό που συλλέγεται πριν τη 12^η εβδομάδα κύησης (Torricelli et al. 1993). Στη συνέχεια η ερευνητική ομάδα του Streubel δημοσίευσε την επιτυχή διαφοροποίηση των AF κυττάρων προς μυοκύτταρα, προτείνοντας και την παρουσία μη αιμοποιητικών προβαθμίδων σε αυτό (Streubel et al. 1996). Οι πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν δύο κατηγορίες AF κυττάρων που διαθέτουν προγονικό φαινότυπο, τα AF SCs Amniotic Fluid Stem Cells- Βλαστικά Κύτταρα Αμνιακού Υγρού) και τα AF-MSCs (Shaw, David, and De Coppi 2011; De Coppi, Bartsch, et al. 2007).

2.2. Βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού (AF-SCs)

Τα AF-SCs είναι πολυδύναμα κύτταρα, που έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους, όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ηπατοκύτταρα και νευρώνες (Tsai et al. 2004; De Coppi, Bartsch, et al. 2007), καθώς και σε καρδιομυοκύτταρα (Bollini et al. 2011). Το γεγονός αυτό μπορεί να υποστηριχθεί και από την έκφραση mRNAs ιστοειδικών γονιδίων. Τα κύτταρα αυτά διατηρούν το δυναμικό πολλαπλασιασμού ακόμα και μετά από 250 στάδια καλλιέργειας χωρίς αλλαγή του μήκους της τελομεράσης. Επιπλέον, δεν οδηγούν στο σχηματισμό τερατωμάτων, μετά από *in vivo* χορήγησή τους, που αποτελεί καίριας σημασίας ζήτημα αναφορικά με τη χρήση των ESCs (De Coppi, Bartsch, et al. 2007). Επιπλέον, έχει δειχθεί

ότι τα AF-SCs μπορούν εύκολα να διαμολυνθούν, χωρίς να συμβεί κάποια αλλαγή στη λειτουργία τους (Grisafi et al. 2008; De Coppi, Callegari, et al. 2007). Τέλος, τα AF-SCs μπορούν διαφοροποιηθούν προς αιμοποιητικά κύτταρα *in vitro* και *in vivo* (Ditadi et al. 2009). Τα AF-SCs μπορούν να απομονωθούν εύκολα με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, λόγω της ικανότητάς τους να εκφράζουν το δείκτη c-Kit (CD117), που αποτελεί ένα χαρακτηριστικό μόριο βλαστικότητας, που έχει σημαντικό ρόλο στη γαμετογένεση και αιμοποίηση (Fleischman 1993). Επιπλέον τα AFS εκφράζουν επιφανειακούς δείκτες μεσεγχυματικής προέλευσης, όπως τα μόρια CD29, CD44, CD73, CD90 και CD105, το εμβρυονικό αντιγόνο SSEA-4 και το μεταγραφικό παράγοντα OCT-4 (De Coppi, Bartsch, et al. 2007).

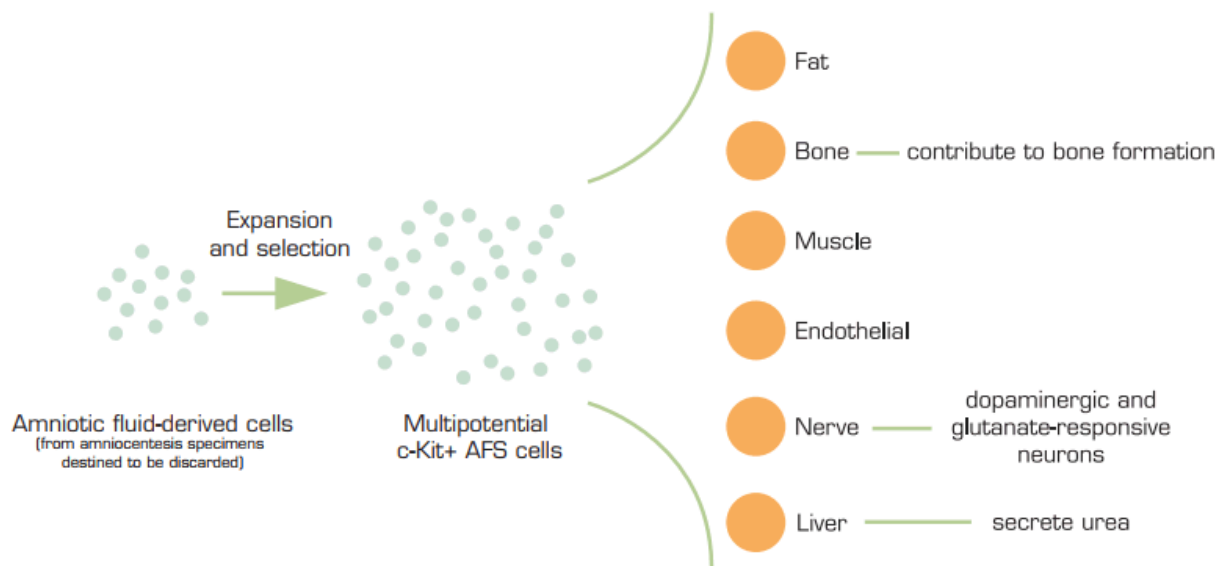
2.3. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού (AF-MSCs)

Πρώτη φορά περιγράφηκε από την ομάδα του Kaviani η παρουσία ενός υποπληθυσμού AF κυττάρων με μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά, που διέθεταν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού συγκριτικά με τα ESCs και ASCs (Kaviani et al. 2001). Ο In't Anker και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν το 2003 ότι το αμνιακό υγρό αποτελεί μία πηγή εμπλουτισμένη σε κύτταρα που εμφανίζουν φαινότυπο και έχουν δυναμικό διαφοροποίησης ανάλογο με τα χαρακτηριστικά των BM-MSCs (In 't Anker et al. 2003). Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως AF-MSCs.

Τα AF-MSCs μπορούν εύκολα να συλλεχθούν από το ανθρώπινο αμνιακό υγρό κατά τη διάρκεια προγραμματισμένης αμνιοπαρακέντησης κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης (Tsai et al. 2004), όπου το ποσοστό των AF-MSCs προσεγγίζει το 0,9-1,5% όλων των κυτταρικών πληθυσμών του αμνιακού υγρού (Roubelakis et al. 2007). Αρκετά πρωτόκολλα έχουν προταθεί για την απομόνωση των AF-MSCs, τα οποία βασίζονται στην αρχική καλλιέργεια όλων των κυττάρων του αμνιακού υγρού σε μέσο εμπλουτισμένο με ορό και στη συνέχεια την περαιτέρω έκπτυξη των προσκολλημένων κυττάρων. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ότι η επιτυχία απομόνωσης των AF-MSCs κυμαίνεται σε ποσοστό 100% (Tsai et al. 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα AF-MSCs μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιεργητικό μέσο που περιέχει εμβρυϊκό ορό βοός (20%) και τον αυξητικό παράγοντα

ινοβλαστών (fibroblast growth factor-FGF). Προσφάτως, έχειδειχθεί ότι τα AF-MSCs μπορούν να αναπτυχθούν και απουσία ορού χωρίς να χάσουν τις βασικές τους ιδιότητες (Kunisaki et al. 2007), εύρημα ιδιαίτερα σημαντικό για κλινικές μελέτες στον άνθρωπο.

Αρκετοί ερευνητές έχουν υποστηρίξει την εμβρυϊκή προέλευση των AF-MSCs έναντι της μητρικής, μετά από μελέτη του ανθρώπινου αντιγόνου HLA και του γονιδίου φυλοκαθορισμού Y, όπου και διαπιστώθηκε ότι τα AF-MSCs προέρχονται από αρσενικά έμβρυα, επιβεβαιώνοντας την εμβρυϊκή προέλευση αυτών των κυττάρων (Roubelakis et al. 2007; In 't Anker et al. 2003). Εντούτοις, αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι μπορεί να προέρχονται και από τμήματα εξωεμβρυϊκών ιστών (Kunisaki et al. 2007). Γενικότερα, τα AF-MSCs αποτελούν μία νέα τάξη πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που διαθέτουν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, μεταξύ εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων της βλαστοκύστης (ESCs) και ενηλίκων βλαστικών κυττάρων (**Εικόνα 2.2.**).



Εικόνα 2.2.: Δυναμικό διαφοροποίησης AF-MSCs

Τα AF-MSCs εμφανίζουν μορφολογία ανάλογη των ινοβλαστών και μπορούν να αναπτυχθούν με ραγδαίους ρυθμούς στην καλλιέργεια (Tsai et al. 2004). Τα ανθρώπινα κύτταρα που λαμβάνονται από 2ml δείγματος αμνιακού υγρού μπορούν να αναπτυχθούν έως 180×10^6 κύτταρα μετά από 4 εβδομάδες (3 στάδια καλλιέργειας) και όπως έχει αναφερθεί σε μελέτες κινητικής αύξησης διαθέτουν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (μέσος χρόνος διπλασιασμού 25-38h) συγκρινόμενα με τα BM-MSCs (μέσος χρόνος διπλασιασμού 30-90h) (Roubelakis et al. 2007; In 't Anker et al. 2003). Επιπλέον, η κλωνογονική ικανότητα των AF-MSCs είναι ιδιαίτερος αυξημένη σε σχέση με των BM-MSCs (86 ± 4.3

έναντι 70 ± 5.1 αποικίες) (Nadri and Soleimani 2007). Παρά την αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα, τα AF-MSCs διατηρούν έναν φυσιολογικό καρυότυπο και δεν οδηγούν στο σχηματισμό τερατωμάτων, ακόμα και μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα στην καλλιέργεια (Sessarego et al. 2008; Roubelakis et al. 2007).

Η ανάλυση των γονιδίων έκφρασης των AF-MSCs απέδειξε ότι:

A) Το γονιδιακό πρότυπο έκφρασης των AF-MSCs, καθώς και άλλων MSC πληθυσμών παραμένει σταθερό μεταξύ των διαφόρων σταδίων καλλιέργειας, κατά την κατάψυξή τους και κατά την επανακαλλιέργειά τους

B) Τα AF-MSCs, καθώς και τα MSCs από άλλες πηγές διαθέτουν παρόμοια γονίδια που σχετίζονται με την ανακατασκευή του μεσοκυττάριου χώρου, την οργάνωση του κυτταροσκελετού, τη ρύθμιση των χημειοκινών και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως τα Wnt και TGF- β .

Γ) Η συγκριτική μελέτη των AF-MSCs με άλλα MSC έδειξε ότι τα πρώτα υπερεκφράζουν γονίδια που σχετίζονται με σηματοδοτικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος (π.χ. HHAT, F2R, F2RL) και με την ωρίμανση της μήτρας (OXTR, PLA2G10), ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι τα AF-MSCs έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ εμβρύου και μήτρας κατά τη διάρκεια της κύησης (Tsai et al. 2007).

Δ) Τέλος, τα AF-MSCs εμφανίζουν ένα ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης προς κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, με αποτέλεσμα υπό κατάλληλες συνθήκες να μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα. Εντούτοις, νεότερες μελέτες έχουν αποδείξει ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς και προς κύτταρα της ενδοδερμικής σειράς, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα και προς κύτταρα της εκτοδερμικής σειράς, όπως είναι τα νευρικά κύτταρα (Tsai et al. 2004; Roubelakis et al. 2007; In 't Anker et al. 2003) γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία στην κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία.

2.4. Εφαρμογές AF-MSCs:

Κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία

Τα AF-MSCs μπορούν να αποτελέσουν έναν ελκυστικό πληθυσμό για πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας σε εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη του De Coppi και των συνεργατών του διαπιστώθηκε ότι μετά από καλλιέργεια των AF-MSCs σε μέσο που προάγει τη νευρογένεση, τα AF-MSCs απέκτησαν λειτουργικά χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων, έπειτα από έγχυσή τους στο εγκεφαλικό παρέγχυμα ποντικών (Cananzi, Atala, and De Coppi 2009).

Σε μελέτη προβάτου, το οποίο είχε διαφραγματική κήλη, πραγματοποιήθηκε αυτόλογη μεταμόσχευση AF-MSCs, η οποία οδήγησε στη επιδιόρθωση του μυός και στην καλύτερη λειτουργία του συγκριτικά με τη χρήση ακυτταρικών μοσχευμάτων (Fuchs et al. 2004; Kunisaki et al. 2007). Επίσης, AF-MSCs που είχαν καλλιεργηθεί σε επαγωγικό μέσο για οστεογένεση, εισήχθησαν σε κατάλληλα ικρίωματα και στη συνέχεια μεταμοσχεύθηκαν υποδορίως σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, όπου και διαπιστώθηκε η *in vivo* δημιουργία οστού μετά από κάποιους μήνες (Kunisaki et al. 2007).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι τα AF-MSCs μπορούσαν να εκφράζουν γονίδια καρδιακών κυττάρων, μετά από καλλιέργειά τους σε κατάλληλο μέσο, και επιπλέον μπορούσαν να ενσωματωθούν επιτυχώς σε φυσιολογικό και ισχαιμικό καρδιακό ιστό, όπου διαφοροποιούνταν στη συνέχεια σε καρδιακά κύτταρα (Zhao et al. 2005). Παράλληλα όταν τα AF-MSCs ενέθηκαν σε μοντέλο αρουραίου με βλάβη της ουροδόχου κύστης αποδείχθηκε ότι μπορούσαν να διαφοροποιηθούν προς λεία μυϊκά κύτταρα και ταυτόχρονα να αντισταθμίσουν την υπερτροφία των υπολοίπων μυοκυττάρων (De Coppi, Callegari, et al. 2007).

Επιπροσθέτως, άλλες έρευνες προτείνουν ότι τα AF-MSCs απελευθερώνουν τροφικούς παράγοντες και ασκούν προστατευτική δράση στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Ο Pan και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι τα AF-MSCs μπορούν να συμβάλλουν στην αναγέννηση του περιφερικού νευρικού συστήματος, μετά από βλάβη, μέσω της έκκρισης

νευροτροφικών παραγόντων (H.-C. Pan et al. 2007). Μετά τη μεταμόσχευσή τους, τα AF-MSCs μπορούσαν να επιβιώσουν και να ενσωματωθούν στον εγκέφαλο ενήλικου αρουραίου, καθώς και να μεταναστεύσουν στις περιοχές στις οποίες υπήρχε ισχαιμική βλάβη (Cipriani et al. 2007). Επιπλέον, όταν πραγματοποιήθηκε ενδοκοιλιακή χορήγηση AF-MSCs σε ποντίκια με κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, τα κύτταρα ήταν ικανά να αναστείλουν σημαντικά τη βλάβη (Rehni et al. 2007). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε η προστατευτική δράση των AF-MSCs σε ένα μοντέλο οξείας νέκρωσης νεφρικών σωληναρίων τόσο μέσω επαναφοράς του φυσιολογικού φαινοτύπου όσο και μέσω επαγωγής του πολλαπλασιασμού των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων (Perin et al. 2008).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα AF-MSCs παρουσιάζουν αντίστοιχη ανοσοκατασταλτική δράση με τα BM-MSCs *in vitro* (Uccelli, Pistoia, and Moretta 2007). Ύστερα από ενεργοποίηση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος με αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD3, CD28 ή με φυτοαιματογλουτίνη, διαπιστώθηκε ότι τα AF-MSCs δύνανται να αναστείλουν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (Sessarego et al. 2008).

Παράλληλα, γίνεται φανερό ότι μία ακόμα δυνατότητα που προσφέρουν τα βλαστικά κύτταρα εμβρυϊκής προέλευσης είναι η εμβιομηχανική εμβρυϊκών ιστών, ειδικότερα σε περιπτώσεις όπου κατά τον προγεννητικό έλεγχο έχει διαγνωσθεί κάποια συγγενής κληρονομική ανωμαλία. Αναλυτικότερα, σε μία τέτοια περίπτωση, AF-MSCs θα μπορούσαν να απομονωθούν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης από ανθρώπινα έμβρυα, να εκπτυχθούν *ex vivo* και να αναπτυχθούν σε ένα κατάλληλο ικρίωμα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην κατασκευή κατάλληλων μοσχευμάτων τα οποία θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν το πάσχον όργανο, είτε *in utero*, είτε αμέσως μετά την γέννηση (Kaviani et al. 2001; Kunisaki et al. 2007).

Επιπλέον, αρκετές προσεγγίσεις έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την εισαγωγή εξωγενούς DNA στα AF-MSCs, ώστε να καταστούν χρήσιμα στις θεραπείες αναγέννησης των ιστών (Baksh, Song, and Tuan 2004). Η ιϊκή διαμόλυνση, ειδικά με τη μεταφορά γονιδίων μέσω λεντιών μπορεί να επιτρέψει τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών κλώνων με υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλή κυτταρική θνησιμότητα, γεγονός που τα καθιστά δημοφιλείς

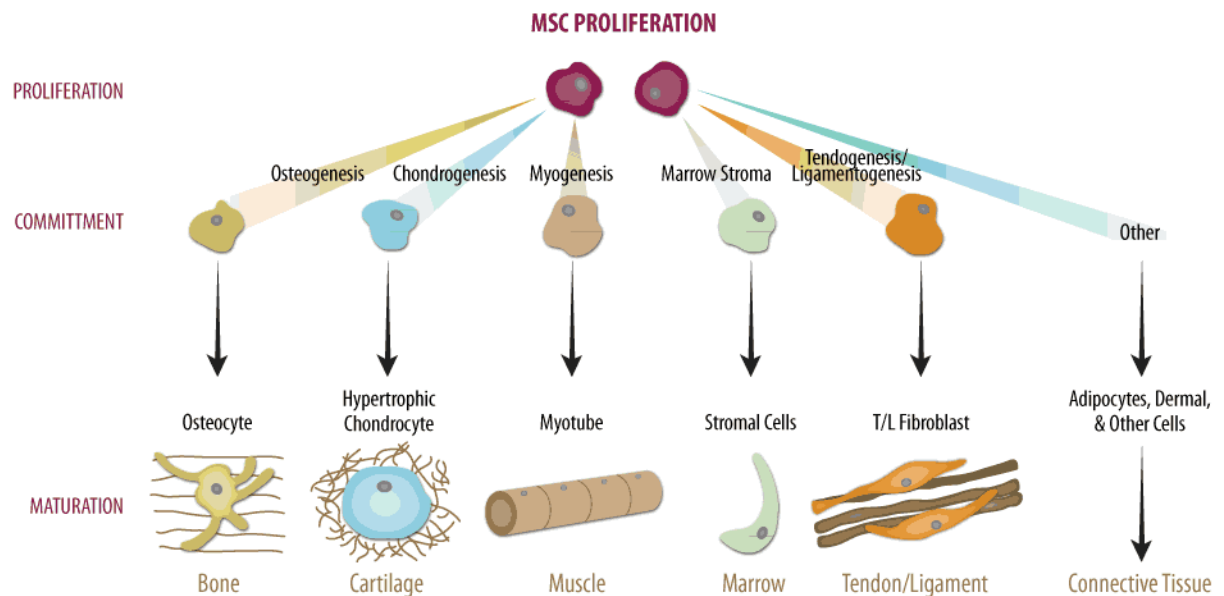
εργαλείο για κυτταρική θεραπεία. Ειδικότερα έχει διερευνηθεί η ικανότητα μετανάστευσης των AF-MSCs προς περιοχές νεοπλασίας σε ένα πειραματικό μοντέλο καρκίνου ουροδόχου κύστεως. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η χρήση των γενετικά τροποποιημένων AF-MSCs για τη μεταφορά αντικαρκινικών ουσιών, όπως η IFN β , στην περιοχή της νεοπλασίας με στόχο την καταστολή του όγκου, όπου και διαπιστώθηκε αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα των AF-MSCs *in vitro* αλλά και *in vivo* προς την περιοχή της νεοπλασίας, καθώς και την υποστροφή του όγκου αλλά και αύξηση της διάρκειας ζωής των ζώων (Bitsika et al. 2012).

2.5. Εύρος διαφοροποίησης MSCs

Η δυνατότητα διαφοροποίησης των MSCs πληθυσμών σε μία ποικιλία κυτταρικών σειρών προερχομένων από διαφορετικά είδη έχει αναλυτικά μελετηθεί *in vitro* ήδη από την πρώτη ανακάλυψη το 1960 (Fridenshtein, Piatetskiï-Shapiro, and Petrakova 1969). Αυτές οι μελέτες απέδειξαν ότι πληθυσμοί MSCs προερχόμενοι από μυελό των οστών ανθρώπου, κουνελιού, αρουραίου και ποντικού έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν διαφοροποιημένους μεσεγχυματικούς φαινοτύπους *in vitro* και *in vivo*, συμπεριλαμβάνοντας τα οστά, το χόνδρο, τον τένοντα, τους μύες, το λιπώδη ιστό και το αιμοποιητικό στηρικτικό στρώμα. Η ικανότητα των MSCs να διαφοροποιούνται σε μία ποικιλία συνδετικών ιστών τα καθιστά ως ιδανική υποψήφια κυτταρική πηγή για στρατηγικές κλινικής μεταμόσχευσης ιστών, καθώς και για επαύξηση και τοπική επιδιόρθωση και αναγέννηση του οστού, του χόνδρου και του τένοντα (Kadiyala et al. 1997; Johnstone and Yoo 1999; Young et al. 1998).

Ανεξάρτητες αποικίες προερχόμενες από μεμονωμένους MSC προγόνους έχουν χαρακτηριστεί ως ετερογενείς όσον αφορά το δυναμικό διαφοροποίησής τους. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι μόνο το 1/3 των αρχικώς προσκολλημένων κλώνων από BM-MSCs είναι πολυδύναμοι (προς όσteo-, λίπο-, χόνδρο-κύτταρα) (Pittenger et al. 1999). Επιπλέον, μη αθανатоποιημένοι κυτταρικοί κλώνοι μελετήθηκαν και αποδείχθηκε ότι το 30% των *in vitro* BM-MSCs προερχομένων κλώνων επιδεικνύουν δυνατότητα διαφοροποίησης προς τις τρεις κυτταρικές σειρές (οστεογενής, λιπογενής, χονδρογενής) (Muraglia, Cancedda, and Quarto 2000). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι οι MSC κλώνοι εμφανίζουν ετερογένεια ως προς το δυναμικό ανάπτυξής τους.

Η ετερογένεια των MSCs έχει αποδειχθεί μετά από *in vitro* και *in vivo* μελέτες, όσον αφορά τη δυνατότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης και μπορεί να επιβεβαιωθεί από το γεγονός ότι οι πηγές των MSCs δεν συνιστώνται μόνο από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, αλλά και από υποπληθυσμούς σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης (Εικόνα 2.3.).

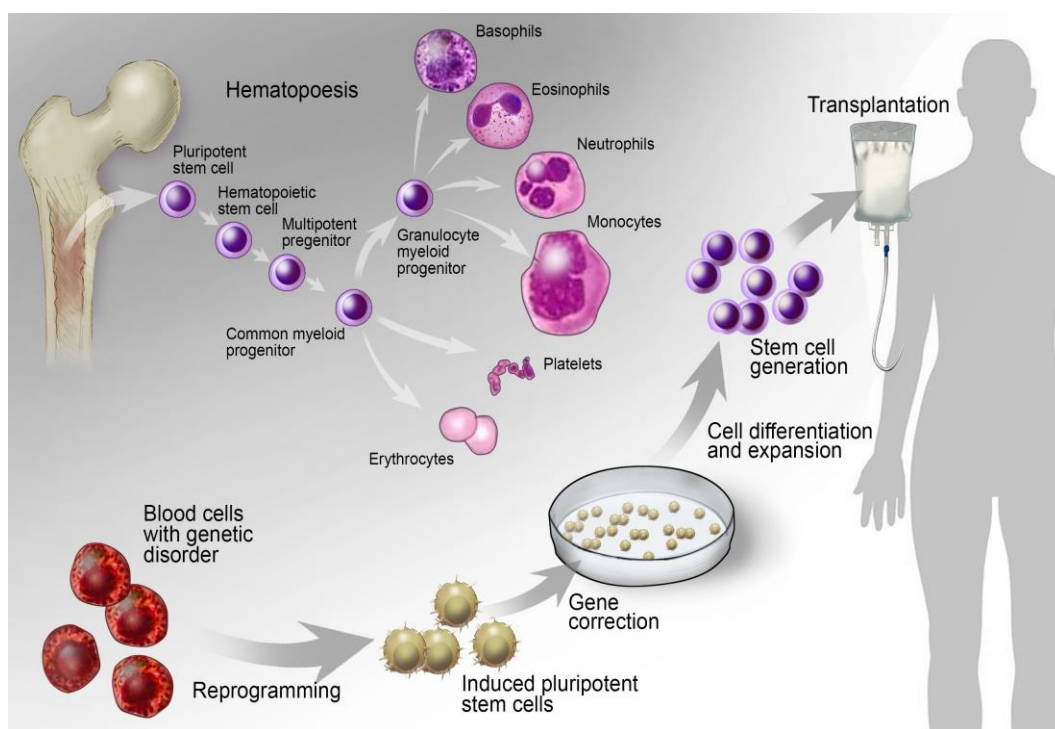


Εικόνα 2.3.: Δυναμικό διαφοροποίησής MSCs. Τα MSCs *in vivo* συνιστούν κυτταρικούς πληθυσμούς που αποτελούνται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα με διαφορετικό δυναμικό διαφοροποίησης.

Οι πρόσφατες μελέτες συνηγορούν ότι τα MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς *in vitro* προς κύτταρα του μεσοδέρματος, του εκτοδέρματος και του ενδοδέρματος, όπως είναι το οστεοκύτταρο, τα λιποκύτταρα, τα χονδροκύτταρα, τα μυικά κύτταρα, τα νευρικά, τα παγκρεατικά ή τα ηπατικά αντιστοίχως κύτταρα (Ding, Shyu, and Lin 2011; “Differential Ability of Somatic Stem Cells. - PubMed - NCBI” n.d.).

2.6. Ρόλος MSCs στην Αναγεννητική Ιατρική

Τα χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs), όπως είναι το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους και η ικανότητα διαφοροποίησής τους προς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα ή χονδροκύτταρα, τα καθιστά σημαντικό εργαλείο στην αναγεννητική ιατρική. Ο ρόλος τους είναι κρίσιμος στην κυτταρική βιολογία και γονιδιακή θεραπεία, με αποτέλεσμα την αύξηση των κλινικών μελετών που βασίζονται στη χρήση των MSCs. Συγχρόνως, τα κύτταρα αυτά μπορούν να απομονωθούν από διάφορους ιστούς και να πολλαπλασιαστούν σε κατάλληλη καλλιέργεια, γεγονός που επιτρέπει τη δημιουργία ιστοειδικών ικριωμάτων, που περιέχουν MSCs, και τα οποία θα μπορούν εν συνεχεία να εισαχθούν στον ασθενή (Sakai et al. 2003; Wakitani et al. 1994; Young et al. 1998). Η πλήρης ίαση αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία και απαιτεί ενσωμάτωση του ιστοειδικού ικριώματος στον οργανισμό και διαφοροποίησή του μέσω συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών. Έχει αναφερθεί ότι τα MSCs μπορούν να μεταμοσχευθούν επιτυχώς σε διάφορους ιστούς και όργανα και να παραμείνουν εκεί για μακρό χρονικό διάστημα (Devine and Hoffman 2000). Επιπλέον, τα MSCs που εισέρχονται στην περιφερική κυκλοφορία έχουν τη δυνατότητα να μεταναστεύσουν σε συγκεκριμένες περιοχές ιστικής βλάβης και να συμβάλλουν στην αναγέννηση αρκετών οργάνων, όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω (**Εικόνα 2.4.**).

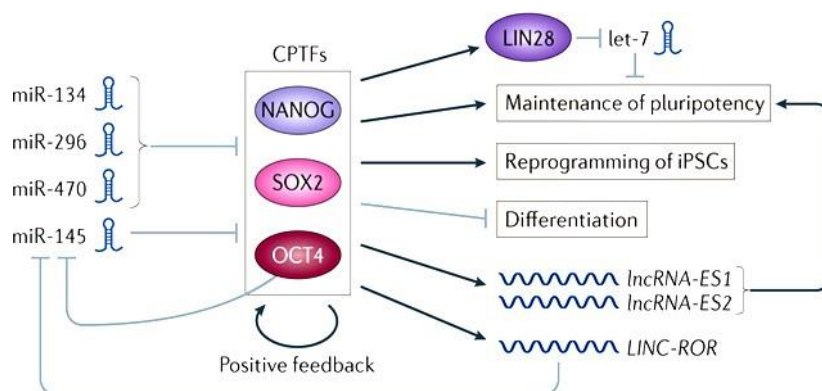


Εικόνα 2.4.: Ρόλος MSCs στην Αναγεννητική Ιατρική.

3. Τα γονίδια Oct4, DAZL και ο υποδοχέας Ωκυτοκίνης

3.1. Παράγοντες που διέπουν την αυτοανανέωση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα συνεχίζουν να αυτοανανεώνονται υπό την επίδραση ενός αυτορρυθμιζόμενου δικτύου μεταγραφικών παραγόντων, που εμποδίζει την διαφοροποίηση και προάγει τον πολλαπλασιασμό, και λόγω επιγενετικών διαδικασιών που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού αυτού δικτύου. Η τριάδα των μεταγραφικών παραγόντων Oct4 (octamer-binding transcription factor 4 - δεσμευόμενος σε οκταμερές μεταγραφικός παράγοντας 4), SOX2 και Nanog διέπουν την πολυδυναμία των βλαστικών κυττάρων in vivo και in vitro (**Εικόνα 3.1.**), ενώ η οικογένεια PcG (Polycomb group protein) αποτελεί ρυθμιστή κλειδί της αυτοανανέωσης.



Εικόνα 3.1.: Η τριάδα των μεταγραφικών παραγόντων OCT4, SOX2 και Nanog που διέπουν την πολυδυναμία των stem κυττάρων in vivo και in vitro

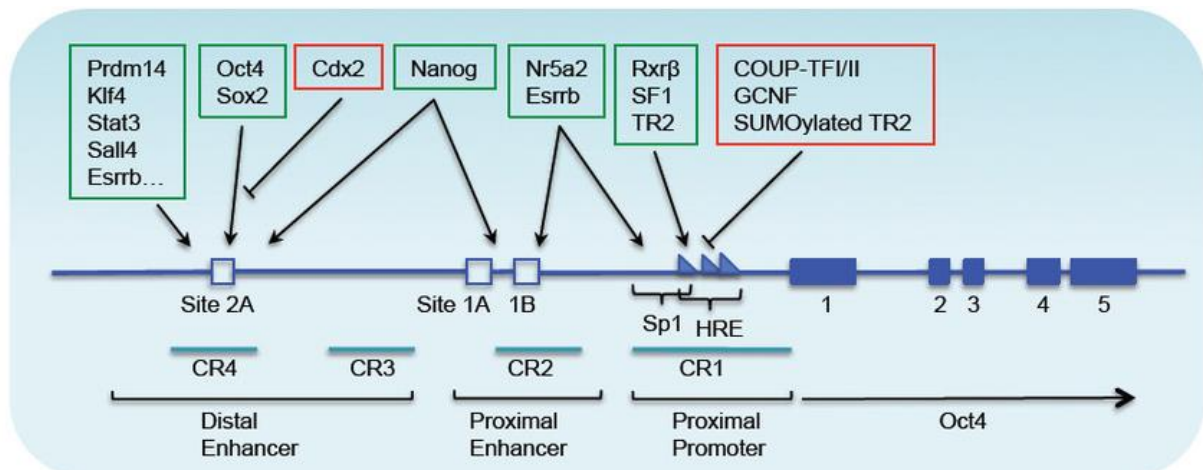
Sox2: Είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της αυτοανανέωσης και της πολυδυναμίας αδιαφοροποίητων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 είναι μέλος της οικογένειας Sox, οι οποίοι έχει αποδειχθεί

ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλά στάδια ανάπτυξης των θηλαστικών. Σε αυτή την οικογένεια πρωτεϊνών εντοπίζονται εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης DNA γνωστές ως HMG box, και περιέχουν περίπου 80 αμινοξέα. Ο Sox2 σχετίζεται με την επαγωγή πολυδυναμίας. Οι παράγοντες Oct4, Sox2 και Nanog ρυθμίζουν θετικά τη μεταγραφή όλων των πρωτεϊνικών κύκλων, σχετιζόμενων με την επαγωγή πολυδυναμίας, στο μονοπάτι LIF (Smith and Hooper 1987; Smith et al. 1988). Αυτοί οι τρεις παράγοντες πολυδυναμίας συμμετέχουν σε ένα περίπλοκο μοριακό δίκτυο που λειτουργεί ρυθμιστικά για τον έλεγχο της πολυδυναμίας. Ο παράγοντας Sox2 δεσμεύεται συνεργατικά με τον Oct4 στο DNA, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής βασικών παραγόντων πολυδυναμίας. Παραδόξως, η ρύθμιση των Oct4-Sox2 ενισχυτών μπορεί να συμβεί χωρίς τον παράγοντα Sox2, αυτό πιθανώς αιτιολογείται λόγω έκφρασης άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας Sox. Ωστόσο, μια ομάδα ερευνητών κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο πρωταρχικός ρόλος του Sox2 σε εμβρυϊκά αρχέγονα κύτταρα είναι ο έλεγχος της έκφρασης του Oct4. Όταν οι δύο αυτοί παράγοντες εκφράζονται ταυτόχρονα, διαιωνίζουν την έκφραση τους. Τα επίπεδα του Sox2 επηρεάζουν τη μοίρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων κατά τη διαφοροποίησης, ενώ επίσης Ο Sox2 αναστέλλει τη διαφοροποίηση στο μεσόδερμα και προωθεί τη διαφοροποίηση σε νευροεξωδέρμα. (Chew et al. 2005)

Nanog: Μεταγραφικός παράγοντας σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και βασικός παράγοντας για τη διατήρηση πολυδυναμίας. Ο Nanog θεωρείται ότι λειτουργεί σε συνεργασία με άλλους παράγοντες: όπως POU5F1 (Oct-4) και SOX2 με στόχο τον προσδιορισμό της ταυτότητας των ESC's. Η πρωτεΐνη Nanog είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής του υποκινητή Rex1, παίζοντας βασικό ρόλο στη διατήρηση έκφραση του. Πειράματα Knockdown του γονιδίου που κωδικοποιεί τον Nanog σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα έδειξαν μείωση της έκφρασης Rex1, ενώ εξαναγκασμένη έκφραση Nanog διεγείρει την έκφραση Rex1 (W. Shi et al. 2006). Υπερέκφραση του Nanog σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού επάγει την αυτοανανέωση απουσία ανασταλτικού παράγοντα. Σε περίπτωση απουσίας του Nanog, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού διαφοροποιούνται προς ενδόδερμα. Απώλεια λειτουργικότητας Nanog προκαλεί διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού προς άλλους κυτταρικούς τύπους. Υπερέκφραση Nanog σε ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα επάγει τον πολλαπλασιασμό τους προς πολλαπλές πορείες κατά τις οποίες τα κύτταρα παραμένουν πολυδύναμα. Πειράματα Knockdown στα γονίδια Nanog προάγουν τη διαφοροποίηση, καταδεικνύοντας έτσι το ρόλο του Nanog στην αυτοανανέωση των

ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων αυτοανανέωσης (Chambers et al. 2007). Λόγω παρόμοιας κυτταρική διαφοροποίησης των κυττάρων ESC's σε περίπτωση απουσίας τους, οι GATA6 και Nanog συσχετίζονται. Το συμπέρασμα αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι ο Nanog μπορεί να εμποδίζει την ανάπτυξη εξωδέρματος μέσω καταστολής του GATA6. Οι Yamanaka et al., προκάλεσαν διέγερση πολυδυναμίας σε εμβρυϊκά κύτταρα ποντικού και ενήλικους ινοβλάστες εισάγοντας τους παράγοντες, Oct3/4, Sox2, c-Myc, και Klf4, υπό συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας. Από τα τέσσερα αυτά στοιχεία αποδείχτηκε ότι ο Nanog ήταν απαραίτητος για την επαγωγή αυτού του κυτταρικού συστήματος (Yamanaka 2012).

Oct4: Ο Oct4 είναι μέλος της οικογένειας POU (Pit-Oct-Unc) και δρα σαν ένας μεταγραφικός παράγων (transcription factor) (Okamoto et al. 1990; Schöler et al. 1990a). Το POU5F1 (POU domain, class 5, homeobox 1) είναι μία από τις δύο ισομορφές του Oct4 (Kossovskaya et al, 2009). Η συγκεκριμένη περιοχή POU, η οποία μοιράζεται μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας POU είναι μια διμερής (bipartite) DNA περιοχή πρόσδεσης που περιέχει την POU όμοια περιοχή (POU homeodomain) και την POU ειδική περιοχή (POU specific domain). Οι POU μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στην αλληλουχία του DNA που ονομάζεται οκταμερές μοτίβο (octamer motif). Οι μεταγραφικοί παράγοντες POU είναι ευέλικτοι στην αναγνώριση των περιοχών πρόσδεσής τους λόγω της δομής διμερούς της περιοχής πρόσδεσης στο DNA που έχουν. Οι Oct1, Oct2 και Pit-1 μπορούν να προσδένονται στο DNA σε ομοιοδιμερή και ετεροδιμερή συμπλέγματα ανάλογα με τη διεύθυνση των περιοχών πρόσδεσης. Ο Oct4 αναγνωρίστηκε αρχικά στα ποντίκια σαν ένας μεταγραφικός παράγοντας ειδικός της γενετικής σειράς (germline-specific). Αποτελείται από πέντε εξόνια και από υψηλά διατηρημένες νησίδες στην 5' μη μεταφρασμένη περιοχή (5' untranslated region, UTR), οι οποίες αντιπροσωπεύουν κοινά ρυθμιστικά στοιχεία (**Εικόνα 3.2.**) (Pesce and Schöler 2000).



Εικόνα 3.2.: Απεικόνιση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Oct4 στο ποντικό.

Έχει βρεθεί ότι το προϊόν του γονιδίου του αδενοϊού E1A αλληλεπιδρά με το Oct4 και μιμείται την δράση ειδικών βλαστικών παραγόντων γεφύρωσης (stem cell-specific bridging factors) σε διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές (Schöler et al. 1990a). Άλλο παράδειγμα θετικής ρύθμισης γονιδίου από τον Oct4 αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί τον FGF4 (fibroblast growth factor-4, αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών-4). Ο FGF4 εκφράζεται στην ICM και επάγει τον πολλαπλασιασμό και την άυξή της. Άλλο παράδειγμα θετικής ρύθμισης γονιδίου από τον Oct4 αποτελούν το μόριο Opn (Osteopontin adhesion molecule, μόριο προσκόλλησης οστεοποντίνης). Έχει βρεθεί ότι η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων του ενδοδέρματος στο έμβryo συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση της πρωτεΐνης Oct4 και της έκφρασης του Opn. Τέλος, το Oct4 συνεργάζεται με το Sox-2 για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων (Pesce and Schöler 2000).

Το Oct4 εκφράζεται ασθενώς στα πρώιμα στάδια της εμβρυικής κυτταρικής διαίρεσης (embryonic cleavage) μέχρι το στάδιο των οκτώ κυττάρων, όπου ανιχνεύεται υψηλό ποσό πρωτεΐνης Oct4 στον πυρήνα των βλαστομεριδίων. Η έκφρασή του Oct4 φαίνεται να είναι απαραίτητη για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (Reményi et al. 2001; Schöler et al. 1990b; Prusa et al. 2003a). Στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα δεν παρατηρείται η διαδικασία της απόπτωσης όπως συμβαίνει στα σωματικά κύτταρα (Mantel and Broxmeyer 2007).

Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα στα οποία σταματάει η έκφραση του παράγοντα Oct4, υπόκεινται σε σωματική διαφοροποίηση (Pesce and Schöler 2000). Ο Guo και συνεργάτες (2008) ανακοίνωσαν ότι η έκφραση του Oct4 σχετίζεται με τη προστασία από την απόπτωση που προκαλείται από στρες στα εμβρυικά κύτταρα των ποντικών. Έχει μάλιστα αποδειχτεί ότι η προστατευτική αυτή δράση ασκείται διαμέσου του μονοπατιού της σουρβαϊβίνης (Guo

et al. 2008). Μέχρι την συμπίκνωση του μοριδίου (compaction of morula), η έκφραση του Oct4 είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα. Κατά την συμπίκνωση του μοριδίου τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος διαχωρίζονται από τα κύτταρα της ICM όπου θα σχηματίσουν το έμβρυο. Επομένως, η λειτουργία του Oct4 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του αδιαφοροποίητου φαινότυπου των κυττάρων της ICM μόνο όταν τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος αποκτήσουν μία πόλωση μετά τη συμπίκνωση του μοριδίου.

Η κυτταρική σήμανση που εξαρτάται από την προσκόλληση (cell adhesion- dependent signaling) πιθανώς να εμπλέκεται στον διαχωρισμό των έσω και έξω διαμερισμάτων του εμβρύου ως δύο διαφορετικές περιοχές. Κύτταρα που λαμβάνουν αρκετή σήμανση, ως αποτέλεσμα της τοποθέτησής τους στο εξωτερικό διαμέρισμα ρυθμίζουν αρνητικά το Oct-4 και διαφοροποιούνται, ενώ κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό διαμέρισμα εξαιρούνται από την αρνητική ρύθμιση και διατηρούν την παντοδυναμία (totipotency) (Pesce and Schöler 2000). Πάυση της έκφρασης του Oct4 στα ποντίκια έχει βρεθεί ότι προκαλεί πρόωρη θνησιμότητα, λόγω έλλειψης της ICM της βλαστοκύστης σε έμβρυα 3,5 ημερών της κύησης (Nichols et al. 1998a). Επίσης, απουσία Oct4 στα κύτταρα του μοριδίου (morula) οδηγεί σε διαφοροποίηση προς τροφοεξώδερμα και η ύπαρξη των ολοδύναμων (pluripotent) βλαστικών κυττάρων της βλαστοκύστης καταργείται. Η διατήρηση του Oct4 στην ICM είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων και τον διαχωρισμό του εμβρύου κατάλληλα από τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα (Kehler et al. 2004).

Μετά την εμφύτευση, το Oct4 εκφράζεται στα επιβλαστικά κύτταρα και ρυθμίζεται αρνητικά κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης (gastrulation). Κατά το στάδιο της μεσογαστριδίωσης, μια μικρή ομάδα κυττάρων διασχίζει την αρχέγονη ράβδωση (primitive streak) πίσω και τοποθετείται στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα και διαχωρίζεται ως αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (primordial germ cells, PGCs). Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (PGCs) είναι τα μόνα εμβρυϊκά κύτταρα που διατηρούν έκφραση του Oct4 μετά το πέρας της γαστριδίωσης (Pesce and Schöler 2000). Επομένως, το Oct4 εκφράζεται στα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα (germ cells). Τα επιβλαστικά κύτταρα εντοπίζονται στα έμβρυα των θηλαστικών όταν εκείνα βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης και μπορούν να μετατραπούν με φυσικό τρόπο στον οργανισμό σε αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, δηλαδή σε κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς σπερματοζώαρια όσο και σε κύτταρα, από τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν προς ωάρια. Η ικανότητα των επιβλαστικών κυττάρων να μετατρέπονται σε γεννητικά κύτταρα σχετίζεται με την τοποθεσία τους στο έμβρυο και όχι με τη γαστριδίωση. Τοποθέτηση των επιβλαστικών κυττάρων σε εγγύς (proximal) τοποθεσία κάνει τα κύτταρα

αυτά ικανά να διαχωρίζονται ως γεννητικά κύτταρα. Αντίθετα, μεταμόσχευση κυττάρων από την εγγύς τοποθεσία σε απομακρυσμένη (distal) τοποθεσία δεν δίνει έκτοπα γεννητικά κύτταρα (Pesce and Schöler 2000).

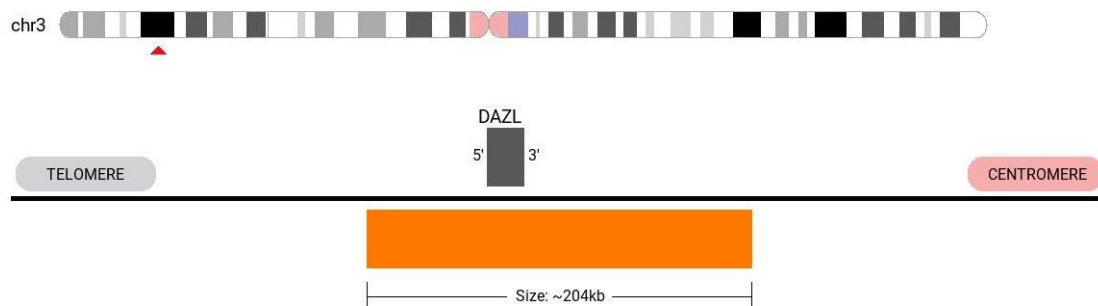
Ο παράγοντας BMP4 φαίνεται ότι ρυθμίζει την ενέργεια του Oct4 στα γεννητικά κύτταρα. Όμως η υπερέκφραση του Oct4 με έκθεση στον BMP4 από μόνη της δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την μετατροπή των επιβλαστικών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα (Pesce and Schöler 2000).

Ο Lawson και συνεργάτες (1999) έδειξαν ότι το BMP4 (bone morphogenic protein 4, μορφογενετική πρωτεΐνη οστών 4) έχει υψηλή έκφραση στο εξωεμβρυϊκό εκτόδερμα και στα κύτταρα της αλλαντοΐδας (allantoic cells) και εμπλέκεται πιθανώς στην μετατροπή των επιβλαστικών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα (Lawson et al. 1999). Σε έμβρυα ομόζυγα για μεταλλάξεις στο BMP4 απουσιάζει ή είναι μειωμένο το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα και ο σχηματισμός των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων είναι καταργημένος (Coucounanis and Martin 1999). Κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης, το Oct4 προοδευτικά ρυθμίζεται αρνητικά με κατεύθυνση από μπροστά προς τα πίσω και τελικά περιορίζεται στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα (extraembryonic mesoderm). Η ύπαρξη του Oct4 στο οπίσθιο τέλος του εμβρύου είναι απαραίτητη για την γενεαλογία των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων. Επομένως, η ενεργοποίηση του Oct4 στα βλαστικά κύτταρα προλαμβάνει την αρνητική ρύθμιση των γεννητικών κυττάρων κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης (Pesce and Schöler 2000).

Οι CD133+ ολοδύναμοι πρόγονοι (pluripotent progenitors) και τα βλαστικά κύτταρα που μοιάζουν με εμβρυϊκά και απομονώνονται από το αίμα του ομφαλίου λώρου βρέθηκε ότι είναι θετικά για τον Oct4 (Baal et al. 2004; McGuckin et al. 2005b). Επίσης, έκφραση του Oct4 έχει βρεθεί στον μυελό των οστών που προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα ενήλικα ανθρώπου (Jiang et al. 2002). Ακόμη, ο Oct4 εκφράζεται στα εμβρυονικά καρκινικά κύτταρα (Tai et al. 2005) και στο αμνιακό υγρό (Prusa et al. 2003b; Stefanidis, Loutradis, Anastasiadou, et al. 2008). Επομένως, ο Oct4 φαίνεται να είναι ένας δείκτης των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (pluripotent stem cells) του ανθρώπου. Στα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή λόγω υπογονιμότητας η έκφραση του Oct-4 δεν έχει ακόμη μελετηθεί.

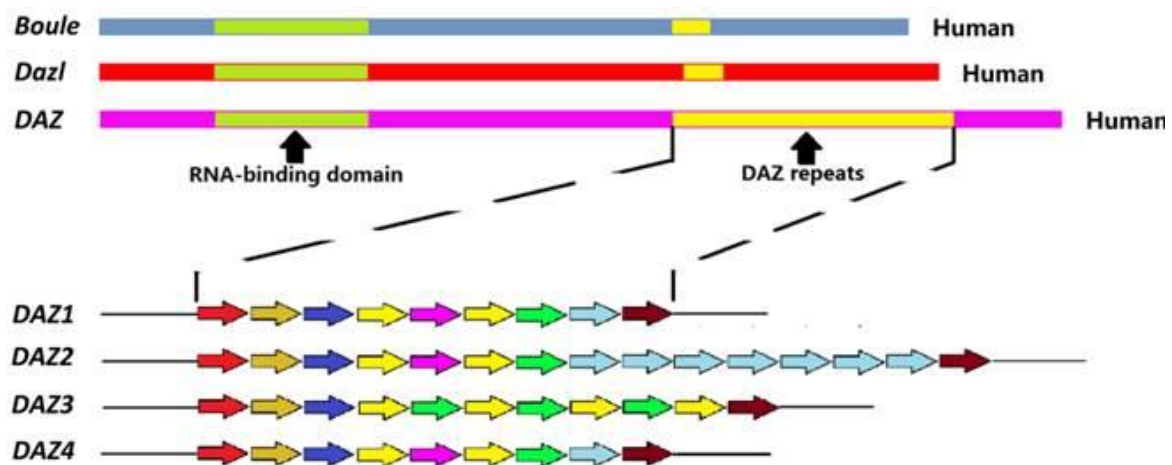
3.2. Τα γονίδια της οικογένειας DAZL

Το γονίδιο DAZL (Deleted in azoospermia-like) ή DAZLA ανήκει στην οικογένεια DAZ (Deleted In Azoospermia), η οποία περιλαμβάνει άλλα δύο μέλη, το γονίδιο DAZ και το γονίδιο BOULE. Τα γονίδια αυτά θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες γονιμότητας σε πολλούς οργανισμούς μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος (X.-F. Fu et al. 2015). Το προγονικό μέλος αυτής της οικογένειας είναι το γονίδιο BOULE, το οποίο οδήγησε στη γένεση των άλλων δύο γονιδίων. Πριν από το διαχωρισμό μεταξύ σπονδυλωτών και ασπόνδυλων οργανισμών, προέκυψε το γονίδιο DAZL μέσω διπλασιασμού του γονιδίου BOULE. Αργότερα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των πρωτεύοντων θηλαστικών, το γονίδιο DAZL οδήγησε στη γένεση του γονιδίου DAZ μέσω πολύπλοκων μηχανισμών (μετάθεση, ενίσχυση) (X.-F. Fu et al. 2015; Cauffman et al. 2005; Saxena et al. 1996; Seboun et al. 1997). Έτσι, το προγονικό μέλος BOULE εκφράζεται από τις θαλάσσιες ανεμώνες μέχρι και τον άνθρωπο, ενώ το DAZL ανευρίσκεται στα σπονδυλωτά. Το DAZ είναι παρών μόνο σε ανώτερα πρωτεύοντα, ενώ κανένα ομόλογο DAZ δεν ανευρίσκεται σε μονοκύτταρους οργανισμούς (X.-F. Fu et al. 2015). Στα διάφορα είδη, το BOULE και το DAZL ανευρίσκονται σε μονά αντίγραφα σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα (το BOULE ανευρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 και το DAZL στο χρωμόσωμα 3) (**Εικόνα 3.3.**), ενώ το γονίδιο DAZ ανευρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα στο χρωμόσωμα Y (X.-F. Fu et al. 2015). Τα γονίδια αυτής της οικογένειας είναι ιδιαίτερα συντηρημένα. Στους άρρενες, τα γονίδια DAZL και DAZ παρουσιάζουν υψηλή ομολογία, περίπου 90% (Saxena et al. 1996), γεγονός που μαρτυρά την κοινή προέλευσή τους.



Εικόνα 3.3.: Η θέση του γονιδίου DAZL στο χρωμόσωμα 3 (3p24).

Τα μέλη της οικογένειας DAZ κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συνδέονται με RNA, οι οποίες ανευρίσκονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των αρσενικών και θηλυκών γεννητικών κυττάρων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. Η παρουσία τους φαίνεται ότι συσχετίζεται με τη ρύθμιση της μετάφρασης των αγγελιοφόρων RNAs (mRNAs) που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας DAZ θεωρείται ότι μετέχουν στη μεταμεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των mRNAs με ποικίλους τρόπους. Αλληλεπιδρώντας με RNA ομοπολυμερή μέσω του μοτίβου αναγνώρισης RNA (RRM) και δημιουργώντας σύμπλοκα μεταξύ τους, ή με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά και τοποθέτηση των mRNAs, ή με τη μετάφραση των mRNAs (P. H. Yen 2004). Το DAZL συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης, της μεταφοράς και της τοποθέτησης των mRNAs εκείνων που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, οι οποίες ελέγχουν τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και την ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων. Ο συνδυασμός των πρωτεϊνών της οικογένειας DAZ με άλλες πρωτεΐνες διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη γαμετογένεση αυτή καθαυτή, καθώς και στη διατήρησή της κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.



Εικόνα 3.4.: Σχηματική απεικόνιση της δομής των ανθρώπινων DAZ γονιδίων. Επάνω: διάγραμμα γονιδίων Boule, Dazl και DAZ που εμφανίζουν τους σημεία δέσμευσης RNA (πράσινο) και τις επαναλήψεις DAZ (κίτρινο). Κάτω: Διαφορετικές επαναλήψεις DAZ 1 έως 4, τα χρώματα δείχνουν διαφορετική ακολουθία επανάληψης.

Τα γονίδια της οικογένειας DAZ εκφράζονται σε συγκεκριμένα είδη και σε διαφορετικά στάδια της γαμετογένεσης των γεννητικών κυττάρων. Το γονίδιο BOULE εκφράζεται κυρίως κατά το στάδιο της πρόφασης της 1ης μειωτικής διαίρεσης και στα δύο φύλα στα περισσότερα είδη, αν και σε κάποια ασπόνδυλα είδη εμπλέκεται στον καθορισμό της γεννητικής σειράς (germline specification) (Eberhart, Maines, and Wasserman 1996; Castrillon et al. 1993). Το γονίδιο DAZL παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα των

γεννητικών κυττάρων να διαφοροποιούνται ως προς το φύλο είτε σε ωογονία είτε σε σπερματογονία (Gill et al. 2011; Haston, Tung, and Reijo Pera 2009; Lin and Page 2005a; J. Seligman and Page 1998). Παράλληλα, συμμετέχει στην εξέλιξη της πρόφασης της 1ης μειωτικής διαίρεσης και την ωρίμανση των ωοκυττάρων (J. He et al. 2015; Chen et al. 2011) και των αρσενικών γεννητικών κυττάρων (Niederberger et al. 1997; Ruggiu et al. 1997; Schrans-Stassen et al. 2001). Το γονίδιο DAZ εμπλέκεται στον έλεγχο προμειωτικών και πρώιμων μειωτικών διαδικασιών κατά τη σπερματογένεση στα πρωτεύοντα είδη.

Στον άνθρωπο κατά το πρώτο τρίμηνο, η πρωτεΐνη DAZL εντοπίζεται στον πυρήνα των γεννητικών κυττάρων (ωογονίων και προσπερματογονίων) στις γονάδες και των δύο φύλων. Στο δεύτερο τρίμηνο, στις ωοθήκες, η πρωτεΐνη DAZL εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων που βρίσκονται στη μείωση, ενώ στους εμβρυικούς όρχεις, η πρωτεΐνη DAZL ανιχνεύεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των γονοκυττάρων. Τα ωοκύτταρα των αρχέγονων ωοθυλακίων παρουσιάζουν χαμηλή ή καθόλου έκφραση του γονιδίου DAZL (Shah et al. 2010; Brekhman et al. 2000).

Έκφραση του γονιδίου DAZL παρατηρήθηκε στα κοκκώδη κύτταρα από τους Brekhman και συνεργάτες (Brekhman et al. 2000). Η έκφραση των πρωτεϊνών DAZL και BOULE στα θηλυκά γεννητικά κύτταρα, κατά τη διάρκεια της εμβρυικής περιόδου, μελετήθηκε από τους He και συνεργάτες (J. He et al. 2015), οι οποίοι επιβεβαίωσαν την έκφραση του DAZL στα ωογονία και στα μειωτικά ωοκύτταρα και επιπλέον παρατήρησαν ότι η πρωτεΐνη BOULE εκφράζεται παροδικά σε ωοκύτταρα πιο προχωρημένων μειωτικών σταδίων. Πιο σπάνια, παρατήρησαν γεννητικά κύτταρα, στα οποία εκφράζονταν τόσο η πρωτεΐνη DAZL όσο και η πρωτεΐνη BOULE. Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη BOULE, η πρωτεΐνη DAZL συνεχίζει να εκφράζεται σε ωοκύτταρα εντός των αρχέγονων ωοθυλακίων. Υπάρχουν και άλλες μελέτες που περιγράφουν την παρουσία μεταγράφων BOULE στις ανθρώπινες εμβρυικές ωοθήκες (Shah et al. 2010; Kee et al. 2009).

Έκφραση του γονιδίου DAZL έχει παρατηρηθεί σε ωοκύτταρα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων της ενήλικης ωοθήκης (Cauffman et al. 2005), ενώ η πρωτεΐνη DAZL έχει ανιχνευθεί στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της έσω θήκης των ωοθυλακίων και των ωχρινοποιημένων κυττάρων του ωχρού σωματίου (H. A. Pan 2002).

Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών DAZL, BOULE και DAZ οδηγεί τα human ESCs, και τα iPS (induced pluripotency stem cells, επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα) να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα

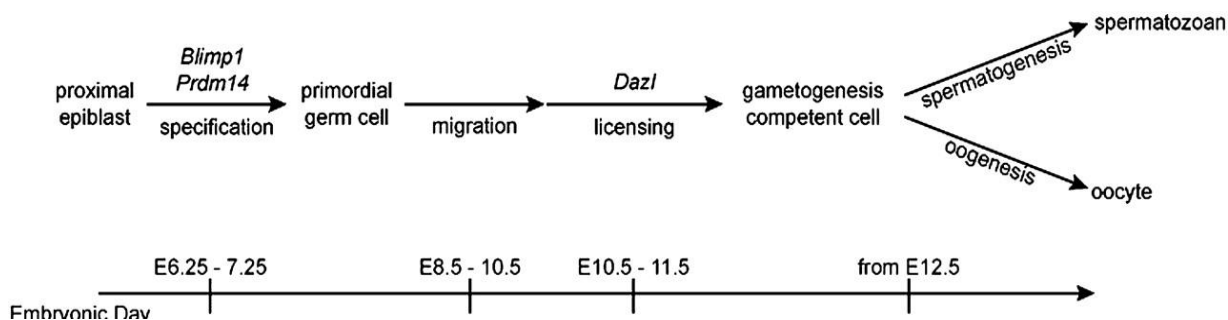
παρόμοια των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (PGC-like cells) και ευνοεί την ωρίμανση και πρόοδο της μείωσης (Medrano et al. 2012; Kee et al. 2009). Συνεπώς, είναι κρίσιμος ο ρόλος αυτών των γονιδίων στον καθορισμό των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στα θηλαστικά.

Το γονίδιο DAZL είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων σε διάφορα είδη. Η έκφραση του γονιδίου DAZL κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της γαμετογένεσης ενδεχομένως να συνεπάγεται το σημαντικό ρόλο αυτού του γονιδίου στη ρύθμιση της ανδρικής και γυναικείας αναπαραγωγής από την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων μέχρι τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα.

Στους ανθρώπους, το γονίδιο DAZL εκφράζεται νωρίς στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα στις εμβρυικές γονάδες (Xu, Moore, and Pera 2001) και στη συνέχεια καθόλη τη γαμετογένεση (Dorfman, Genest, and Reijo Pera 1999; Brekhman et al. 2000; R. A. Reijo et al. 2000; J. Seligman and Page 1998).

Σύμφωνα με μια μελέτη των Gill και συνεργατών, η «αδειοδότηση» για τη διαδικασία της γαμετογένεσης εξαρτάται από την πρωτεΐνη DAZL, η οποία λειτουργεί ως κλειδί που καθορίζει τη φυλετική διαφοροποίηση των εμβρυικών γεννητικών κυττάρων. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν στις αναπτυσσόμενες γονάδες και διαφοροποιούνται σε ωοκύτταρα ή σπερματοζωάρια. Ο φυλετικός προορισμός τους δεν καθορίζεται από τη χρωμοσωμική σύσταση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (XX ή XY), αλλά από τη φυλετική ταυτότητα της εμβρυικής γονάδας στην οποία εισέρχονται. Μελέτησαν *in vivo* το ρόλο του γονιδίου DAZL τόσο σε ωθηκικά όσο και σε ορχικά γεννητικά κύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι τα γεννητικά κύτταρα σε C57BL/6 DAZL^{-/-} έμβρυα ποντικών (είτε XX είτε XY) μεταναστεύουν στις γονάδες αλλά παραμένουν σε μια φυλετικά αδιαφοροποίητη κατάσταση όμοια με εκείνη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, χωρίς να αναπτύσσουν ούτε αρσενικά ούτε θηλυκά χαρακτηριστικά. Έτσι, παρόλο που οι προηγούμενες διαδικασίες του καθορισμού των γεννητικών κυττάρων και της μετανάστευσης δεν επηρεάζονται από την απουσία του γονιδίου DAZL, τα γεννητικά κύτταρα στα C57BL/6 DAZL^{-/-} έμβρυα δεν παρουσιάζουν ανταπόκριση στα φυλοκαθοριστικά ερεθίσματα από την ωθήκη ή τον όρχι. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα τόσο στα XX όσο και στα XY έμβρυα υποβάλλονται σε μια βιολογική διαδικασία «αδειοδότησης», η οποία ενεργοποιεί την αποτελεσματική γαμετογένεση επιτρέποντας την ανταπόκριση των γεννητικών κυττάρων σε θηλεοποιητικά ή αρρενοποιητικά ερεθίσματα που προέρχονται από την εμβρυική ωθήκη ή όρχι και την έναρξη αποτελεσματικής ωογένεσης ή σπερματογένεσης. Η «αδειοδότηση» αυτή λειτουργεί ως κλειδί για το πέρασμα από τις κοινές για τα δύο φύλα εμβρυικές διαδικασίες (καθορισμός των γεννητικών κυττάρων και

μετανάστευση), στις ειδικές για το φύλο διαδικασίες της ωογένεσης και σπερματογένεσης (Gill et al. 2011) (Εικόνα 3.6.).



Εικόνα 3.6.: Μονοπάτι της *in vivo* ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων. Καθορισμός των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων από επιβλαστικά κύτταρα μέσω εξωκυττάρων οδών σηματοδότησης και της δραστηριότητας καθοριστικών για τα γεννητικά κύτταρα παραγόντων όπως του *Blimp1* και *Prdm14* (Ohinata et al. 2009; 2005; Yamaji et al. 2008). Μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στην αναπτυσσόμενη γονάδα. Έκφραση του γονιδίου *DAZL* από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και εξασφάλιση «αδειοδότησης». Σχηματισμός κυττάρων ικανών για γαμετογένεση, τα οποία είναι αρχικά αδιαφοροποίητα ως προς το φύλο, αλλά έχουν τη δυνατότητα έναρξης σπερματογένεσης ή ωογένεσης κάτω από την επίδραση αρρενοποιητικών ή θηλεοποιητικών ερεθισμάτων από τη γονάδα (Gill et al. 2011).

3.3. Ωκυτοκίνη

Η ορμόνη ωκυτοκίνη ανακαλύφθηκε επίσημα και πήρε το όνομά της από τον Βρετανό φαρμακοποιό Sir Henry H. Dale, το 1906. Πηγαίνοντας όμως μερικά βήματα πίσω στην ιστορία, από το 1895, οι Oliver και Schäfer ανακάλυψαν ότι τα εκχυλίσματα της υπόφυσης όταν εγχέονται σε θηλαστικά προκαλούν αύξηση της αρτηριακής τους πίεσης. Λίγα χρόνια αργότερα ο Howell έδειξε ότι αυτή η δραστηριότητα συνδέεται συγκεκριμένα με τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης. Από τότε, παρατηρήθηκαν κι άλλες βιολογικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων του οπίσθιου λοβού της υπόφυσης, όπως η πρόκληση συσπάσεων στη μήτρα (ή ωκυτοκικό φαινόμενο) από τον Dale το 1906, η εξώθηση του γάλακτος από τον μαστό από τους Ott και Scott το 1910, η μείωση της αρτηριακής πίεσης στα πτηνά από τους Paton και Watson το 1912 και η αναστολή της απέκκρισης των ούρων στον άνθρωπο (ή αντιδιουρητική δράση) από τον Von den Velden το 1913.

Η ωκυτοκίνη αναφέρεται ευρέως ως η ορμόνη της αγάπης. Άλλα ονόματα που της έχουν προσδοθεί είναι ορμόνη ή χημικό μόριο της αγκαλιάς, της ηθικής ή της ευτυχίας λόγω της

επίδρασής που έχει στη συμπεριφορά, συμπεριλαμβανομένου του ρόλου της στην ανάπτυξη του αισθήματος της αγάπης/δέσμευσης και στην αναπαραγωγική διαδικασία (MacGill 2015).

Δομή του μορίου:

Η ωκυτοκίνη χαρακτηρίζεται ως ένα εννιαιπεπτίδιο, το οποίο περιλαμβάνει ένα δακτύλιο, που σχηματίζεται λόγω της ύπαρξης διθειλφιδικής γέφυρας μεταξύ των κυστεϊνών στις θέσεις 1 και 6, και μια ουρά 3 αμινοξέων (Russell and Brunton 2009) **(Εικόνα 3.7)**. Η αλληλουχία των αμινοξέων της ωκυτοκίνης (CYIQNCPLG) είναι η ίδια σε όλα τα πλακουντοφόρα θηλαστικά που έχουν εξεταστεί

μέχρι σήμερα, γεγονός που υποδηλώνει μια ισχυρή εκλεκτικότητα για τη διατήρηση της συγκεκριμένης αλληλουχίας. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την εκλεκτικότητα στο ταίριασμα με τον υποδοχέα της.

Εικόνα 3.7.: Το εννιαιπεπτίδιο της ωκυτοκίνης, δομή και η αμινοξική του αλληλουχία.



Οι πεπτιδικές ορμόνες, οι νευροδιαβιβαστές και οι ιικές πρωτεΐνες γενικά, συντίθενται μέσα στα κύτταρα ως ανενεργές προμορφές μεγάλου μοριακού βάρους. Το πρόδρομο μόριο της ωκυτοκίνης είναι γνωστό ως προ-ωκυτοκίνη-νευροφυσίνη. Από το μεταγραφικό προϊόν του γονιδίου της ωκυτοκίνης, με τη βοήθεια ενζύμων απελευθερώνεται η βιοενεργή μορφή της ωκυτοκίνης και η νευροφυσίνη I.

Βιολογικές διακρίσεις ωκυτοκίνης:

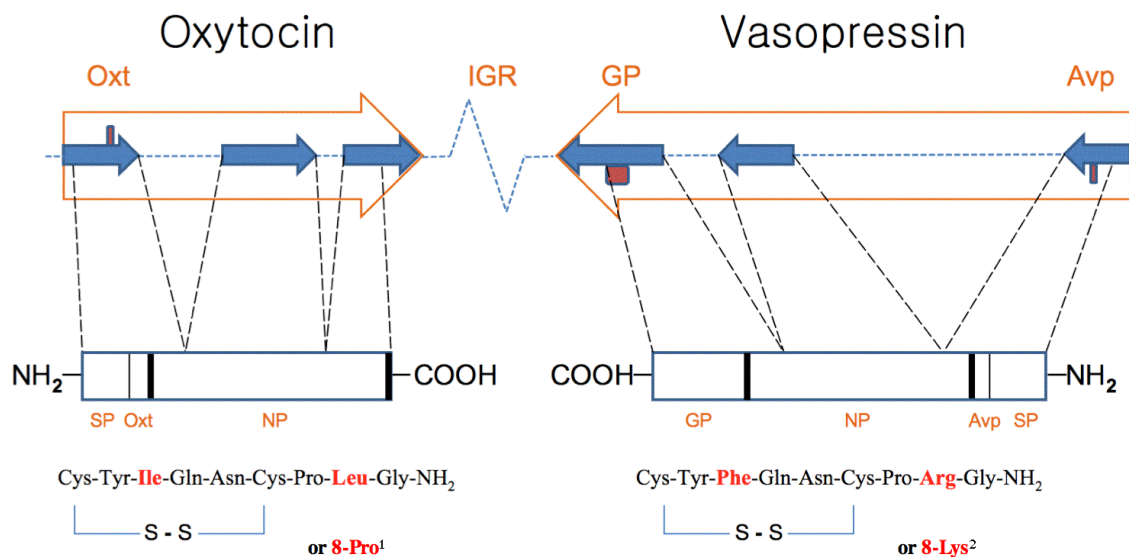
- Ως κεντρικός νευροδιαβιβαστής
- Ως περιφερική ορμόνη
- Ως μέρος άλλων νευροχημικών οδών όπως της κορτιζόλης, των οιστρογόνων των οπιούχων και των μονοαμινών, οργανομένο σε μια λειτουργική μονάδα γνωστή “Σύστημα ωκυτοκίνης” που περιλαμβάνει την ορμόνη και τον υποδοχέα της.

Η παραπάνω διάκριση είναι σημαντική επειδή άλλες από τις επιδράσεις της ωκυτοκίνης προκαλούνται μέσω δυναμικών, δηλαδή κατευθυνόμενων από ορμόνες, δράσεων και άλλες μέσω πιο στατικών, δηλαδή γενετικά προκαθορισμένων μεταβολών της πυκνότητας και της θέσης των υποδοχέων της (“The Human Protein Atlas” n.d.). Η ωκυτοκίνη έχει ευρύ φάσμα

βιολογικών ιδιοτήτων. Εκτός από τις μέχρι τώρα γνωστές της δράσεις (ωκυτόκιο και αντιδιουρητική δράση, δράση επί της εκθλίψεως του γάλακτος) τα τελευταία χρόνια πιστεύεται ότι επηρεάζει την σεξουαλική, τη μητρική και την κοινωνική συμπεριφορά ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και αυτών του μαστού.

Γονίδιο ωκυτοκίνης:

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ωκυτοκίνη είναι μέρος μιας μικρής γονιδιακής συστάδας, η οποία περιλαμβάνει και το γονίδιο της βασοπρεσίνης. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20p13, στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Rao et al. 1992). Η απόσταση μεταξύ των γονιδίων των δύο ορμονών είναι 11kb και η έκφρασή τους πραγματοποιείται σε αντίθετη κατεύθυνση (**Εικόνα 3.8.**).



Εικόνα 3.8.: Γονιδιακή ρύθμιση συστήματος ωκυτοκίνης- βασοπρεσίνης

Αν και η ωκυτοκίνη είναι λειτουργική ως ένα μικρό πεπτίδιο, αρχικά συντίθεται ως μια ανενεργή μεγαλύτερη πεπτιδική αλληλουχία, ένα προπεπτίδιο μήκους 106 19 αμινοξέων, το οποίο ονομάζεται προωκυφυσίνη I ή προ-προωκυτοκίνη. Σε αυτό το πεπτίδιο εμπεριέχονται η ωκυτοκίνη (9 αμινοξέα) και η νευροφυσίνη I (93-95 αμινοξέα), οι οποίες ενώνονται με την αλληλουχία -Gly-Lys-Arg- (GKR). Όσο το γονίδιο της προωκυφυσίνης I, τόσο και το γονίδιο της πρόδρομης μορφής της βασοπρεσίνης, περιλαμβάνουν 3 εξόνια (εικόνα 5). Το πρώτο εξόνιο της προωκυφυσίνης I κωδικοποιεί ένα σήμα εντόπισης, την εννιαπεπτιδική ορμόνη, το τριπεπτιδικό σήμα επεξεργασίας (GKR) και τα εννέα πρώτα αμινοξέα την νευροφυσίνης. Έπειτα, το δεύτερο εξόνιο κωδικοποιεί το κεντρικό μέρος της νευροφυσίνης (αμινοξέα 10-76),

ενώ το καρβοξυτελικό της άκρο κωδικοποιείται από το τρίτο εξόνιο (αμινοξέα 77-93/95) (Gimpl and Fahrenholz 2001; Plant and Zeleznik 2014).

Νευρωνικές πηγές ωκυτοκίνης:

Στον εγκέφαλο, η ωκυτοκίνη συντίθεται κυρίως στον υποθάλαμο, συγκεκριμένα στα μεγαλοκυττάρια νευροεκκριτικά κύτταρα (μεγάλοι νευρώνες με διάμετρο 20-40μm) τού υπεροπτικού (supraoptic, SON) και παρακοιλιακού (paraventricular, PVN) πυρήνα (Lee et al. 2009).

Η σύνθεσή της λαμβάνει χώρα στο σώμα των μεγαλοκυττάρων νευρώνων και αφού υποστεί τις προαναφερθείσες ενζυμικές τροποποιήσεις, το ώριμο πια πεπτιδικό προϊόν, δεσμευμένο με το μεταφορέα του, τη νευροφυσίνη, μεταφέρεται αργά (8mm/h) μέσω του άξονα και αποθηκεύεται στις νευροαξονικές απολήξεις. Η νευροφυσίνη είναι μια πρωτεΐνη πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς και η κύρια δράσης της είναι να συμβάλλει στη σωστή στόχευση, στο σωστό πακετάρισμα και αποθήκευση της ωκυτοκίνης σε εκκριτικά κοκκία ή κυστίδια και στη σωστή αναδίπλωση της πριν αυτή απελευθερωθεί στην κυκλοφορία (Gimpl and Fahrenholz 2001).

Επιπρόσθετα, ωκυτοκίνη συντίθεται σε μικρότερη ποσότητα και στους παρβοκυττάρους νευρώνες (μικροί νευρώνες διαμέτρου 10-15 μm), τα σώματα των οποίων εντοπίζονται στον PVN και οι άξονές τους δεν καταλήγουν στην υπόφυση αλλά στη μέση εξοχή (median eminence). Από εκεί απελευθερώνεται ωκυτοκίνη στη τοπική κυκλοφορία και ρυθμίζει την έκκριση ορμονών της αδenoϋπόφυσης. Νευρώνουν ακόμη διάφορα μέρη του εγκεφάλου όπως το εγκεφαλικό στέλεχος ή το νωτιαίο μυελό (καθώς αποτελεί δομική συνέχειά του), το μεταχιακό σύστημα (ιππόκαμπος και αμυγδαλή), τον επικλινή πυρήνα και το μεσοκοιλιακό υποθάλαμο. Σε αυτές τις περιοχές η ορμόνη ασκεί μια ποικιλία δράσεων, όπως στον έλεγχο της όρεξης, στο άγχος, στην αναλγησία, στην σεξουαλική συμπεριφορά και στην αυτορύθμισή της (Ludwig and Leng 2006; Russell and Brunton 2009).

Μη νευρωνικές πηγές ωκυτοκίνης:

Η ωκυτοκίνη έχει διαπιστωθεί ότι συντίθεται και από κύτταρα ιστών πέραν του εγκεφάλου, τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά θηλαστικά. Εάν και υπάρχει πλειάδα ερευνών και στοιχείων τόσο για την παραγωγή όσο και για το μηχανισμό δράσης της περιφερικής ωκυτοκίνης σε επίμυες, βοοειδή, μηρυκαστικά και άλλα ζώα, σε αυτή την ενότητα θα γίνει συγκεκριμένα αναφορά σε όσα αφορούν τους ανθρώπους. Βέβαια, να σημειωθεί ότι παρά όλες τις ανατομικές διαφορές με άλλα μελετούμενα είδη, όλες οι πληροφορίες που

αντλούνται μπορούν εν δυνάμει να συντελέσουν κομμάτια στο παζλ κατανόησης του ρόλου της ωκυτοκίνης στον ανθρώπινο οργανισμό.

Σε κυοφορούσες γυναίκες, το mRNA της ορμόνης έχει εντοπιστεί στο άμνιο, στο χόριο και στο φθαρτό. Ανατομικά ο αμνιακός σάκος συνίσταται από δύο επάλληλες μεμβράνες, την εσωτερική που καλείται άμνιο και την εξωτερική που καλείται χόριο. Το άμνιο είναι σε άμεση επαφή με το αμνιακό υγρό από τη μία πλευρά του και με το χόριο από την άλλη. Το χόριο αποτελεί επέκταση των τροφοβλαστικών κυττάρων γύρω από ολόκληρη την κοιλότητα της μήτρας και βρίσκεται σε άμεση επαφή και με το μητρικό φθαρτό, το οποίο με τη σειρά του αποτελεί συνέχεια του μυομητρίου, όπως φαίνεται στην **(Εικόνα 3.8.)**. Έτσι, το συνολικό σύστημα αυτών των ιστών θα μπορούσε να αποτελεί μονάδα, ιδανικά τοποθετημένη για τη παρακρινή μετάδοση σημάτων, εμβρυϊκής ή μητρικής προέλευσης, στο μυομήτριο και ως εκ τούτου να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο χρονοδιάγραμμα του τοκετού (Chibbar, Miller, and Mitchell 1993).

Έχει μελετηθεί και ταυτοποιηθεί η παρουσία ωκυτοκίνης στο ωχρό σωματίο και σε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση στο λευκό σωματίο και το στρώμα των ωοθηκών. Φαίνεται ότι παράγεται στο ωχρό σωματίο και εκκρίνεται στην φλέβα της ωοθήκης (Dawood and Khan-Dawood 1986). Σε άλλη μελέτη, εντοπίστηκαν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης σε ωοθήκες, σάλπιγγες και θυλακικό υγρό, σε σύγκριση με τα επίπεδά της σε δείγματα πλάσματος από αίμα της περιφερικής κυκλοφορίας. Αυτό το γεγονός μαρτυρά ότι πιθανόν πραγματοποιείται τοπική σύνθεση. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι σε τρεις ασθενείς από τους οποίους εξετάστηκαν αμφότερες οι ωοθήκες, οι ωοθήκες που περιείχαν ωχρό σωματίο παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ωκυτοκίνης (Schaeffer et al. 1984). Έκφραση του γονιδίου της ωκυτοκίνης έχει βρεθεί στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, τα οποία αποτελούν μια από τις ομάδες κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο στο ωοθυλάκιο. Εικάζεται ότι στην περιοχή αυτή η ορμόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην γονιμότητα μέσω πιθανών μεταβολών στο μικροπεριβάλλον γύρω από το ωοκύτταρο (Furuya et al. 1995).

Ο ρόλος της ωκυτοκίνης κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης δεν περιορίζεται μόνο στη ρύθμιση της συσταλτικότητας της μήτρας. Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ότι η ωκυτοκίνη εμπλέκεται στη διαδικασία πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων (Cassoni P, et.al., 2004), όπως επίσης και στη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων των ποντικών σε κύτταρα του μυοκαρδίου (Joanne Paquin, et.al., 2002). Η συσχέτιση του OT-

OTR συστήματος με διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός θα μπορούσε να ερμηνεύσει την θετική ρύθμιση του υποδοχέα και την αύξηση της συγκέντρωσης της ωκυτοκίνης στο ενδομήτριο κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, τα οποία περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης, την ανάπτυξη του πλακούντα και των εμβρυϊκών αγγείων.

Ο Στεφανίδης και οι συνεργάτες πρώτοι μελέτησαν την έκφραση του υποδοχέα της Ωκυτοκίνης στα κύτταρα του αμνιακού υγρού (Stefanidis, Loutradis, Anastasiadou, et al. 2008). Τα ευρήματα τους έδειξαν ότι τα κύτταρα του αμνιακού υγρού εκφράζουν τόσο τον υποδοχέα OXTR όσο και τον δείκτη Oct4. Οι υποδοχείς Ωκυτοκίνης εκφράζονται σε αρχικά στάδια ανάπτυξης θηλαστικών, υποδηλώνοντας ότι η ωκυτοκίνη μπορεί να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων στις γενετικές κυτταρικές σειρές στα πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των θηλαστικών.

4. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετήσει την έκφραση των γονιδίων Oct4, DAZL και του υποδοχέα της Ωκυτοκίνης σε κυτταροκαλλιέργειες Αμνιακού υγρού δευτέρου τριμήνου, με στόχο τον έλεγχο της δυνατότητας χρήσης του σαν πηγή πολυδύναμων και γεννητικών κυττάρων. Επίσης να προταθεί αποτελεσματική μέθοδο καλλιέργειας τους και να αναλυθεί περαιτέρω για την ύπαρξη υποδοχέων Ωκυτοκίνης στα κύτταρα αυτά.



Β. Υλικά και Μέθοδοι

5. Υλικά

Όλα τα πειράματα έγιναν στον ειδικό χώρο του εργαστηρίου της Αναγεννητικής Ιατρικής της Α' Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών Γ.Ν.Α “Αλεξάνδρα”, κάτω από πλήρως αποστειρωμένες συνθήκες. Όλα τα υλικά (δοκιμαστικοί σωλήνες, φλάσκες (flask), τρυβλία, erendorfs, πιπέτες των 1, 3, 5, 10 ml) που χρησιμοποιήθηκαν είναι της Falcon ενώ οι αυτόματες πιπέτες των 20-100-1000 μl είναι της Gilson. Ο κλίβανος που χρησιμοποιήθηκε είναι στους 37ο C και 5 % CO₂ (Forma Scientific, CO₂ Water Jacketed Incubator). Το μικροσκόπιο στο οποίο παρατηρήθηκαν οι φλάσκες είναι ανάστροφο της Olympus. Η φυγόκεντρος είναι Μπακάκος, Bacacos Scientific.

5.1. Βιολογικό υλικό

Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε αμνιακό υγρό που ελήφθη με τη διαδικασία της αμνιοπαρακέντησης από γυναίκες οι οποίες συμμετείχαν σε πρόγραμμα προγεννητικής διάγνωσης (Γ.Ν.Α “Αλεξάνδρα”, Α' Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών).

- Αριθμός δειγμάτων: 35 γυναίκες
- Όγκος δειγμάτων: 10 ml
- Ηλικία γυναικών: 18 - 40 ετών
- Εβδομάδα κύησης: 16 – 20 εβδομάδων

5.2. Καλλιεργητικά υλικά

Αμνιακό υγρό:

Φρέσκο αμνιακό υγρό το οποίο έχει φυγοκεντρηθεί στα 250 g για 10 min, ώστε να μην υπάρχουν κύτταρα, και το υπερκείμενο έχει φιλτραριστεί με φίλτρα 0,22 μm (Corning, New York)

A' Stock:

- 83,5% Knockout D-MEM (Gibco#10829-018)
- 12,5% Knockout Serum Replacement (Gibco#10828-028)
- 2% Glutamax (Gibco#35050-038)
- 1% MEM, Non essential Amino-Acids (Gibco#11140-035)
- 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco#15070-063)

B' Stock:

- 89% D-MEM (Gibco#41965-039)
- 10% FBS, Foetal Bovine Serum (Gibco#10106-151)
- 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco#15070-063)

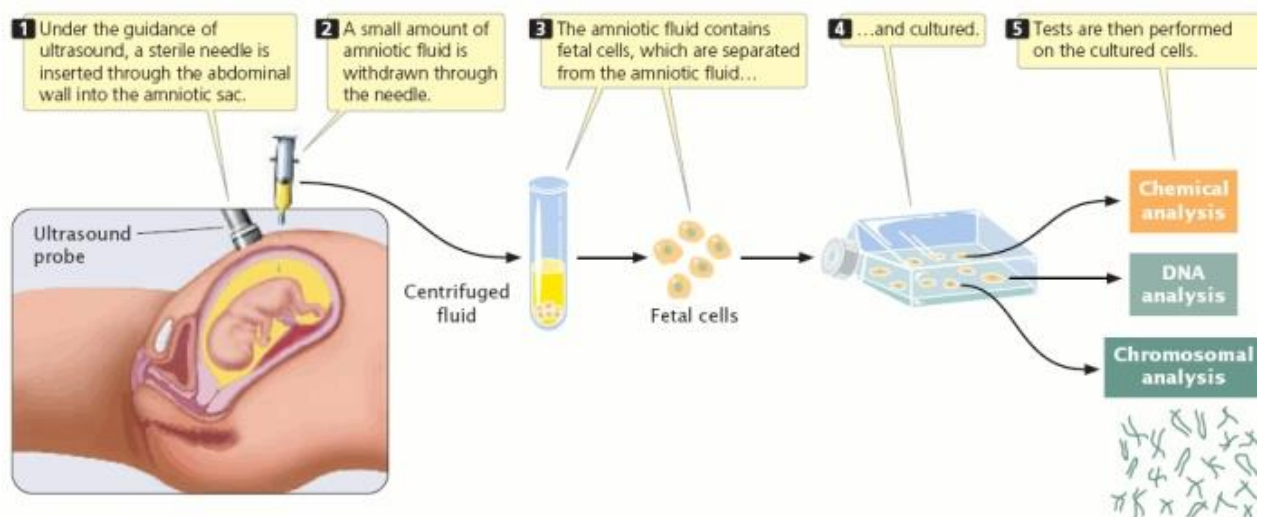
«Stefanidis medium» (SM) (US Provisional Patent No60/853420):

- 80% A' stock
- 20% Αμνιακό υγρό
- 10μl b-FGF ανά 15 ml καλλιεργητικού υλικού
- Human b-FGF, basic-Fibroblast Growth Factor (Invitrogen#13256-029)

Πριν τη χρήση του το καλλιεργητικό υλικό αποστειρώθηκε με διήθηση με φίλτρα 0,22 μm (Corning, New York) και παρέμεινε στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37ο C για περίπου 10 min.

6. Κυτταροαλλιέργειες Αμνιακού

Η αμνιοπαρακέντηση γίνεται συνήθως από την 16^η μέχρι την 20^η εβδομάδα της κύησης από ειδικό κλινικό. Το υγρό που αφαιρείται συλλέγεται σε σωλήνες Universal και αποστέλλεται στο εργαστήριο για να καλλιεργηθεί. Η ποσότητα αμνιακού φυγοκεντρείται άμεσα και το υπερκείμενο φιλτράρεται και φυλάσσεται στους -20°C. Το υπερκείμενο θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή καλλιεργητικών μέσων ενώ το ίζημα που αποτελείται από τα κύτταρα του αμνιακού θα καλλιεργηθεί. Πολλές φορές, τα δείγματα είναι αιματηρά γεγονός που παρεμποδίζει την καλλιέργεια των αμνιακών κυττάρων. Σε εργαστηριακό επίπεδο, τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν μετά τη λήψη του αμνιακού υγρού, είναι η αποτυχία ανάπτυξης των κυττάρων, η μόλυνση των κυττάρων και η πρόσμιξη μητρικών κυττάρων.



Εικόνα 6.1.: Αμνιοπαρακέντηση και καλλιέργεια κυττάρων αμνιακού υγρού

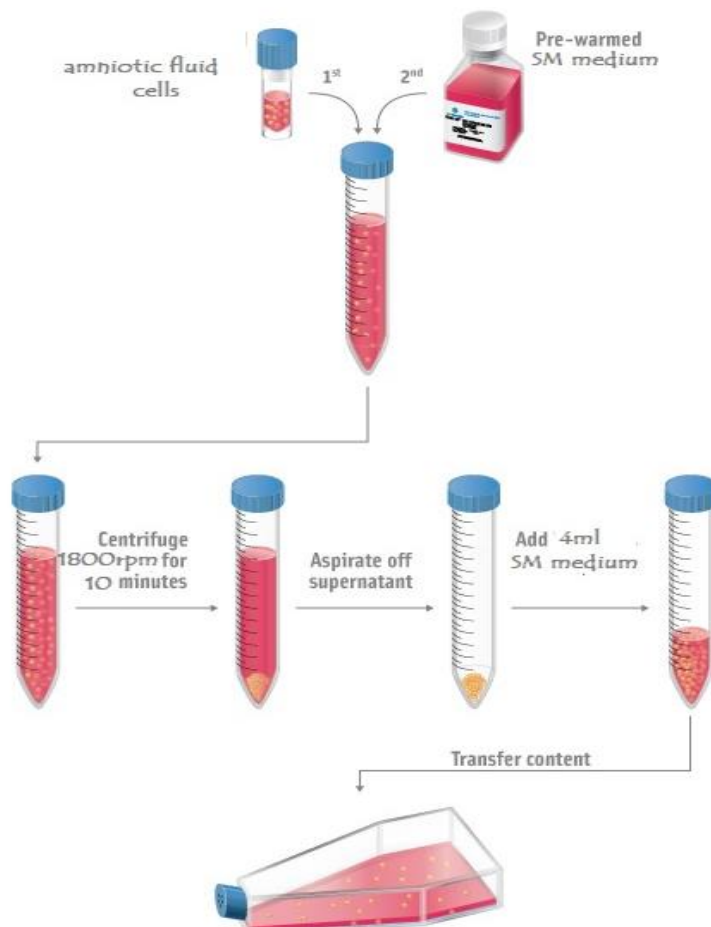
6.1. Καλλιέργεια κυττάρων Αμνιακού υγρού

(set up)

Ο εμβολιασμός των καλλιιεργειών πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες, μια καλλιέργεια για κάθε δείγμα, σε ειδικές φλάσκες:

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων (15 min, 1800 rpm)
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 4 ml καλλιιεργητικό υλικό SM
- Μεταφορά σε ειδική φλάσκα

Οι φλάσκες τοποθετούνται στον κλίβανο (37°C , 5%CO₂). Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων ελέγχεται σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Κάθε δυο μέρες προσθέτουμε 0,250 ml καλλιιεργητικού υγρού σε κάθε φλάσκα για συντήρηση της καλλιέργειας.

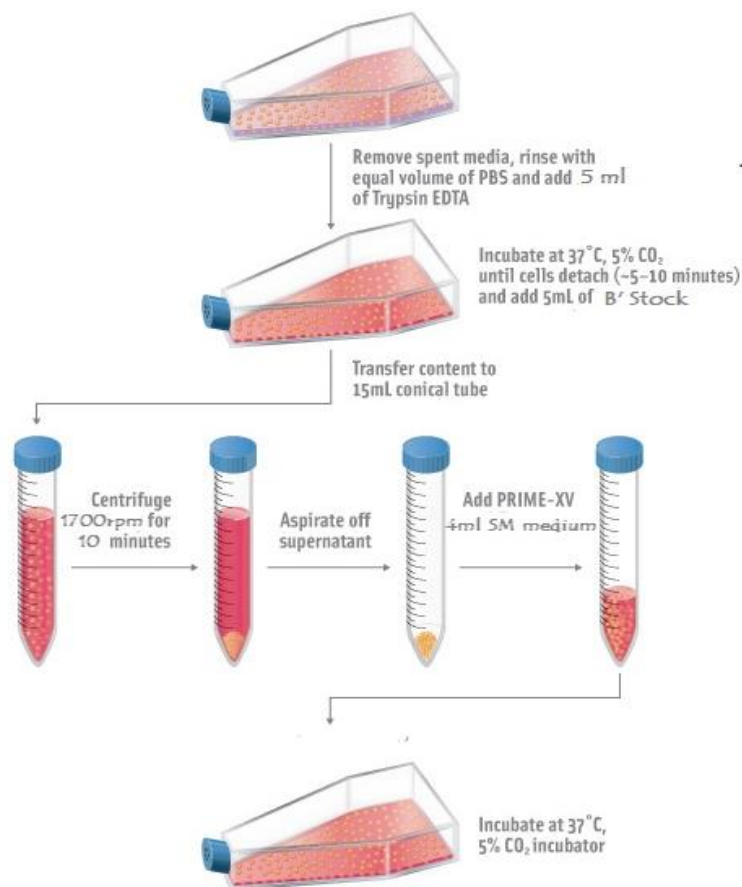


Εικόνα 6.2.: Καλλιέργεια κυττάρων αμνιακού υγρού σε φλάσκα

6.2. Ανακαλλιέργεια

Σε περίπτωση που παρουσιαστεί ανάγκη στις καλλιέργειες λόγω αυξημένου όγκου καλλιεργητικού υγρού ή αριθμού κυττάρων, γίνεται ανακαλλιέργεια.

- Απομάκρυνση του περιεχομένου της φλάσκας
- Προσθήκη 5ml θρυψίνης (1/10) στη φλάσκα και επώαση για 5 min στους 37°C. Η θρυψίνη διαχωρίζει τα κύτταρα μεταξύ τους και τα ξεκολλάει από την επιφάνεια της φλάσκας.
- Έντονο πιπετάρισμα και ελαφρύ ξύσιμο της φλάσκας για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού B' Stock για την απενεργοποίηση της θρυψίνης
- Φυγοκέντριση (10 min 16000 rpm)
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και Επαναιώρηση σε 4ml καλλιεργητικού υλικού SM

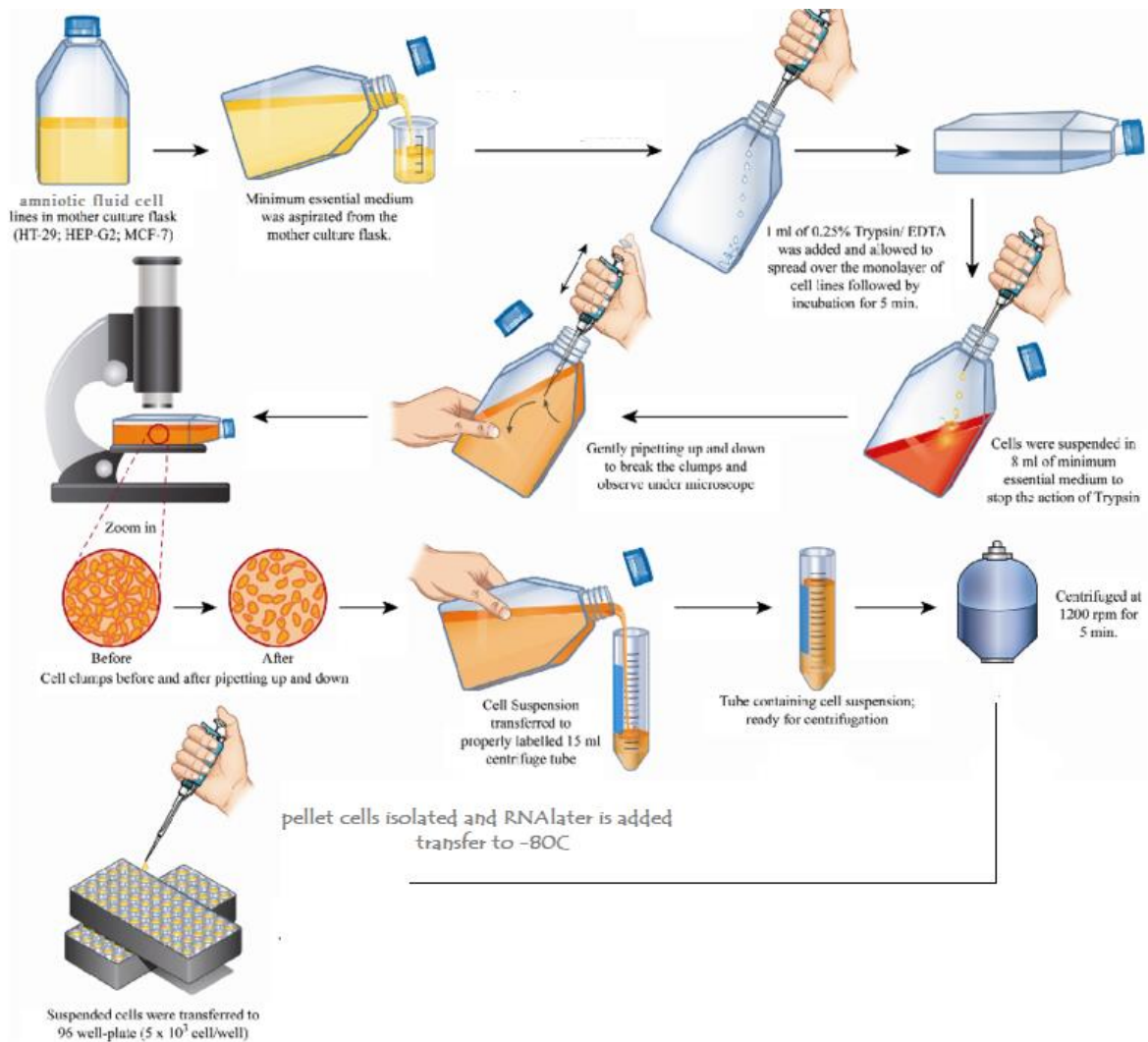


Εικόνα 6.3: Ανακαλλιέργεια κυττάρων αμνιακού υγρού

6.3. Συγκομιδή και κατάψυξη κυττάρων (harvest)

Καθημερινά ελέγχεται η ανάπτυξη των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Όταν στη καλλιέργεια εμφανιστούν αποικίες ινοβλαστών και πάνω σε αυτές αποικίες AFSC like cells (Amniotic Fluid Stem Cell like cells, αποικίες τύπου πολυδύναμων κυττάρων αμνιοτικού υγρού) προχωράμε σε συγκομιδή και κατάψυξη

- Απομάκρυνση του περιεχομένου της φλάσκας
- Προσθήκη 5ml θρυψίνης (1/10) στη φλάσκα και επώαση για 5 min στους 37°C. Η θρυψίνη διαχωρίζει τα κύτταρα μεταξύ τους και τα ξεκολλάει από την επιφάνεια της φλάσκας.
- Έντονο πιπετάρισμα και ελαφρύ ξύσιμο της φλάσκας για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού B' Stock για την απενεργοποίηση της θρυψίνης
- Φυγοκέντρωση (10 min 16000 rpm)
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου, μεταφορά των κυττάρων σε cryogenic falcon
- Προσθήκη 1 σταγόνας RNA later
- Κατάψυξη στους -80°C



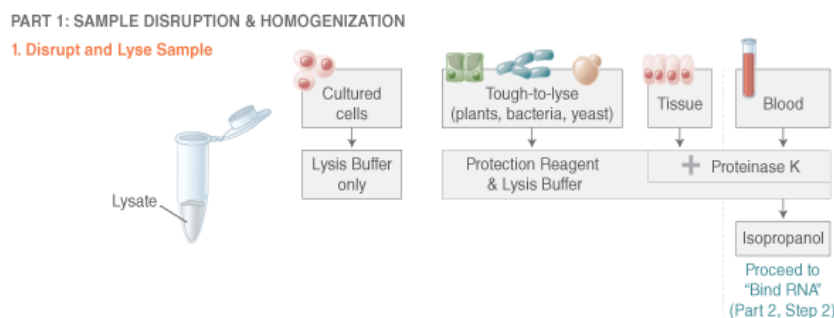
Εικόνα 6.4.: Συγκομιδή και κατάψυξη κυττάρων με χρήση θρυψίνης

7.Μοριακές τεχνικές

7.1. Απομόνωση RNA

Στάδια απομόνωσης RNA δειγμάτων:

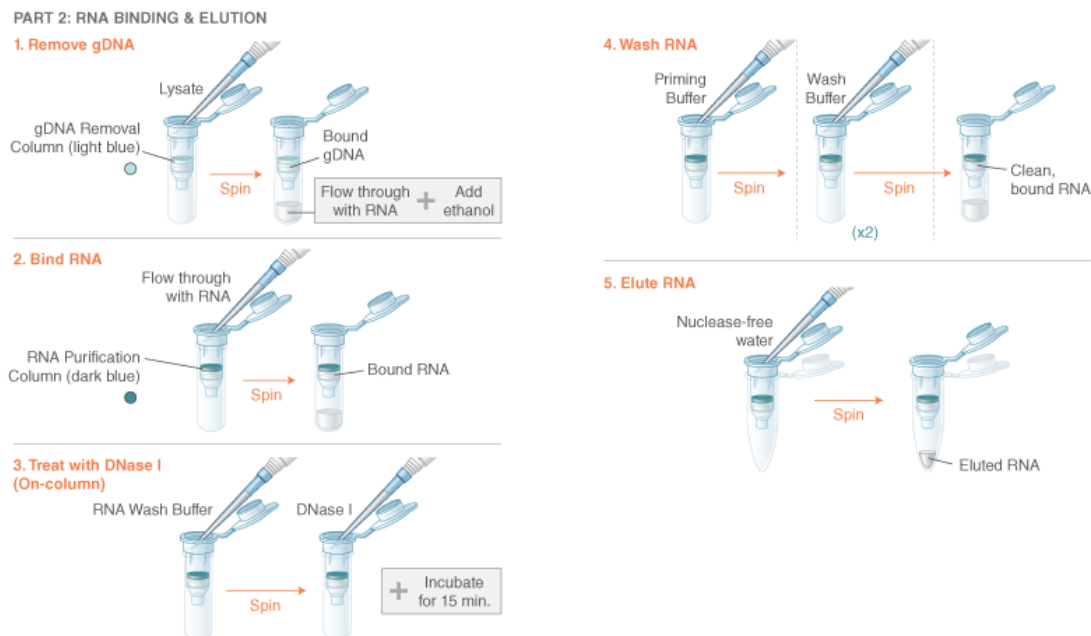
- Λύση κυτταρικών δομών και ομογενοποίηση δειγμάτων: Αρχικά πραγματοποιείτε φυγοκέντριση του δείγματος των κυττάρων αμνιακού υγρού για 5 λεπτά σε 140 gr. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, προσθήκη 300 µl Lysis Buffer και ομογενοποίηση του μίγματος



Εικόνα 7.1.: Λύση των κυτταρικών δομών και ομογενοποίηση δείγματος

- Δέσμευση και έκλουση RNA: Το εναιώρημα μεταφέρετε στην γαλάζια στήλη Monarch gDNA Removal Column. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 1 λεπτό σε 140 rpm κατά την οποία το μεγαλύτερο μέρος του gDNA παραμένει στην γαλάζια στήλη ενώ το RNA εκλύεται στο σωλήνα συλλογής Monarch Collection Tube. Προσθέτουμε ίση ποσότητα 100% αιθανόλη (300µl). Η προσθήκη αιθανόλης δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για το RNA να δεσμεύεται στη στήλη καθαρισμού RNA. Μεταφέρουμε το εναιώρημα σε μπλε σκούρα στήλη καθαρισμού του RNA Monarch RNA Purification Columns. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση 1 λεπτό και απόρριψη του εκλούματος. Προσθέτουμε 500 µl Monarch RNA Priming Buffer, φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 140 rpm και απορρίπτουμε το έκλουμα. Ακολουθεί διπλή έκπλυση της στήλης με 500 µl Monarch RNA Wash Buffer (5x). Στην πρώτη έκπλυση η στήλη φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 140 rpm, ενώ στη δεύτερη για δυο λεπτά στις 140 rpm. Το τελευταίο βήμα αφορά την έκλουση του RNA το οποίο βρίσκεται μέχρι αυτή τη στιγμή δεσμευμένο στην μεμβράνη πυριτίου της στήλης. Για την έκλουση και συλλογή του RNA

πραγματοποιείται μεταφορά της στήλης σε αποστειρωμένο eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 100 µl nuclease free Water σε αυτή. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 140 rpm, η στήλη απορρίπτεται και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C .



Εικόνα 7.2.: Δέσμευση και έκλυση RNA

7.2. Αντίστροφη μεταγραφή-Σύνθεση cDNA

Αντίστροφη μεταγραφή, Reverse Transcription (RT), ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA ιούς (ρετροϊούς) όπως ο ιός HIV. Το ένζυμο μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών.

Η αντίστροφη μεταγραφάση ανακαλύφθηκε, ταυτόχρονα και ανεξάρτητα, το 1970 από τους H. Temin και D. Baltimore. Η ανακάλυψη του ενζύμου οδήγησε στη διαμόρφωση του κεντρικού δόγματος της βιολογίας στη σημερινή του μορφή και χάρισε στους δύο ερευνητές το Νόμπελ ιατρικής το 1975. Έδωσε σημαντική ώθηση στη μοριακή βιολογία και στην έρευνα, καθώς επέτρεψε τη μετατροπή των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά, συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία μπορούν να υποστούν χειρισμούς και να μελετηθούν όπως τα υπόλοιπα μόρια DNA (PCR, κλωνοποίηση, αλληλούχηση κ.λπ.). Επίσης, έδωσε νέες δυνατότητες στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, ενώνοντας την αντίστροφη μεταγραφή με την κλασική ή την ποσοτική PCR. Με αυτόν τον τρόπο σταδιακά εγκαταλείφθηκε για τη

μελέτη της γονιδιακής έκφρασης η χρονοβόρος και επικίνδυνη, λόγω χρήσης ραδιενέργειας, μέθοδος του στυπώματος κατά Northern.

Σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA:

Η αντίδραση σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA (First strand cDNA synthesis) πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό υλικό RNA, τα dNTPs και οι κατάλληλοι εκκινητές. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεταγραφάσες είναι η μεταγραφάση του ιού μυελοβλαστώματος των πτηνών, Avian Myeloblastosis Virus transcriptase (AMV), και η μεταγραφάση του ιού Moloney της λευχαιμίας των ποντικών, Moloney Murine Leukemia Virus transcriptase (M-MLV)).

Για τη σύνθεση cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία είδη εκκινητών (**Εικόνα 7.3**).



Εικόνα 7.3.: Διαφορετικοί εκκινητές για τη σύνθεση του cDNA. Για τη σύνθεση του cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία είδη εκκινητών, οι oligo-dT εκκινητές, εκκινητές ειδικοί για κάθε γονίδιο και τυχαίοι εξανουκλεοτιδικοί εκκινητές.

1. **Oligo-dT:** Οι εκκινητές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που υβριδίζονται στην πολυ-A ουρά των mRNAs. Με τη χρήση τους μπορούν να συντεθούν ακέραια (ολόκληρα) τα μόρια mRNA, η χρήση τους όμως δεν συνιστάται σε περιπτώσεις μεγάλων μορίων mRNA, >4 Kb (το 5' άκρο τους δεν θα αντιπροσωπεύεται επαρκώς) ή όταν τα μόρια του RNA στόχου δεν έχουν πολυ-A ουρά (RNA προκαρυωτικών οργανισμών).

2. **Μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών:** Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Θεωρείται ότι με τη χρήση του μίγματος των τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA (ανεξαρτήτως πολυ-A ουράς και

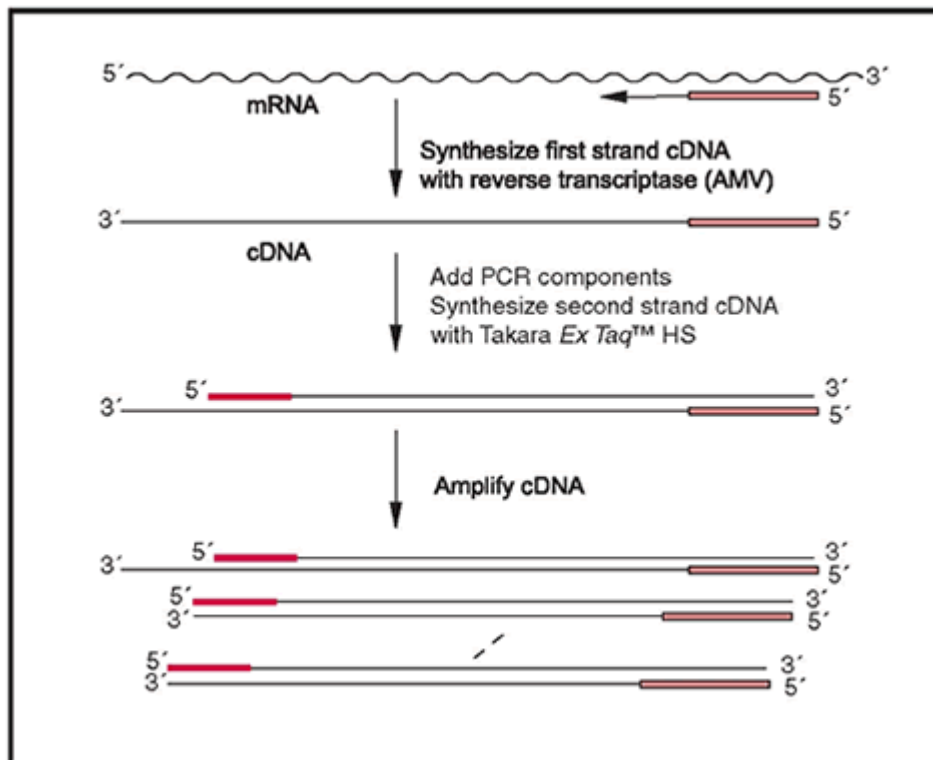
σε όλο το μήκος τους). Στην πράξη χρησιμοποιείται συνήθως ένα μίγμα oligo-dT και εξανουκλεοτιδικών εκκινητών.

3. Εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο στόχο: Όταν το ζητούμενο είναι η αυξημένη ευαισθησία και ο έλεγχος ενός μόνο ή μικρού αριθμού γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητές ειδικοί για τα επιθυμητά γονίδια. Στην πράξη, αυτή η μέθοδος δεν έχει ευρεία εφαρμογή, γιατί απαιτείται προτύπωση των συνθηκών της αντίδρασης για κάθε ξεχωριστό εκκινητή.

Για την σύνθεση της βιβλιοθήκης cDNA στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) της TaKaRa. Το kit περιλαμβάνει τυχαία εξαμερή και Oligo dT Primer τα οποία λειτουργούν σαν δομικά στοιχεία για την έναρξη της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής. Σε πρώτο βήμα παρασκευάζουμε το master mix το οποίο περιεχέει:

- | | |
|---|--------|
| • 5X PrimeScript Buffer (for Real Time) | 2 μl |
| • PrimeScript RT Enzyme Mix I | 0.5 μl |
| • Oligo dT Primer (50 Mm)*1 | 0.5 μl |
| • Random 6 mers (100 μM)*1 | 0.5 μl |
| • RNase Free dH ₂ O | 5.5 μl |

Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης που εμπεριέχεται στο kit και φυλάσσεται αυστηρά στους -20 °C. Το ένζυμο προστίθεται τελευταίο στο μίγμα. Τέλος προσθέτουμε 1μl RNA template και το μεταφέρουμε στον θερμικό κυκλοποιητή. Η σύνθεση cDNA εκτελείται στους 50° C για χρονικό διάστημα από 20 min. Μετά το πέρας της αντίδρασης σχηματίζεται ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο που περιέχει μια αλυσίδα RNA και μια αλυσίδα DNA. Στη συνέχεια, με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (85° C) καταστρέφονται η αντίστροφη μεταγραφάση και η αλυσίδα του RNA. Το νεοσυντεθέν cDNA είναι συμπληρωματικό του αρχικού RNA και η ουρακίλη έχει αντικατασταθεί από τη θυμίνη (**Εικόνα 7.4.**). Το cDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό υλικό στην αντίδραση rt PCR.



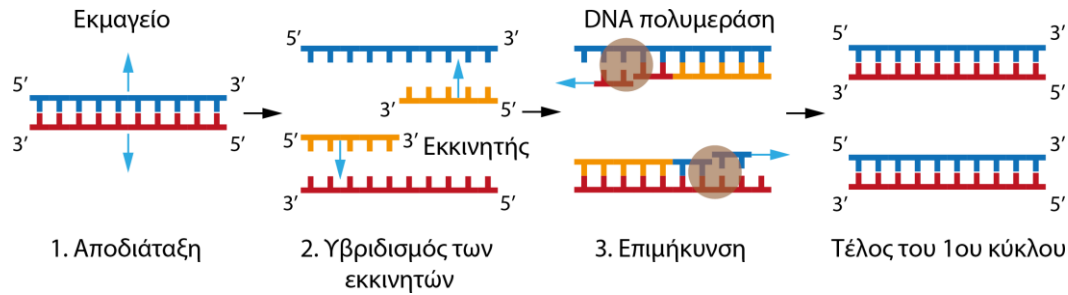
Εικόνα 7.4.: Συνθεση cDNA με το PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) της TaKaRa.

7.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis, που εργαζόταν σε μια εταιρεία βιοτεχνολογίας της Καλιφόρνιας. Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε 10 χρόνια αργότερα με το βραβείο Νόμπελ. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

Τα στάδια της PCR:

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (Εικόνα 7.5.):



Εικόνα 7.5.:Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.

3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους.

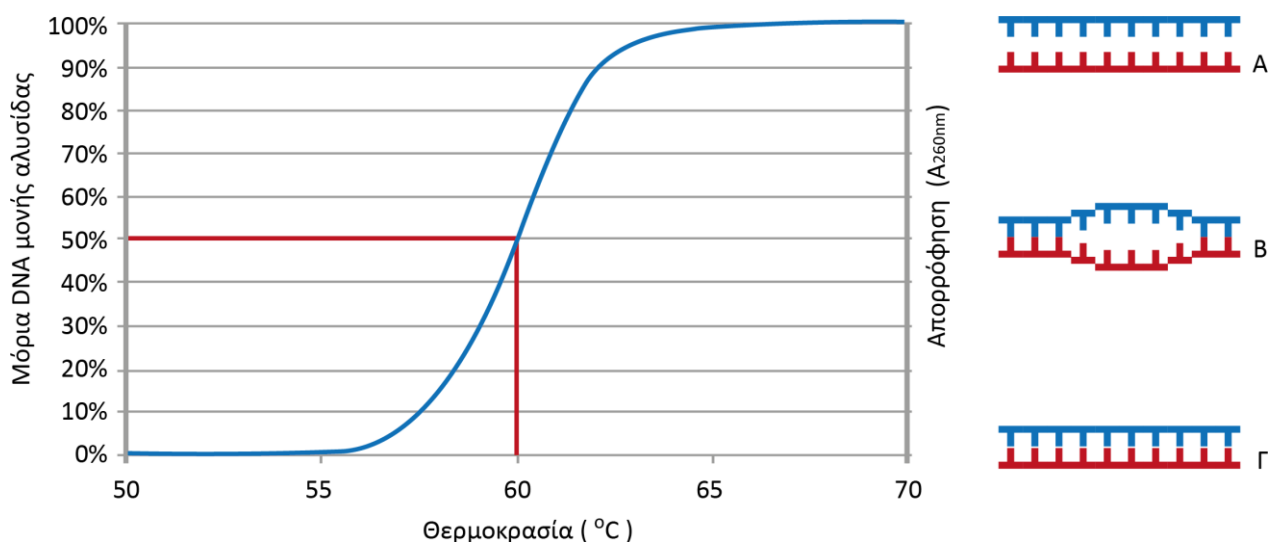
Τα συστατικά της PCR:

1 DNA πολυμεράση: Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί και ιοί) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72° C, ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους 95° C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

2 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές: Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR.

Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.

Οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών (Primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 bp και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR. Επίσης, η ύπαρξη περιοχών συμπληρωματικότητας μέσα στον εκκινητή αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού στην αλληλουχία στόχο. Η θερμοκρασία αποδιάταξης, Melting temperature (T_m), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C αυξάνει την T_m , καθώς οι βάσεις G και C ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλωνο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις A και T που ενώνονται με δύο δεσμούς υδρογόνου.



Εικόνα 7.6.: Καμπύλη αποδιάταξης μορίων δίκλωνου DNA.

Στην αντίδραση PCR η T_m των εκκινητών κυμαίνεται τυπικά στους 58-68 ° C. Οι δύο εκκινητές δεν πρέπει να έχουν πολύ διαφορετικές T_m μεταξύ τους, με μια διαφορά <3-5 ° C να θεωρείται αποδεκτή.

Υπάρχουν πολλοί τύποι για τον υπολογισμό της T_m των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών. Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους είναι ο ακόλουθος:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Αν και ο παραπάνω τύπος ισχύει με ακρίβεια για ολιγονουκλεοτίδια μέχρι 7 βάσεων, στην πράξη χρησιμοποιείται για τον αδρο υπολογισμό της T_m εκκινητών μέχρι και 20-22 νουκλεοτιδίων. Η T_m των εκκινητών επηρεάζει άμεσα τη θερμοκρασία υβριδισμού τους στην αλληλουχία στόχο. Αν και η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού πρέπει να προσδιοριστεί πειραματικά, ένα καλό σημείο εκκίνησης είναι 3 ° C λιγότεροι από τη χαμηλότερη T_m των δύο εκκινητών.

3 Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος: Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μl) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR. Μεγάλη ποσότητα DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

4 Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+} : Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} , που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης.

Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια Mg^{2+} οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg^{2+} για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM.

5 Νουκλεοτίδια (dNTPs): Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates,

dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 μM .

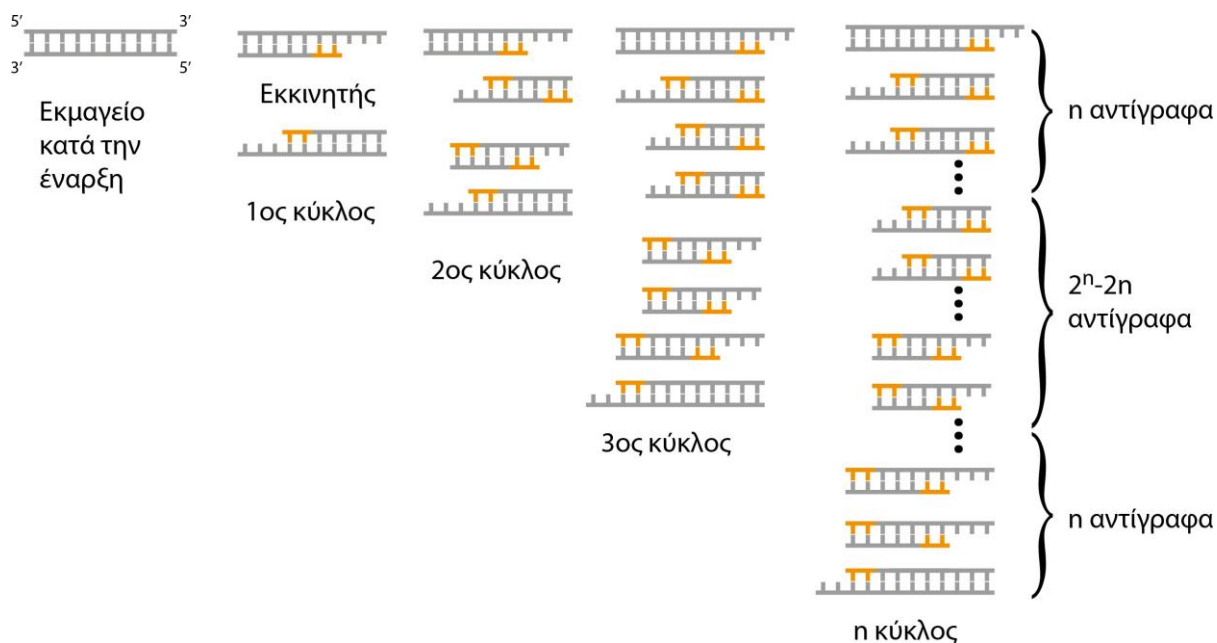
Κινητική της αντίδρασης PCR:

Στη θεωρία, η αύξηση των προϊόντων της PCR είναι εκθετική, γιατί κάθε μόριο DNA που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον επόμενο κύκλο (εικόνα 7.5). Στην πραγματικότητα όμως η PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις (εικόνα 7.6):

Εκθετική φάση: Μόλις έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου. Όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε επάρκεια και η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου.

Γραμμική φάση: Παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.

Φάση πλατώ: Δεν συντίθενται νέα μόρια DNA εξαιτίας της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων.



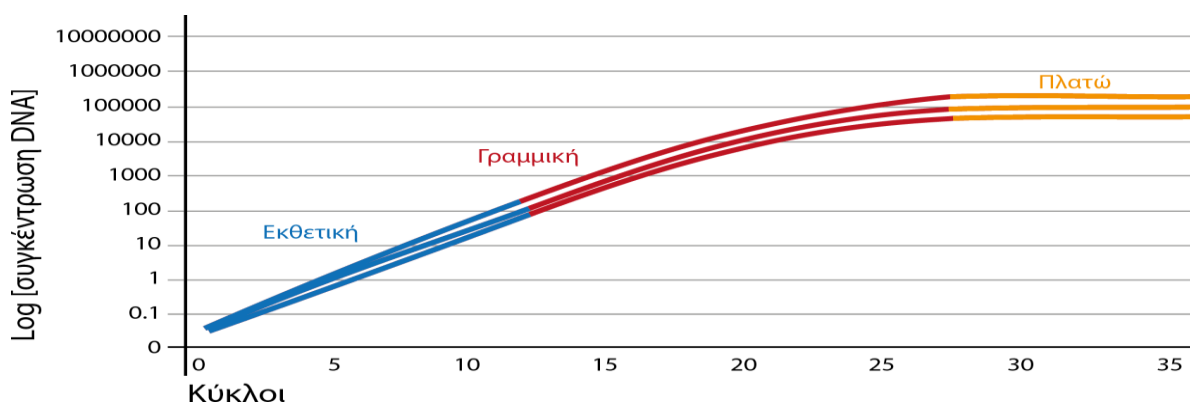
Εικόνα 7.7.: Η κινητική της αντίδρασης PCR. Η αύξηση των προϊόντων της PCR είναι εκθετική γιατί κάθε μόριο DNA που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον επόμενο κύκλο της PCR.

Τα βασικά χαρακτηριστικά μιας αντίδρασης PCR είναι η ειδικότητα (Specificity) και η απόδοση (Efficiency). Για να επιτύχουμε τη βέλτιστη ειδικότητα (δηλαδή να λαμβάνουμε ένα μοναδικό προϊόν) και τη μέγιστη απόδοση (την παραγωγή πολλών μορίων των PCR προϊόντων) μπορούμε να τροποποιήσουμε πολλούς παράγοντες.

Οι παράγοντες που τροποποιούνται συχνότερα είναι η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών.

Βελτιστοποίηση PCR με τροποποίηση θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών:

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών είναι καθοριστικής σημασίας για την ειδικότητα της αντίδρασης. Χαμηλή θερμοκρασία μειώνει την ειδικότητα του υβριδισμού, δηλαδή οι εκκινητές μπορούν να προσδεθούν σε αλληλουχίες DNA που δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικές προς τη δική τους. Σε αυτή την περίπτωση παράγονται μη επιθυμητά παραπροϊόντα στην αντίδραση PCR (εικόνα 7.18). Σε υψηλές θερμοκρασίες λιγότερα μόρια εκκινητών υβριδίζονται στο DNA, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης της αντίδρασης. Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού συνήθως προσδιορίζεται πειραματικά. Ως σημείο εκκίνησης χρησιμοποιείται μια θερμοκρασία περίπου $3^{\circ}C$ κάτω από τη χαμηλότερη T_m των δύο εκκινητών. Γι' αυτό είναι επιθυμητό οι T_m των δύο εκκινητών να μη διαφέρουν πάνω από $3-5^{\circ}C$ (Εικόνα 7.8.).



Εικόνα 7.8.: Οι φάσεις της αντίδρασης PCR. Η αντίδραση χωρίζεται σε τρεις φάσεις: στην αρχική εκθετική φάση τα προϊόντα της PCR σχηματίζονται με εκθετικό ρυθμό, κατά τη γραμμική φάση ο ρυθμός σύνθεσης επιβραδύνεται και στη φάση του πλατώ δεν συντίθενται πλέον νέα προϊόντα PCR.

7.4. Ποσοτική PCR

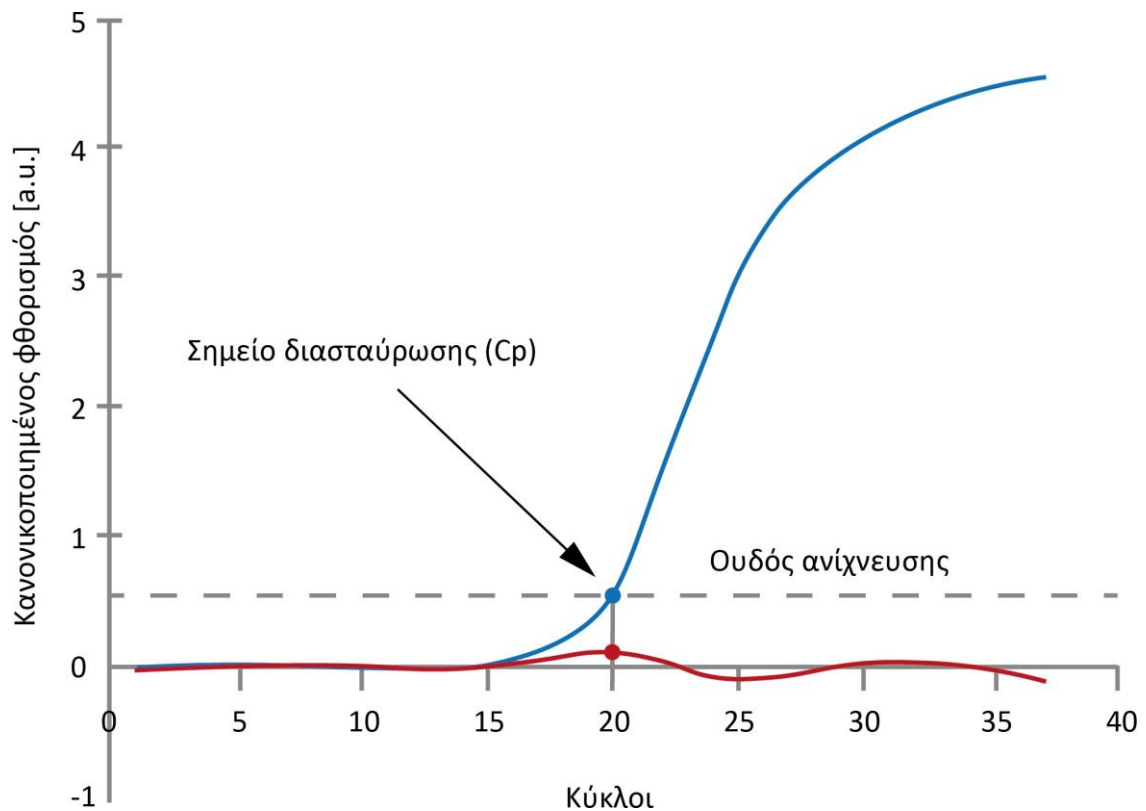
Πολύ σύντομα μετά την ευρεία εφαρμογή της, έγινε προφανές ότι η κλασική PCR δεν μπορούσε να απαντήσει σε ένα άλλο βασικό ερώτημα των ερευνητών, που ήταν το «πόσο;». Το κενό αυτό ήρθε να καλύψει η ποσοτική PCR, που ανακαλύφθηκε το 1993 από τον Russel Higuchi και τους συνεργάτες του, οι οποίοι πρόσθεσαν βρωμιούχο αιθίδιο στο διάλυμα της αντίδρασης και εφάρμοσαν μια κάμερα κλειστού κυκλώματος πάνω στον θερμικό κυκλοποιητή.

Βασικές αρχές της ποσοτικής PCR:

Η ποσοτική PCR έχει εξελιχθεί πολύ από το 1993 μέχρι σήμερα και πλέον αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που «διαβάζουν» τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Σήμερα είναι δυνατή η ταυτόχρονη χρήση μέχρι και 21 διαφορετικών χρωστικών σε μια αντίδραση PCR. Η βασική διαφορά ανάμεσα στην ποσοτική και την κλασική PCR είναι η φάση της αντίδρασης, στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα (**Εικόνα --**).

1 Στην κλασική PCR πρέπει πρώτα να ολοκληρωθούν όλοι οι κύκλοι της αντίδρασης (25-35) και η αντίδραση να φτάσει στη φάση κορεσμού (πλατώ). Στη συνέχεια τα δείγματα υφίστανται περαιτέρω χειρισμό, όπως για παράδειγμα ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης, και αξιολογείται το αποτέλεσμα της PCR.

2 Αντίθετα, στην ποσοτική PCR τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης. Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή C_p , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline).



Εικόνα 7.9 – Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline). Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή C_t , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης. Το σημείο αυτό είναι αλλιώς γνωστό ως *σημείο διασταύρωσης*, C_p (Crossing Point). Η τιμή C_p είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος. Δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο C_p από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.

Το C_p αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης στον οποίο η ένταση του φθορισμού θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο και θα φτάσει έναν συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. Εάν θεωρήσουμε ότι στο σημείο του C_p η αντίδραση είναι ακόμη στην εκθετική φάση, δηλαδή σε κάθε κύκλο τα προϊόντα της PCR διπλασιάζονται, τότε η απόδοση της αντίδρασης είναι ίση με 2. Επομένως, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο, μπορούν να υπολογιστούν τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου σε κάθε δείγμα, με μοναδικές άγνωστες παραμέτρους το C_p και τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_p (εικόνα 7.10):

$$N_o = N_t / (E + 1)^{C_p}$$

όπου N_o είναι τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο αρχικό δείγμα, N_t είναι τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_p , E (Efficiency) είναι η απόδοση της αντίδρασης (στην εκθετική

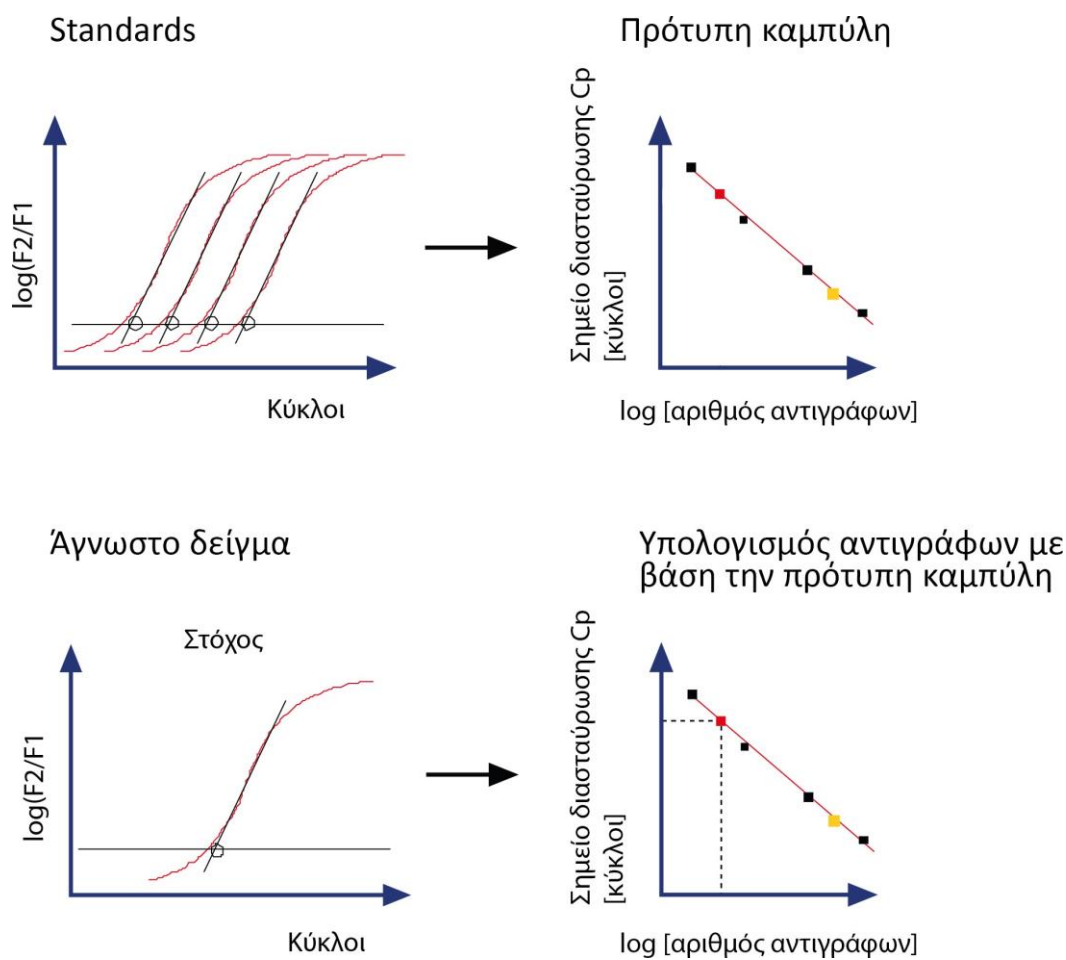
φάση $E = 2$) και C_p το σημείο διασταύρωσης, δηλαδή ο κύκλος της αντίδρασης κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού ξεπερνά τον ουδό του βασικού επιπέδου.

Το C_p υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα. Τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_p υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη. Αντίστοιχα υπάρχουν και άλλοι μαθηματικοί τύποι υπολογισμού που περιλαμβάνουν διόρθωση για τη μείωση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης που παρατηρείται με το πέρασμα των κύκλων πολλαπλασιασμού.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης. Επομένως δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο C_p από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα. Επίσης είναι καλό να σημειωθεί ότι η παραγωγή του προϊόντος της PCR έχει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό.

Απόλυτη ποσοτικοποίηση, πρότυπη καμπύλη και γονίδιο αναφοράς:

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση στην ποσοτική PCR πραγματοποιείται βάσει μια πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση ή καλύτερα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards).



Εικόνα 7.10 – Απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων ενός γονιδίου με χρήση πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργείται υποβάλλοντας σε PCR δείγματα που έχουν γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards) και συνήθως έχουν 1 log διαφορά μεταξύ τους. Η συσχέτιση των σημείων διασταύρωσης (C_p) των standards και του λογαρίθμου της συγκέντρωσής τους μας δίνει την πρότυπη καμπύλη. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας μόνο το σημείο διασταύρωσης (C_p) ενός άγνωστου δείγματος, μπορούμε να υπολογίζουμε τον αριθμό των αντιγράφων του υπό μελέτη γονιδίου.

Συνήθως χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα standards, που έχουν 1 log διαφορά μεταξύ τους. Η πρότυπη καμπύλη, ιδανικά, πρέπει να καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που μπορεί να ανιχνευθούν πειραματικά. Για κάθε γονίδιο κατασκευάζεται διαφορετική πρότυπη καμπύλη, γιατί κάθε αντίδραση PCR-ζεύγους εκκινητών έχει διαφορετική απόδοση. Συνεπώς κάθε αντίδραση ποσοτικής PCR περιλαμβάνει τα δείγματα που πρόκειται να ποσοτικοποιηθούν και τα standards της πρότυπης καμπύλης. Ο αριθμός αντιγράφων του κάθε γονιδίου στο C_p υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη (**Εικόνα 7.10**). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης το αποτέλεσμα για την έκφραση ενός γονιδίου δίνεται ως αριθμός ανά μονάδα αρχικού δείγματος, πχ. 130 αντίγραφα του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) ανά ml αίματος, ανά κύτταρο, ανά mg ιστού. Με αυτόν τον τρόπο

πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση αντιγράφων γονιδίων που είναι εξωγενή ως προς το ανθρώπινο γονιδίωμα, όπως οι ιοί CMV, HIV, HCV κ.ά.

Στην περίπτωση που γίνεται ποσοτικοποίηση γονιδίων που εκφράζονται ενδογενώς στον άνθρωπο (ή στο εκάστοτε πειραματικό σύστημα), είναι απαραίτητη η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς πρέπει να έχει σταθερή έκφραση στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες και χρησιμοποιείται για να εξομαλύνει τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δείγματα είτε λόγω αποκλίσεων στην απόδοση της σύνθεσης του cDNA είτε λόγω μικροδιαφορών στο πιπεττάρισμα κατά την προσθήκη γενετικού υλικού στην αντίδραση. Τα πιο συνηθισμένα γονίδια αναφοράς είναι το Abelson murine Leukemia viral oncogene homolog 1 (*ABL1*) και η ακτίνη-β (*ACTB*). Το αποτέλεσμα έχει πλέον μόνο αριθμητική μορφή και είναι του τύπου:

$$\text{Αριθμός αντιγράφων δείγματος} = \frac{\text{αριθμός αντιγράφων γονιδίου στόχου}}{\text{αριθμός αντιγράφων γονιδίου αναφοράς}}$$

Εκτός από την απόλυτη, μπορεί να πραγματοποιηθεί και σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Σε αυτή την περίπτωση συγκρίνονται τα C_p του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς ανάμεσα σε δύο δείγματα και το αποτέλεσμα είναι του τύπου: «x φορές υψηλότερη ή χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου στο δείγμα 1 σε σχέση με το δείγμα 2». Έχουν αναπτυχθεί πολλά μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν αυτή τη μορφή σχετικής ποσοτικοποίησης. Το απλούστερο και ευρύτερα χρησιμοποιούμενο είναι το ακόλουθο [1]:

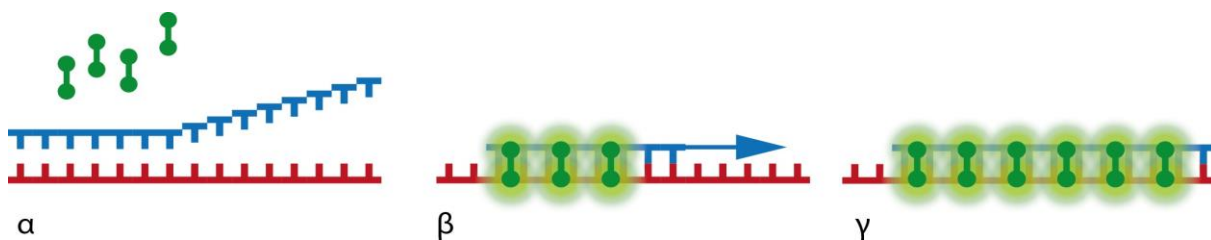
$$R = 2^{-[\Delta C_p \text{ δείγματος} - \Delta C_p \text{ γονιδίου αναφοράς}]}$$
$$R = 2^{-[\Delta \Delta C_p]}$$

Φθορίζουσες χρωστικές:

Οι φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην ποσοτική PCR διακρίνονται σε ειδικές και μη ειδικές.

Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, όπως το SYBR Green I (εικόνα 7.11.), παρουσιάζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα (Α) και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA (Β και Γ). Κατά την ποσοτική

PCR πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού σε κάθε κύκλο μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA. Όσο περισσότερα PCR προϊόντα παράγονται τόσο περισσότερο αυξάνει ο φθορισμός που καταγράφεται από το μηχάνημα.



Εικόνα 7.11 – Μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές. Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, με γνωστότερη το SYBR Green I, ενσωματώνονται στο δίκλωνο μόριο dsDNA καθώς αυτό συντίθεται και φθορίζουν μόνο όταν είναι συνδεδεμένες.

Οι ειδικές χρωστικές δεν είναι ελεύθερες στο διάλυμα, αλλά είναι προσδεδεμένες πάνω σε μικρά μόρια DNA (25-30 βάσεις) και υβριδίζονται στο γονίδιο στόχο ανάμεσα στους δύο εκκινητές. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωστικές είναι οι ιχνηθέτες τύπου Taqman (Taqman Probes).

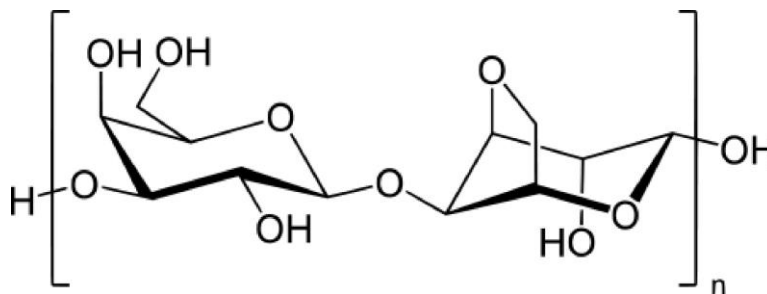
Το σαφές πλεονέκτημα των ιχνηθετών Taqman είναι ότι καθιστούν δυνατή τη μέτρηση και ποσοτικοποίηση μόνο του επιθυμητού προϊόντος της PCR. Τα διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα που τυχόν παράγονται κατά την αντίδραση δεν μετέχουν στην ποσοτικοποίηση, καθώς ο ιχνηθέτης δεν υβριδίζεται πάνω τους και κατά συνέπεια δεν δημιουργείται σήμα φθορισμού. Βέβαια, οι ιχνηθέτες αυτοί έχουν σχετικά υψηλό κόστος αγοράς και για κάθε PCR πρέπει να σχεδιαστεί ο κατάλληλος ιχνηθέτης. Αντίθετα, οι μη ειδικές χρωστικές (όπως το SYBR Green I) είναι φθηνές και κοινές για όλα τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην ποσοτική PCR. Για να χρησιμοποιηθούν σωστά όμως πρέπει η αντίδραση να σχηματίζει ένα και μοναδικό προϊόν και όχι διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί με μελέτη της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης της ποσοτικής PCR.

7.5. Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 500 bp έως 25 Kb. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στις βιολογικές επιστήμες, σε τομείς όπως η μοριακή βιολογία, η ιατροδικαστική και η έρευνα.

Η αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη βιολογία από τον Robert Koch, το 1882, ως καλλιεργητικό μέσο για τα βακτήρια της φυματίωσης. Είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη (red algae) και χρησιμοποιείται συχνά στη ζαχαροπλαστική, σε καλλιεργητικά μέσα και για την παρασκευή πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και RNA (**Εικόνα 7.12**).



Εικόνα 7.12.: Ο χημικός τύπος του πολυσακχαρίτη αγαρόζη. («Agarose polymere» από Yikrazuul)

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.

3. Χρώση του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και στη συνέχεια άμεση παρατήρηση και φωτογράφησή του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμινύεται αгарόζη σε σκόνη με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE ή TBE) και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες και δημιουργούν τα μικρά βοθρία υποδοχής του δείγματος (τα λεγόμενα στη γλώσσα του εργαστηρίου «πηγαδάκια»). Όταν κρυώσει η αгарόζη δημιουργεί ένα πήκτωμα, καθώς δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αгарόζης. Στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

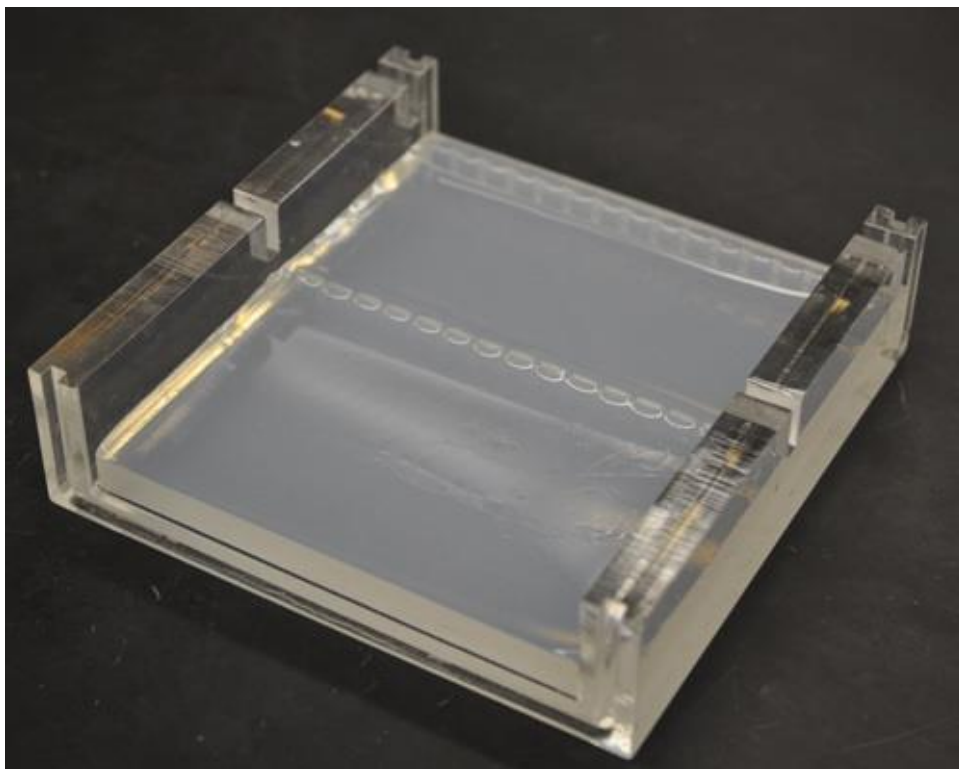
Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης για πηκτώματα αгарόζης είναι οριζόντια δοχεία τα οποία φέρουν στα άκρα τους δύο ηλεκτρόδια από πλατίνα. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE ή TBE) και με τη βοήθεια τροφοδοτικού εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται οδηγεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA να κινηθούν προς την κάθοδο. Η ηλεκτρική τάση ασκείται για τον βέλτιστο χρόνο που απαιτείται για τον διαχωρισμό των μορίων του DNA.

Η προσθήκη κατάλληλων χρωστικών επιτρέπει την παρατήρηση των διαχωρισμένων μορίων DNA σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Ειδικά συστήματα επιτρέπουν τη λήψη ψηφιακών ή αναλογικών φωτογραφιών του πηκτώματος.

Προετοιμασία του πηκτώματος αгарόζης:

Κατά την προετοιμασία του πηκτώματος ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Ζυγίζονται 3gr αгарόζης και προστίθενται σε 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης Iris Orate Acid/ETA (TBE) σε να πληρωθεί το εκμαγείο του πηκτώματος. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αгарόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ανεπαρκής διάλυση της αгарόζης σε αυτό το στάδιο παρασκευής του πηκτώματος οδηγεί σε ποιοτικά κακή ηλεκτροφόρηση.
2. Η κωνική φιάλη με την αгарόζη ψύχεται με τη χρήση τρεχάμενου νερού. Στο στάδιο αυτό προστίθενται 10μl βρωμιούχο αιθίδιο (χρωστική παρατήρησης του DNA). Η επιλογή αυτή προσφέρει το πλεονέκτημα της δυνατότητας ελέγχου της προόδου της ηλεκτροφόρησης, διακόπτοντας τη διαδικασία, παρατηρώντας το DNA σε τράπεζα υπεριώδους και συνεχίζοντας τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, αν αυτό είναι απαραίτητο. Τοποθετούμε της ρευστή αгарόζη στο εκμαγείο (**Εικόνα 7.13**).



Εικόνα 7.13.:Εκμαγείο για την παρασκευή πηκτώματος αгарόζης. Για να στερεοποιηθεί έχει σφραγισμένα άκρα και φέρει σε κατάλληλες αποστάσεις χτένια, τα οποία σχηματίζουν τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Όταν το πήκτωμα κρυώσει και στερεοποιηθεί, αλλάζει χρώμα από διαυγές σε γαλακτόχρωμο. Τότε αφαιρούνται τα χτένια και το πήκτωμα μπορεί να μεταφερθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

Ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αгарόζης:

Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τα μόρια κινούνται ανάλογα με το φορτίο τους και το μέγεθός τους. Το DNA έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων και γι' αυτό τα μόρια DNA που ηλεκτροφορούνται κινούνται προς την κάθοδο. Η κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αгарόζης εξαρτάται από:

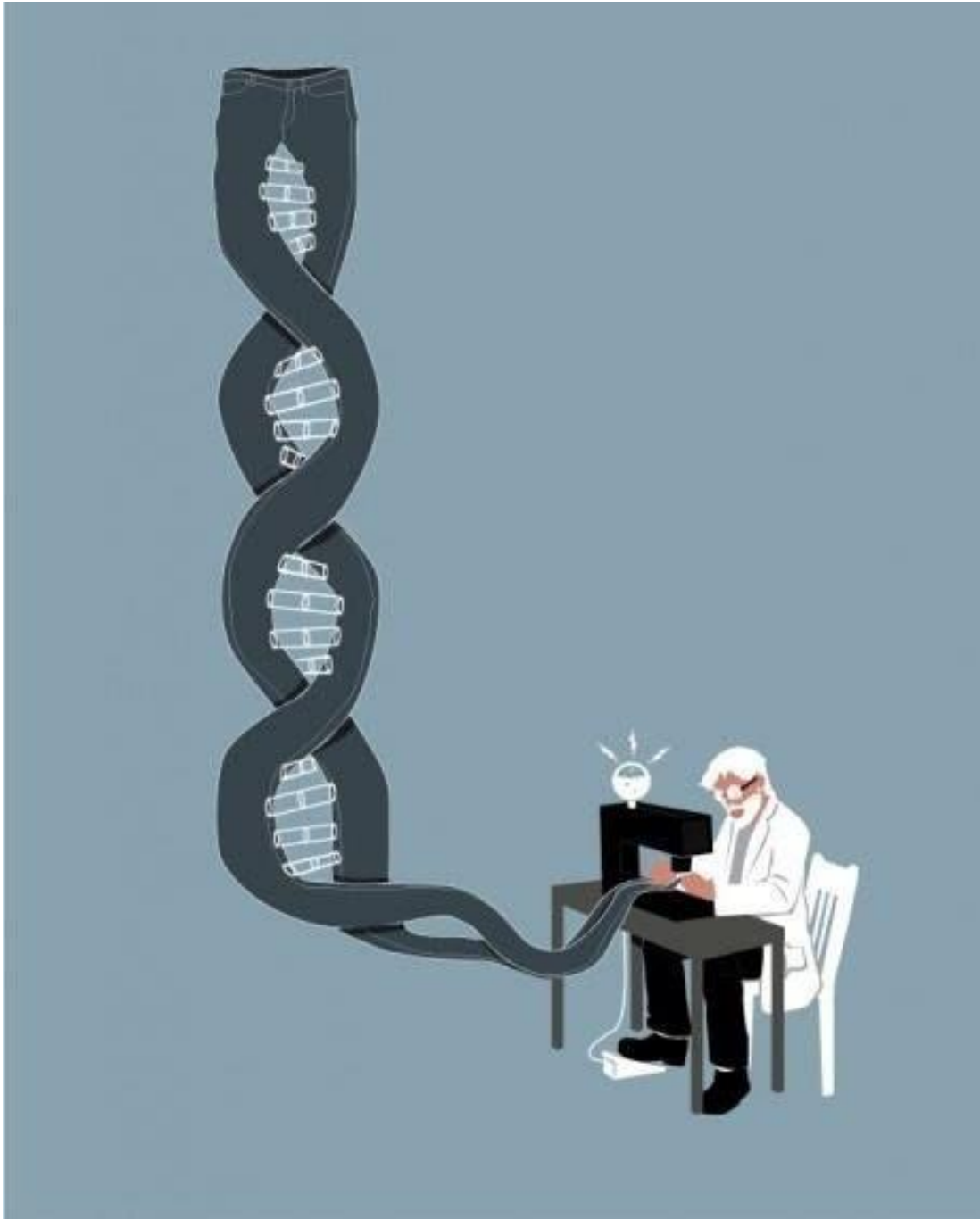
1. Το μέγεθος. Τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται ταχύτερα, καθώς συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος. Αντίθετα, τα μεγαλύτερα μόρια DNA κινούνται βραδύτερα. Για να μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται, τοποθετούμε πάντα στο πήκτωμα, εκτός από τα δείγματά μας, και έναν μάρτυρα με κομμάτια DNA γνωστού μοριακού βάρους

2. Τη συγκέντρωση της αгарόζης. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε χρησιμοποιείται και διαφορετική πυκνότητα του πηκτώματος αгарόζης. Στα πυκνά πηκτώματα μπορούν να κινηθούν εύκολα μόνο τα μικρά μόρια DNA, τα οποία και διαχωρίζονται επιτυχώς. Στο ίδιο πηκτώμα τα μεγαλύτερα μόρια θα κινηθούν όλα ταυτόχρονα και θα δώσουν την εικόνα μιας και μόνο ζώνης (δεν θα διαχωριστούν).

3. Τη διαμόρφωση του DNA. Η στερεοδιαμόρφωση των μορίων DNA (υπερελικομένα, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα) καθορίζει και την αντίσταση που δέχονται τα μόρια DNA καθώς κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος αгарόζης. Τα υπερελικομένα μόρια (συνήθως πλασμιδιακό DNA) κινούνται ταχύτερα και ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA. Ένα γραμμικό μόριο DNA κινείται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού του βάρους.

4. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα μέσα στο πηκτώμα. Τα συνήθη διαλύματα ηλεκτροφόρησης είναι το TBE και το TAE και χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 0,5X. Η ιοντική ισχύς του TAE εξαντλείται ευκολότερα σε παρατεταμένες ηλεκτροφορήσεις με υψηλή διαφορά δυναμικού σε σχέση με το TBE.

5. Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπολογίζεται σε V/cm. Συνήθως εφαρμόζεται τάση 5V /cm με βάση την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Σε χαμηλή τάση ευνοείται ο διαχωρισμός των μεγάλων μορίων (σε τέτοιες περιπτώσεις επιλέγεται τάση 1V/cm), ενώ σε υψηλότερη τάση διαχωρίζονται μόνο τα μικρά μόρια DNA.



Γ. Αποτελέσματα

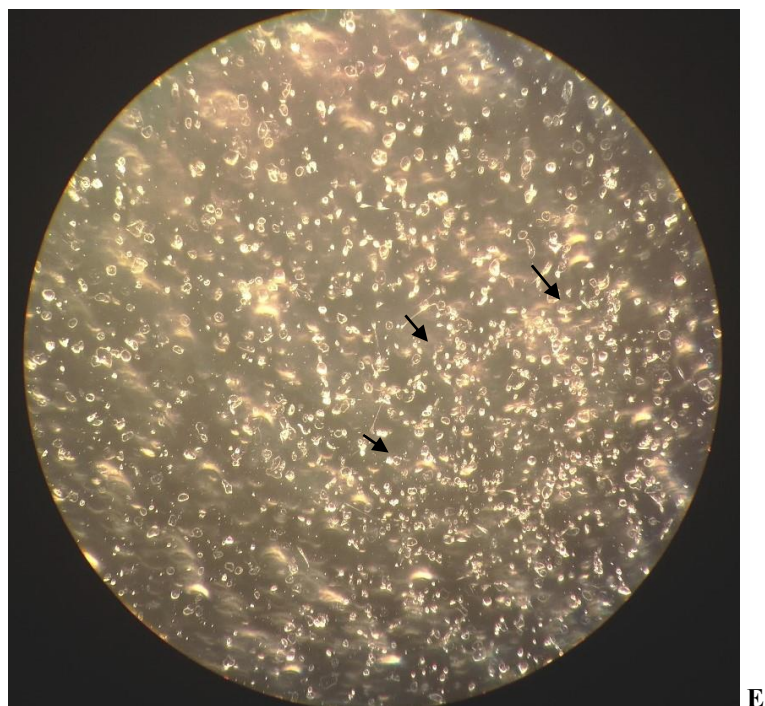
8.1. Καλλιέργεια κυττάρων αμνιακού υγρού

Κύτταρα αμνιακού υγρού από 58 γυναίκες που βρίσκονταν από τη 17^η έως την 20^η εβδομάδα κύησης και έλαβαν μέρος στο πρόγραμμα προγεννητικής διάγνωσης, καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο. Ο εμβρυϊκός ορός βοοειδών (FBS, fetal bovine serum) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο ανάπτυξης καλλιέργειας κυττάρων και ιστών. Ωστόσο, η χρήση του ορού αυτού σε ανθρώπινες κυτταρικές καλλιέργειες παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε σε μια καινοτόμο τεχνική καλλιέργειας του αμνιακού υγρού, στην οποία ο εμβρυϊκός ορός βοδιού, FBS αντικαθίσταται με ορό αμνιακού υγρού (AFS, amniotic fluid serum) με σκοπό την ταυτοποίηση, την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό κυττάρων AFSC-like cells (Amniotic Fluid Stem Cell like cells, Βλαστικά Κύτταρα-τύπου αμνιακού υγρού) και πληθυσμών germ cell like cells (τύπου γεννητικών κυττάρων). Χρήση ορού AFS θα μας επιτρέψει ασφαλή και άμεση χρήση στη κλινική εφαρμογή, λόγω της ανθρώπινης προέλευσης και της αυτόλογης χρήσης.

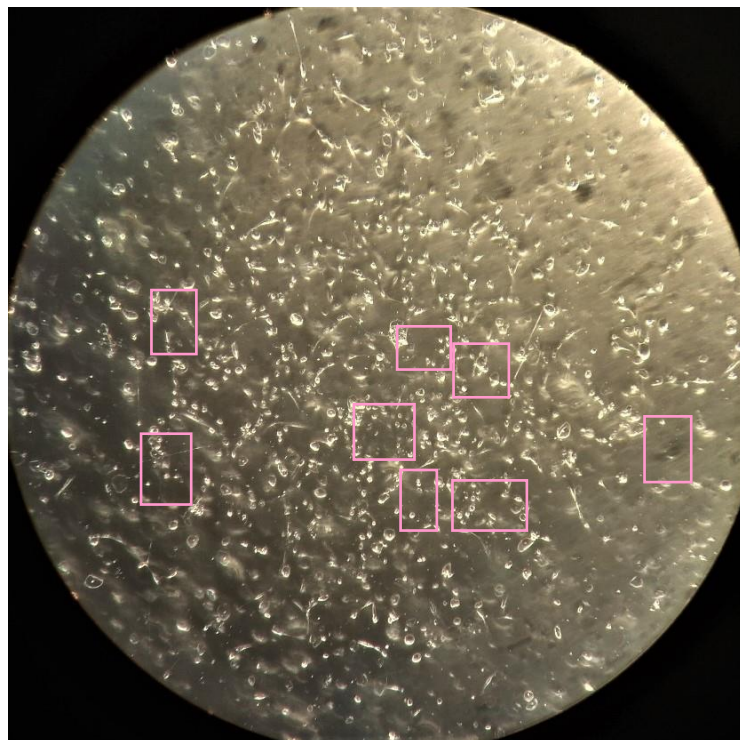
Από τα 58 δείγματα που παραλήφθηκαν τα 35 καλλιεργήθηκαν επιτυχώς σε SM medium. Τα υπόλοιπα 23 παρουσίασαν μόλυνση σε κάποιο στάδιο της καλλιέργειάς τους και δεν συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη. Από κάθε γυναίκα λήφθηκε δείγμα 9 ml αμνιακού υγρού και πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων του μετά απο απομόνωση τους. Η παρατήρηση της πορείας των καλλιιεργειών ήταν καθημερινή. Η πρόοδος των καλλιιεργειών αποτυπώθηκε φωτογραφικά από την 1^η μέχρι την 15^η μερα όπου συνήθως παρατηρούσαμε τον σχηματισμό αποικιών AFSC-like cells και συνεχίζαμε με απομόνωση και κατάψυξη τους.

Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τις καλλιέργειες είναι οι ακόλουθες:



Εικόνα 8.1.: Μέρα 5 Καλλιέργεια Αμνιακού Υγρού FBS free

Την 5^η μέρα της καλλιέργειας (Εικόνα 8.1.) παρατηρούμε την ανάπτυξη ινοβλαστών (επισημαίνονται με μαύρα βέλη). Οι ινοβλάστες που παρατηρούνται είναι λεπτά και μακριά κύτταρα με μακριές κυτταροπλασματικές προεκβολές. Οι ινοβλάστες όσο καλλιεργούνται ως κύτταρα αμνιακού υγρού, αναπτύσσονται σε αποικίες. Οι αποικίες αυτές έχει αποδειχτεί ότι λειτουργούν σαν υπόβαθρο ή αλλιώς τροφοστρώμα για την ανάπτυξη των πολυδύναμων κυττάρων του Αμνιακού υγρού.



Εικόνα 8.2.: Μέρα 10 Καλλιέργεια Αμνιακού Υγρού FBS free

Την 10^η ημέρα της καλλιέργειας (Εικόνα 8.2) παρατηρούμε σχηματισμό αποικιών με μορφολογικά χαρακτηριστικά AFSC (amniotic fluid stem cell, βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού).



Εικόνα 8.3.: Μέρα 15 Καλλιέργεια Αμνιακού Υγρού FBS free

Την 15^η ημέρα η εικόνα των καλλιεργειών ήταν η παραπάνω. Οι αποικίες των AFSC like cells είναι ξεκάθαρες με σαφή όρια και σε ικανοποιητικό μέγεθος για απομόνωση. Σε αυτό το σημείο τα κύτταρα απομονώθηκαν και πραγματοποιήθηκε rt-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης δεικτών, με στόχο τον χαρακτηρισμό των κυττάρων αυτών.

8.2. Αποτελέσματα real time PCR

Με την τεχνική rt-PCR, μία ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Η τεχνική rt-PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη αφού μπορεί να ανιχνεύσει έστω και ένα αντίγραφο μίας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα.

Έτσι χρησιμοποιώντας τους σωστούς εκκινητές για γονίδια που εκφράζονται στα AFSCs πιστοποιούμε ότι πράγματι πρόκειται για κύτταρα AFSCs. Τα γονίδια των οποίων την έκφραση μελετούμε είναι: Oct4, DAZL και ο υποδοχέας της Ωκυτοκίνης.

Η κατάλληλη εφαρμογή της rt-PCR σε τέτοιες μελέτες απαιτεί τη χρήση ενός γονιδίου που εκφράζεται σταθερά στο γονιδίωμα, ως γονίδιο αναφοράς. Εδώ παρατηρούμε την έκφραση του oct4, του DAZL και του υποδοχέα της ωκυτοκίνης συγκριτικά με την έκφραση του g6pd (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση). Το G6pd αποτελεί κλασικό παράδειγμα τέτοιου γονιδίου και κωδικοποιεί το ένζυμο που καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι παραγωγής φωσφορικών πεντόζων. Πιο συγκεκριμένα λειτουργεί μειωτικά στην ισχύ του NADPH με αποτέλεσμα την αναγωγική βιοσύνθεση και διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές Cp που συλλέξαμε για κάθε γυναίκα ξεχωριστά μετά την rt PCR, για τα γονίδια Oct4, DAZL, OXTR, καθώς και για το γονίδιο αναφοράς G6PD που χρησιμοποιήθηκε.

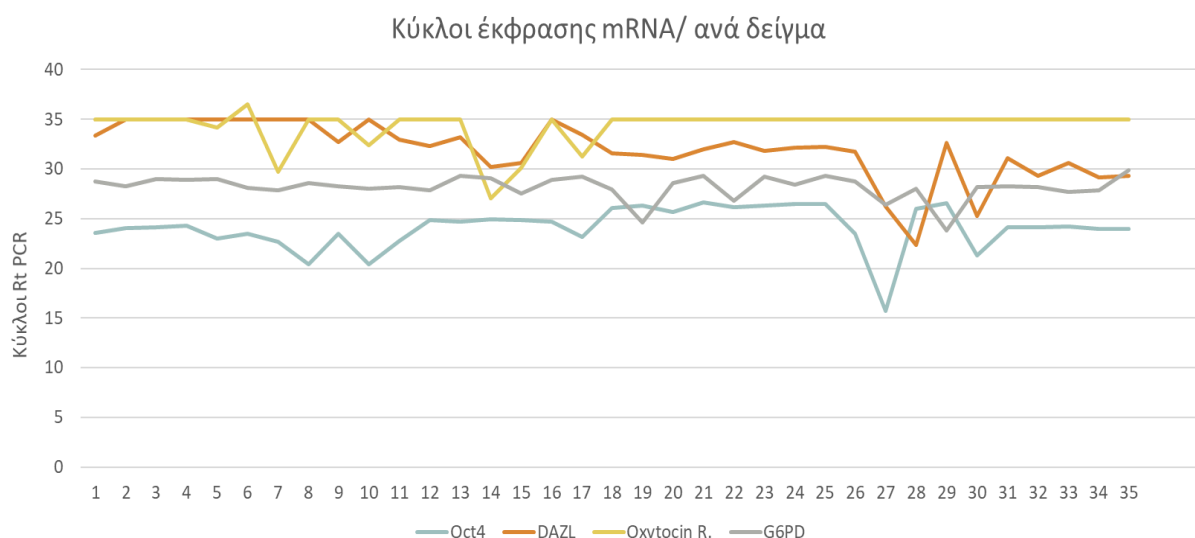
ΔΕΙΓΜΑ	OCT4	DAZL	OXTR	G6PD
1	23,57	33,37	35	28,75
2	24,06	35	35	28,23
3	24,12	35	35	28,96
4	24,32	35	35	28,88
5	23,01	35	34,2	28,99
6	23,46	35	36,51	28,08
7	22,69	35	29,73	27,86
8	20,39	35	35	28,61
9	23,51	32,68	35	28,25
10	20,44	35	32,4	28,02
11	22,74	32,97	35	28,18
12	24,83	32,33	35	27,84
13	24,7	33,23	35	29,3
14	24,93	30,21	27,01	29,1
15	24,84	30,58	30,09	27,5
16	24,69	35	35	28,89
17	23,17	33,45	31,27	29,2
18	26,05	31,6	35	27,91
19	26,31	31,41	35	24,65
20	25,69	31,04	35	28,58
21	26,6	31,98	35	29,32
22	26,13	32,74	35	26,84
23	26,29	31,81	35	29,27
24	26,44	32,18	35	28,41
25	26,48	32,2	35	29,31
26	23,48	31,72	35	28,74
27	15,72	26,2	35	26,4
28	26,02	22,36	35	28,02
29	26,52	32,61	35	23,84
30	21,33	25,25	35	28,19
31	24,13	31,11	35	28,26
32	24,16	29,29	35	28,2
33	24,18	30,6	35	27,71
34	23,97	29,16	35	27,85
35	23,95	29,28	35	29,9
M.O.	24,08343	31,896	34,32029	28,17257

Πίνακας 1.: Τιμές Cp για τα γονίδια Oct4, DAZL, OXTR, καθώς και για το γονίδιο αναφοράς G6PD για κάθε δείγμα

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των Υλικών και Μεθόδων και συγκεκριμένα στο κομμάτι που αφορά στην Real Time PCR η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι η τιμή **Cp (Crossing Point)**, που αντιστοιχεί στον κύκλο εκείνο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων ξεπερνά το βασικό επίπεδο

(baseline) και φθάνει έναν συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Η τιμή Cr είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος. **Αυτό σημαίνει ότι δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο Cr από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα.**

Όπως παρατηρούμε στον πίνακα 1 την μεγαλύτερη έκφραση παρουσιάζει το Oct4 στα υπό μελέτη κύτταρα, με μέσω όρο Cr 24,08. Ακολουθεί το DAZL με μέσω όρο Cr στους 31,89 κύκλους, και ο υποδοχέας της Ωκυτοκίνης με μέσω όρο Cr στους 34,32 κύκλους. Το γονίδιο αναφοράς G6PD εμφανίζει μέσω όρο Cr στους 28,17 κύκλους.



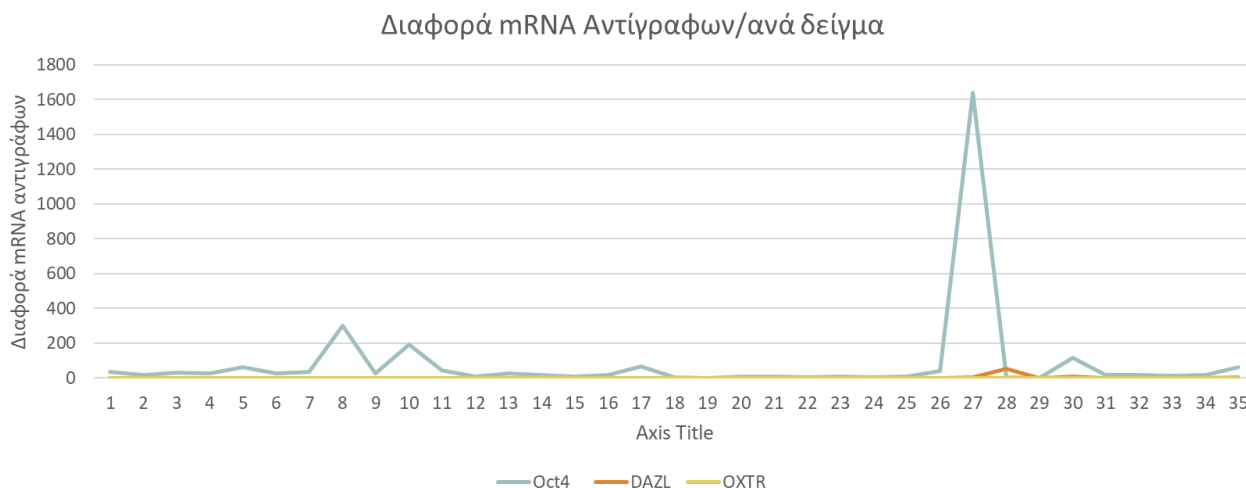
Σχεδιάγραμμα 8.4.: Κύκλοι έκφρασης των γονιδίων Oct4, DAZL, OXTR και του γονιδίου αναφοράς G6PD ανά δείγμα

Στο παραπάνω σχεδιάγραμμα (Σχεδιάγραμμα 8.4) βλέπουμε συγκριτικά τα Cr των τεσσάρων γονιδίων στα 35 δείγματά μας. Και για τα 35 δείγματα είχαμε έκφραση και των τριών γονιδίων υπό μελέτη με πιο πρόωρη αυτή του δείκτη πολυδυναμίας Oct4, μετέπειτα του DAZL και τέλος του OXTR.

Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν στην προσπάθεια μελέτης της έκφρασης των γονιδίων και χαρακτηρισμού του κυτταρικού πληθυσμού που απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και πάλι το G6PD και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 2):

ΔΕΙΓΜΑ	R(OCT4)	R(DAZL)	R(OXYTOCIN)
1	36,25228	0,031	0,013
2	18,00094	0,009	0,009
3	28,6408	0,015	0,015
4	23,58831	0,014	0,014
5	63,11889	0,015	0,027
6	24,59	0,008	0,002
7	36,00187	0,007	0,273
8	298,1718	0,012	0,012
9	26,72281	0,046	0,009
10	191,3407	0,007	0,048
11	43,41134	0,036	0,008
12	8,055644	0,044	0,006
13	24,25147	0,065	0,019
14	18,00094	0,463	4,25
15	6,32033	0,11	0,166
16	18,37917	0,014	0,014
17	65,34478	0,052	0,238
18	3,630077	0,077	0,007
19	0,316439	0,009	0,0007
20	7,412704	0,181	0,011
21	6,588728	0,158	0,019
22	1,635804	0,015	0,003
23	7,889862	0,164	0,018
24	3,917681	0,073	0,01
25	7,110741	0,134	0,019
26	38,31932	0,126	0,013
27	1640,591	1,148	0,002
28	4	50,56	0,007
29	0,156041	0,002	0,0004
30	116,1625	7,67	0,008
31	17,5087	0,138	0,009
32	16,44982	0,403	0,003
33	11,55143	0,134	0,2
34	14,723	0,403	0,013
35	61,81993	1,53	0,029
M.O.	82,57074	1,824943	0,160367

Πίνακας 2.: Τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης της έκφρασης των γονιδίων για τα 35 δείγματα.



Σχεδιάγραμμα 8.5.: Διαφορά αντιγράφων mRNA των υπό μελέτη γονιδίων ως προς το γονίδιο αναφοράς

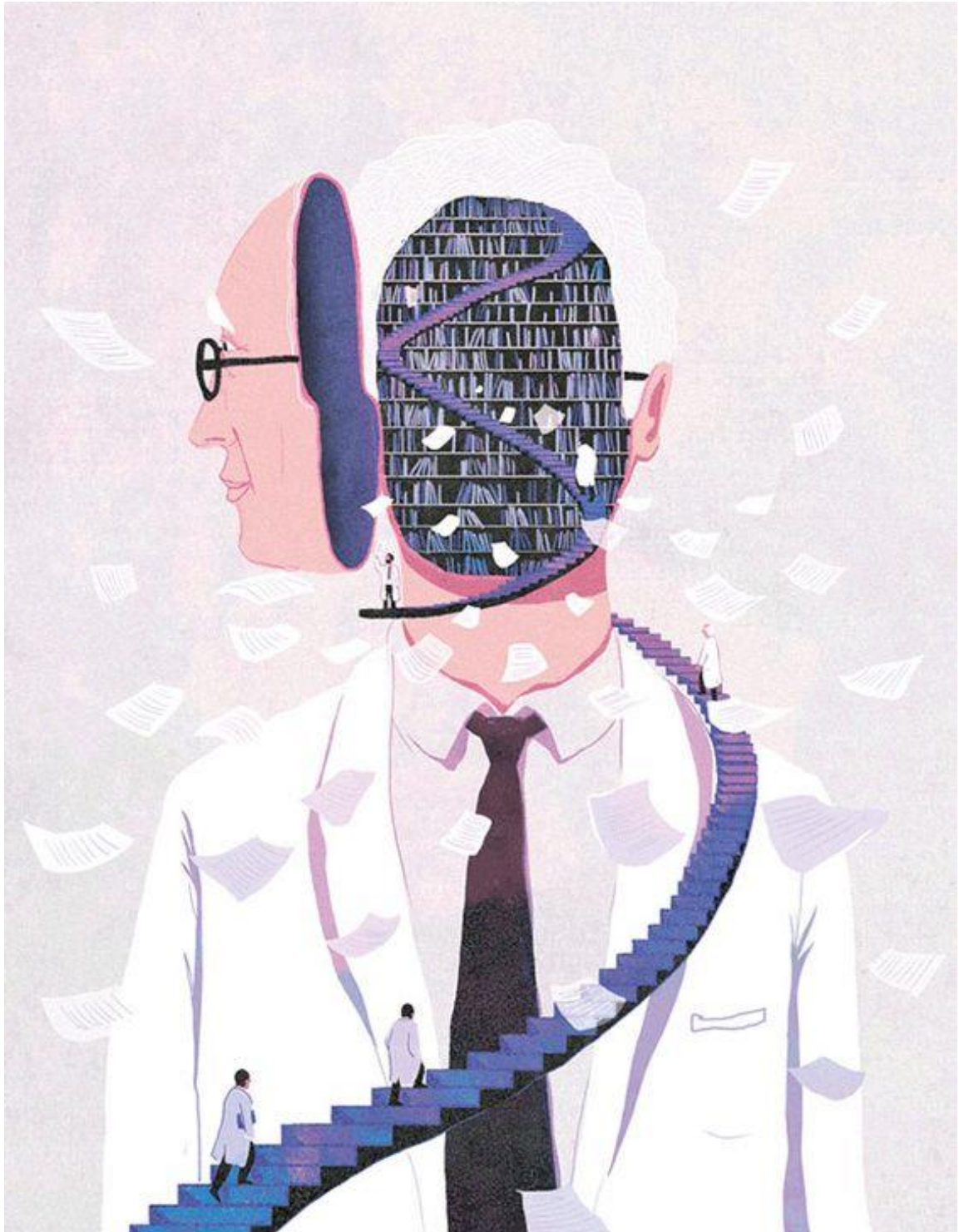
Έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της rt-PCR καταλήξαμε στο παραπάνω σχεδιάγραμμα. Ο τύπος της σχετικής ποσοτικοποίησης μας βοηθά να υπολογίσουμε την διαφορά των mRNA αντιγράφων του γονιδίου υπό μελέτη με το γονίδιο αναφοράς. Ο μέσος όρος της έκφρασης των γονιδίων για τα 35 δείγματα μας είναι:

Για το Oct4 είναι στα 82,57 αντίγραφα σε σχέση με το g6pd

Για το DAZL είναι στα 1,82 αντίγραφα σε σχέση με το g6pd

Για τον υποδοχέα Ωκυτοκίνης είναι στα 0,16 αντίγραφα σε σχέση με το g6pd

- ✓ Η έκφραση του δείκτη πολυδυναμίας Oct4 υποδεικνύει την παρουσία κυττάρων AFSC like cells κατάλληλα για άμεση χρήση στην αναγεννητική ιατρική λόγω έλλειψης ορού ζωικής προέλευσης
- ✓ Η έκφραση του γονιδίου DAZL υποδεικνύει την παρουσία κυττάρων που ομοιάζουν με κύτταρα γεννητικών κυττάρων (germ cell like cells)
- ✓ Οι υποδοχείς οξυτοκίνης εκφράζονται σε αρχικά στάδια ανάπτυξης θηλαστικών, υποδηλώνοντας ότι η ωκυτοκίνη μπορεί να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων στις γενετικές κυτταρικές σειρές στα πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των θηλαστικών.



Δ. Συζήτηση

Η Αναγεννητική ιατρική είναι ένας σχετικά νέος όρος που αφορά τη διεπιστημονική προσέγγιση της διαχείρισης ασθενειών και περιλαμβάνει την καλλιέργεια ιστών και οργάνων, τη βιοϊατρική και τη χρήση τόσο φυσικών όσο και τεχνητών ιστών για την αποκατάσταση, την αναγέννηση καθώς και την ενίσχυση της λειτουργία ιστών ή οργάνων. Η Αναγεννητική Ιατρική βρίσκει πολλές εφαρμογές και στον κλάδο της Μαιευτικής και Γυναικολογίας. (McGee 2011).

Ένας από τους σημαντικότερους στόχους της Αναγεννητικής Ιατρικής είναι η ταυτοποίηση νέων πηγών βλαστικών κυττάρων. Το αμνιακό υγρό περιέχει ποικιλία τύπων κυττάρων που προέρχονται από εμβρυϊκούς ιστούς και μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες (Antonucci et al. 2011). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν εκτεταμένοι υποπληθυσμοί που προέρχονται από κύτταρα του αμνιακού με χαρακτηριστικά αυτοανανέωσης και παρατεταμένου αδιαφοροποίητου πολλαπλασιασμού, τα οποία αποτελούν ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων (Joo et al. 2012).

Αυτά τα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού (hAFSCs) εκφράζουν μεσεγχυματικούς και εμβρυϊκούς δείκτες, και δε σχετίζονται με σχηματισμό όγκου σε πειράματα *in vivo*. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η χρήση τους δεν εγείρει ηθικά ζητήματα, μπορεί να αποτελούν εναλλακτική πηγή βλαστικών κυττάρων για την κυτταρική θεραπεία και την Αναγεννητική Ιατρική (Noronha et al. 2011).

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει την παρουσία ευρέος φάσματος κυτταρικών τύπων διαφορετικής προέλευσης στο ανθρώπινο αμνιακό υγρό, τα οποία φαίνεται πως προκύπτουν από το δέρμα και την πεπτική οδό του αναπτυσσόμενου εμβρύου, καθώς επίσης από την αμνιακή μεμβράνη (Antonucci et al. 2012; 2011).

Στον αντίποδα, έρευνες προτείνουν ότι τα AFSCs μπορεί να έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των πολυδύναμων κυττάρων της επιβλάστης, οδηγώντας την υπόθεση ότι κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης κυτταρικοί πληθυσμοί μεταναστεύουν από τον επibλάστη στο αμνιακό υγρό (Huntriss et al. 2004; Siegel et al. 2007; Pappa and Anagnostou 2009). Παρ'όλα αυτά, μέχρι στιγμής δεν υπάρχει ισχυρή πειραματική απόδειξη που να υποστηρίζει αυτή την υπόθεση, με αποτέλεσμα η συζήτηση για την προέλευση αυτών των κυττάρων παραμένει ανοικτή.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν αυτός ο ετερογενής κυτταρικός πληθυσμός μπορεί να περιέχει κύτταρα που εκφράζουν δείκτες γεννητικών κυττάρων και πολυδυναμίας. Για τον λόγο αυτό αναλύσαμε δείγματα κυττάρων ανθρώπινου αμνιακού υγρού από 35 γυναίκες, μετά από καλλιέργειά τους σε θρεπτικό μέσο SM (Stefanidis medium) και έγινε έλεγχος έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα και δείκτη πολυδυναμίας Oct4, της πρωτεΐνης DAZL και του υποδοχέα της Ωκυτοκίνης. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με Real Time RT-PCR. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε σε μια καινοτόμο τεχνική καλλιέργειας του αμνιακού υγρού, στην οποία ο εμβρυϊκός ορός βοδιού (FBS, fetal bovine serum) αντικαταστάθηκε με ορό αμνιακού υγρού (AFS, amniotic fluid serum), καθώς η χρήση του πρώτου σε ανθρώπινες κυτταρικές καλλιέργειες παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα τόσο από επιστημονική σκοπιά, όσο και από πλευρά βιοασφάλειας καθώς και ηθικών διλημμάτων που έγκειται η χρήση τους. Το AFS μας παρέχει ασφαλή και άμεση χρήση των κυττάρων αυτών σε κλινική εφαρμογή, λόγω της ανθρώπινης προέλευσης και της αυτόλογης χρήσης του.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4 εκφράζεται σε παντοδύναμα εμβρυϊκά στελέχη και γεννητικά κύτταρα ποντικού και ανθρώπου. Όλες οι κυτταρικές σειρές πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων στα θηλαστικά -κύτταρα εμβρυϊκού καρκινώματος (ES), εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ES) και εμβρυϊκών γεννητικών κυττάρων (EG)- έχει βρεθεί ότι εκφράζουν τον Oct4, η έκφραση του οποίου σταματάει με τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Κατά συνέπεια, ο Oct4 αποτελεί αδιαμφισβήτητα δείκτη πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (Pesce and Schöler 2000; Donovan 2001).

Η πολυδυναμία και η δυνατότητα αυτοανανέωσης αποτελούν δύο από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ESC, embryonic stem cells) (Nichols et al. 1998b). Ο Oct4 έχει βρεθεί ότι είναι ο βασικός ρυθμιστής αυτής της διαδικασίας. Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι παίζει καθοριστικό ρόλο και στα βλαστικά κύτταρα ενηλίκων (ASC, adult stem cells) (Tai et al. 2005; Pochampally et al. 2004). Προηγούμενες μελέτες καταδεικνύουν ότι ο Oct4 συμβάλει καθοριστικά στην επαγωγή πολυδυναμίας όπως φαίνεται από την ικανότητά του να επαναπρογραμματίζει σωματικά κύτταρα σε iPS, είτε μόνο (J. B. Kim, Greber, et al. 2009; J. B. Kim, Sebastiano, et al. 2009) του είτε σε συνεργασία με άλλους παράγοντες (Takahashi et al. 2007; Park et al. 2008). Σύμφωνα με τον Donovan “Αν θέλουμε έναν δείκτη πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, τίποτα δεν θα πήγαινε πολύ λάθος αν χρησιμοποιούσαμε τον μεταγραφικό παράγοντα Oct4” (Donovan, 2001).

Μετά απο ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real Time RT-PCR, αποδείχθηκε ότι τα δείγματα και από τις 35 γυναίκες χαρακτηρίζονταν από πολύ υψηλή έκφραση του δείκτη Oct4. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν έκφραση του Oct4 στο αμνιακό υγρό. Τα κύτταρα του αμνιακού υγρού έχει αποδειχθεί ότι εκφράζουν τον δείκτη Oct4 (Stefanidis, Loutradis, Koumbi, et al. 2008; Prusa and Hengstschlager 2002; Prusa et al. 2003a; Tsai et al. 2004). Η έκφραση αυτή μαρτυρά χαρακτηριστικά των κυττάρων αυτών ίδιον με των βλαστικών κυττάρων. Και συγκεκριμένα των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSC, Mesenchymal stem cells).

Οι εφαρμογές των πολυδύναμων κυττάρων είναι πολλές. Ειδικά όμως στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή βρίσκουν χρήση και στο κομμάτι της ενδομητρίωσης. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC) μελετώνται ως πιθανή θεραπεία για την ενδομητρίωση. Οι έρευνες εστιάζουν στο να προσδιορίσουν την επίδραση των MSCs στα χαρακτηριστικά και τις λειτουργίες των ενδομητριοτικών επιθηλιακών κυττάρων (Q. Shi et al. 2017) και των ενδομητριοτικών στρωματικών κυττάρων (ESCs) (Abomaray 2018) με στόχο την μείωση της φλεγμονής και την μείωση της στειρότητας στους ασθενείς με ενδομητρίωση.

Στα θηλαστικά, η κυτταρική σειρά των γαμετικών κυττάρων διαμορφώνεται νωρίς κατά την ανάπτυξη από τα αρχέγονα γεννητικά κυττάρά (PGC). Τα PGCs μεταναστεύουν στις γονάδες και τα γεννητικά κύτταρα των γονάδων στις ώριμες ωοθήκες και τους όρχεις όπου και υποβάλλονται σε διαδικασίες αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης και μείωσης, με τελικό στάδιο την παραγωγή ώριμων ωοκυττάρων και σπερματοζωαρίων (Wylie 1999). Ανωμαλίες σε οποιαδήποτε από αυτά τα στάδια συνεπάγεται υπογονιμότητα ή και στειρότητα.

Το DAZL είναι μια πρωτεΐνη που είναι φυσικά εντοπισμένη στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των πρόδρομων γεννητικών κυττάρων (PGCs, primordial germ cells) και στο κυτταρόπλασμα των αναπτυσσόμενων ωοκυττάρων (Brook, Smith, and Gray 2009). Κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, τα PGCs εκφράζουν το γονίδιο Dazl, το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνες δέσμησης RNA που απαιτούνται για την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων (GS, germ cells) σε διάφορους οργανισμούς (Xu, Moore, and Pera 2001). Ο Collieret και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ενεργοποιεί συγκεκριμένα την έναρξη της διαδικασίας της μετάφρασης (Collier et al. 2005a).

Η οικογένεια των γονιδίων DAZ κωδικοποιεί πρωτεΐνες δέσμησης του RNA που εκφράζονται σε αρσενικά και θηλυκά προγεννητικά και μεταγεννητικά βλαστικά κύτταρα

(Saxena et al. 1996; Judith Seligman and Page 1998). Αυτό το πρότυπο έκφρασης υποδηλώνει ότι αυτά τα γονίδια συμμετέχουν στα πρώιμα στάδια του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της διατήρησης των αρσενικών και θηλυκών γεννητικών κυττάρων (Collier et al. 2005b; Hasegawa et al. 2006; Moore et al. 2004). Ο παράγοντας Dazl έχει αποδειχτεί ότι απαιτείται σε διάφορα είδη για ανάπτυξη γεννητικών κυττάρων (Eberhart, Maines, and Wasserman 1996; Saunders et al. 2003; Haston, Tung, and Reijo Pera 2009; R. A. Reijo et al. 2000; R. Reijo et al. 1996; Cooke et al. 1996; Lin and Page 2005b). Πράγματι, διαταραχή στην έκφραση του Dazl σε επίμυες οδηγεί σε απώλεια γεννητικών κυττάρων στις γονάδες και των δύο φύλων (R. Reijo et al. 1996). Οι Lin και Page το 2005 αναφέρουν φαινότυπο μεταλλαγμένων εμβρύων αρσενικών ποντικών προγεννητικά, απουσία λειτουργίας Dazl, να παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό απόπτωσης των γεννητικών κυττάρων, μειωμένη έκφραση δεικτών γεννητικών κυττάρων και διαμόρφωση χρωματίνης χαρακτηριστική των ανώριμων γεννητικών κυττάρων (Lin and Page 2005b).

Κάνοντας ανασκόπηση στη βιβλιογραφία παρατηρούμε χρήση του Dazl ως δείκτη ανάπτυξης γεννητικών κυττάρων, αλλά και ως δείκτη της πορείας διαφοροποίησης τους σε ποντικό και άνθρωπο *in vitro* σε πλήθος ερευνών (Hübner et al. 2003; Geijsen et al. 2004; Toyooka et al. 2003; Teramura et al. 2007; Kee et al. 2009; 2006; Clark et al. 2004).

Στη συγκεκριμένη μελέτη μετά απο ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real Time RT-PCR, αποδείχθηκε ότι τα δείγματα και από τις 35 γυναίκες χαρακτηρίζονταν από σημαντική έκφραση του δείκτη DAZL. Η έκφραση του γονιδίου DAZL υποδεικνύει την παρουσία κυττάρων που ομοιάζουν με κύτταρα γεννητικών κυττάρων (germ cell like cells), κατάλληλα για άμεση χρήση στην αναγεννητική ιατρική λόγω έλλειψης ορού ζωικής προέλευσης. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν έκφραση του DAZL στο αμνιακό υγρό (Stefanidis, Loutradis, Koumbi, et al. 2008; Antonucci et al. 2014; Borlongan 2017; Stefanidis et al. 2013).

Η *in vitro* παραγωγή λειτουργικών γαμετών από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα ειδικά για τον ασθενή θα προσφέρει νέες προοπτικές γονιμότητας σε ασθενείς που αντιμετωπίζουν πλήρη στειρότητα. Εκτός όμως απο τις θεραπευτικές δυνατότητες θα μας παρέχει και ένα σύστημα μελέτης *in vitro* της γαμετογένεσης, το οποίο θα μπορούσε να ενισχύσει την κατανόηση των μηχανισμών της ωρίμανσης και της διαφοροποίησης των γεννητικών κυττάρων (GS, germ cells). Η απόκτηση αρσενικών και θηλυκών γαμετών αποτελεί σημαντικό μέρος των σύγχρονων τεχνικών γονιμότητας. Η καλλιέργεια και ο χειρισμός γεννητικών κυττάρων είναι κρίσιμος για επιτυχείς θεραπείες γονιμότητας. Αν και οι Τεχνικές

υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART, artificial reproductive technologies) χρησιμοποιούνται από το 1978 και τη γέννηση της Louise Brown από τους Steptoe και Edwards, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί και συνέπειες της in vitro γονιμοποίησης (IVF).

Πρόσφατες εργασίες αποδεικνύουν ότι βλαστικά κύτταρα που παράγουν ωκύτταρα (OSCs) υπάρχουν και μπορούν να απομονωθούν από ωοθήκες ενήλικων ψαριών (Nakamura et al. 2010; White, Woods, and Wood 2011), ποντικών (Johnson et al. 2004; Zou et al. 2009) ακόμη και από ανθρώπους (Telfer and Albertini 2012; White et al. 2012). Τα δεδομένα αυτά έχουν οδηγήσει σε νέες ιδέες για τα αναπαραγωγικά βιολογικά ρολόγια (Woods, Telfer, and Tilly 2012). Παρόλο που πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν κάνει προσπάθειες να επαναλάβουν και να επάληθεύσουν αυτή την υπόθεση, κάτι τέτοιο δεν έχει επιτευχθεί μέχρι στιγμής. Η έκφραση του γονιδίου DAZL στην έρευνά μας αποτελεί μια νέα προοπτική για την παραγωγή γεννητικών κυττάρων και χρήση τους στην Αναπαραγωγική Ιατρική.

Η ωκυτοκίνη είναι ένα μικρό νανοπεπτίδιο που είναι γνωστό για το ρόλο του στην αναπαραγωγή (Kiss and Mikkelsen 2005; Thackare, Nicholson, and Whittington 2006). Υποδοχείς της Ωκυτοκίνης εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο μυομήτριο και το ενδομήτριο, στην καρδιά, το ήπαρ, το νεφρό καθώς και τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα σε μαστό και όρχεις (Zhang et al. 2007).

Ο ρόλος της ωκυτοκίνης στην αναπαραγωγική λειτουργία της γυναίκας θεωρείται αδιαμφισβήτητος, όμως δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Παρ' όλο που η ωκυτοκίνη ανακαλύφθηκε το 1909 από τον Henry Dale, ο οποίος και διαπίστωσε την συσταλτική επίδραση που προκαλεί στα κύτταρα του ενδομητρίου, μόνο πρόσφατα ερευνήθηκε το σύστημα OT-OTR (OT-OXTR, Ωκυτοκίνης-Υποδοχέα Ωκυτοκίνης) σε σχέση με την εγκαθίδρυση της εγκυμοσύνης και την ικανότητα του εμβρύου να εμφυτευτεί στην μήτρα.

Ο Μπερέτσος και η ομάδα του μελέτησαν την έκφραση του συστήματος OT-OTR σε ιστούς της μήτρας ποντικίου, κατά τις πρώτες μέρες τη εγκυμοσύνης. Στη συγκεκριμένη έρευνα ανιχνεύτηκε ο υποδοχέας OTR στα ωκύτταρα και στα έμβρυα ποντικίου μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης (Beretsos et al. 2006). Σε παρόμοια έρευνα παρατηρήθηκε αρνητική ρύθμιση του υποδοχέα OTR στην περιοχή του ενδομητρίου που επικάθεται το έμβρυο για να εμφυτευτεί (Fanchin 2001).

Ο ρόλος της ωκυτοκίνης κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης δεν περιορίζεται μόνο στη ρύθμιση της συσταλτικότητας της μήτρας. Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ότι η ωκυτοκίνη εμπλέκεται στη διαδικασία πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων (Cassoni et al. 2004), όπως επίσης και στη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων των ποντικών σε κύτταρα του μυοκαρδίου (Paquin et al. 2002).

Στη συγκεκριμένη μελέτη μετά απο ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real Time RT-PCR, αποδείχθηκε ότι τα δείγματα και από τις 35 γυναίκες χαρακτηρίζονταν από έκφραση του υποδοχέα της Ωκυτοκίνης. Τέλος και ο τελευταίος δείκτης που μελετήθηκε έρχεται σε συμφωνία με τις μέχρι τώρα έρευνες. Η έκφραση του δείκτη πολυδυναμίας Oct4 υποδεικνύει την παρουσία κυττάρων με χαρακτηριστικά πολυδυναμίας. Η συσχέτιση του OT-OXTR συστήματος με διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός θα μπορούσε να ερμηνεύσει την θετική ρύθμιση του υποδοχέα και την αύξηση της συγκέντρωσης της Ωκυτοκίνης στο ενδομήτριο κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, τα οποία περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης, την ανάπτυξη του πλακούντα και των εμβρυϊκών αγγείων.

Ο Στεφανίδης και οι συνεργάτες πρώτοι μελέτησαν την έκφραση του υποδοχέα της Ωκυτοκίνης στα κύτταρα του αμνιακού υγρού (Stefanidis, Loutradis, Anastasiadou, et al. 2008). Τα ευρήματα τους έδειξαν ότι τα κύτταρα του αμνιακού υγρού εκφράζουν τόσο τον υποδοχέα OXTR όσο και τον δείκτη Oct4. Οι υποδοχείς Ωκυτοκίνης εκφράζονται σε αρχικά στάδια ανάπτυξης θηλαστικών, υποδηλώνοντας ότι η ωκυτοκίνη μπορεί να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων στις γενετικές κυτταρικές σειρές στα πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των θηλαστικών.

Συνοψίζοντας, η επιλογή των συγκεκριμένων δεικτών που μελετήθηκαν έγινε με σκοπό τον χαρακτηρισμό και την περαιτέρω διερεύνηση των κυττάρων του αμνιακού υγρού που λίγα είναι γνωστά για την προέλευση και τις ιδιότητες τους. Οι ενδείξεις παρουσίας κυττάρων εμβρυϊκής προέλευσης και των τριών βλαστικών στοιβάδων στο αμνιακό υγρό (Stefanidis, Loutradis, Koumbi, et al. 2008; Hoehn and Salk 1982; Gosden 1983; Prusa and Hengstschlager 2002; Milunsky 1979) μας οδήγησε στον έλεγχο δεικτών άρρηκτα συνδεδεμένων με τις διαδικασίες της πολυδυναμίας (Oct4) και της ανάπτυξης και διαφοροποίησης γεννητικών κυττάρων (DAZL, υποδοχέας Ωκυτοκίνης). Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων αυτών στο αμνιακό υγρό με RT-PCR (ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου), συνεπώς τα αποτελέσματά μας έρχονται να ενισχύσουν τα μέχρι τώρα δεδομένα. Συμπερασματικά, τα κύτταρα του αμνιακού θα

μπορούσαν να αποτελούν μία εναλλακτική πηγή πολυδύναμων κυττάρων που χαρακτηρίζονται από ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης και πλαστικότητας, ιδιότητες που τα καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικά εργαλεία σε εφαρμογές της Αναγεννητικής Ιατρικής, της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, της Γαμετογένεσης και της Αναπαραγωγικής Βιολογίας.

Η απόκτηση αρσενικών και θηλυκών γαμετών αποτελεί σημαντικό μέρος των σύγχρονων τεχνικών γονιμότητας. Η καλλιέργεια και ο χειρισμός των γεννητικών κυττάρων είναι κρίσιμα για επιτυχείς θεραπείες γονιμότητας. Βελτίωση μικροκαλλιέργειας γαμετών και διευκόλυνση σωστής επιλογής υγιών γεννητικών κυττάρων ενδέχεται να είναι η λύση σε μερικούς από τους περιορισμούς και τις συνέπειες της εξωσωματικής γονιμοποίησης στο μέλλον.

E. Βιβλιογραφία

- Abomaray, Fawaz. 2018. *Exploring the Role of Mesenchymal Stromal Cells in Endometriosis*. Inst för klinisk vetenskap, intervention och teknik / Dept of Clinical Science, Intervention and Technology. <http://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/46516>.
- Antonucci, Ivana, Roberta Di Pietro, Melissa Alfonsi, Maria Antonietta Centurione, Lucia Centurione, Silvia Sancilio, Francesca Pelagatti, et al. 2014. "Human Second Trimester Amniotic Fluid Cells Are Able to Create Embryoid Body-Like Structures in Vitro and to Show Typical Expression Profiles of Embryonic and Primordial Germ Cells." *Cell Transplantation* 23 (12): 1501–15. <https://doi.org/10.3727/096368914X678553>.
- Antonucci, Ivana, Andrea Pantalone, Stefano Tete, Vincenzo Salini, Cesar V. Borlongan, David Hess, and Liborio Stuppia. 2012. "Amniotic Fluid Stem Cells: A Promising Therapeutic Resource for Cell-Based Regenerative Therapy." *Current Pharmaceutical Design* 18 (13): 1846–63. <https://doi.org/10.2174/138161212799859602>.
- Antonucci, Ivana, Liborio Stuppia, Yuji Kaneko, Seongjin Yu, Naoki Tajiri, Eunkyung C. Bae, Sonia H. Chheda, Nathan L. Weinbren, and Cesar V. Borlongan. 2011. "Amniotic Fluid as a Rich Source of Mesenchymal Stromal Cells for Transplantation Therapy." *Cell Transplantation* 20 (6): 789–95. <https://doi.org/10.3727/096368910X539074>.
- Aula, P., H. von Koskull, K. Teramo, O. Karjalainen, I. Virtanen, V. P. Lehto, and D. Dahl. 1980. "Glial Origin of Rapidly Adhering Amniotic Fluid Cells." *British Medical Journal* 281 (6253): 1456–57. <https://doi.org/10.1136/bmj.281.6253.1456>.
- Baal, Nelli, Kerstin Reisinger, Henning Jahr, Rainer M. Bohle, Olin Liang, Karsten Münstedt, C. V. Rao, Klaus T. Preissner, and Marek T. Zygmunt. 2004. "Expression of Transcription Factor Oct-4 and Other Embryonic Genes in CD133 Positive Cells from Human Umbilical Cord Blood." *Thrombosis and Haemostasis* 92 (4): 767–75. <https://doi.org/10.1160/TH04-02-0079>.
- Baksh, D., L. Song, and R. S. Tuan. 2004. "Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8 (3): 301–16. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x>.
- Battula, Venkata Lokesh, Petra M. Bareiss, Sabrina Treml, Sabine Conrad, Ingrid Albert, Sigrid Hojak, Harald Abele, et al. 2007. "Human Placenta and Bone Marrow Derived MSC Cultured in Serum-Free, b-FGF-Containing Medium Express Cell Surface Frizzled-9 and SSEA-4 and Give Rise to Multilineage Differentiation." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 75 (4): 279–91. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00139.x>.
- Beretsos, Panagiotis, Dimitris Loutradis, Stauros Koussoulakos, Loukas H. Margaritis, Erasmia Kiapekou, George Mastorakos, Irini Papaspirou, Nikolaos Makris, Antonis Makrigiannakis, and Aris Antsaklis. 2006. "Oxytocin Receptor Is Differentially Expressed in Mouse Endometrium and Embryo during Blastocyst Implantation." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092 (December): 466–79. <https://doi.org/10.1196/annals.1365.046>.
- Bitsika, Vasiliki, Maria G. Roubelakis, Dimitra Zagoura, Ourania Trohatou, Manousos Makridakis, Kalliopi I. Pappa, Frank C. Marini, Antonia Vlahou, and Nicholas P. Anagnostou. 2012. "Human Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Vehicles: A Novel Approach for the Treatment of Bladder Cancer." *Stem Cells and Development* 21 (7): 1097–1111. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0151>.
- Bollini, Sveva, Michela Pozzobon, Muriel Nobles, Johannes Riegler, Xuebin Dong, Martina Piccoli, Angela Chiavegato, et al. 2011. "In Vitro and in Vivo Cardiomyogenic Differentiation of Amniotic Fluid Stem Cells." *Stem Cell Reviews and Reports* 7 (2): 364–80. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9200-z>.
- Borlongan, Cesar V. 2017. "Amniotic Fluid as a Source of Engraftable Stem Cells." *Brain Circulation* 3 (3): 175. https://doi.org/10.4103/bc.bc_24_17.

- Brekhman, V., J. Itskovitz-Eldor, E. Yodko, M. Deutsch, and J. Seligman. 2000. "The DAZL1 Gene Is Expressed in Human Male and Female Embryonic Gonads before Meiosis." *Molecular Human Reproduction* 6 (5): 465–68. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.5.465>.
- Brook, Matthew, Joel W S Smith, and Nicola K Gray. 2009. "The DAZL and PABP Families: RNA-Binding Proteins with Interrelated Roles in Translational Control in Oocytes." *REPRODUCTION* 137 (4): 595–617. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0524>.
- Brooke, Gary, Hui Tong, Jean-Pierre Levesque, and Kerry Atkinson. 2008. "Molecular Trafficking Mechanisms of Multipotent Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Placenta." *Stem Cells and Development* 17 (5): 929–40. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0156>.
- Broxmeyer, H. E., G. W. Douglas, G. Hangoc, S. Cooper, J. Bard, D. English, M. Arny, L. Thomas, and E. A. Boyse. 1989. "Human Umbilical Cord Blood as a Potential Source of Transplantable Hematopoietic Stem/Progenitor Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (10): 3828–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3828>.
- Buckingham, Margaret, Sigolène Meilhac, and Stéphane Zaffran. 2005. "Building the Mammalian Heart from Two Sources of Myocardial Cells." *Nature Reviews. Genetics* 6 (11): 826–35. <https://doi.org/10.1038/nrg1710>.
- Cananzi, Mara, Anthony Atala, and Paolo De Coppi. 2009. "Stem Cells Derived from Amniotic Fluid: New Potentials in Regenerative Medicine." *Reproductive Biomedicine Online* 18 Suppl 1: 17–27.
- Cassoni, P., A. Sapino, T. Marrocco, B. Chini, and G. Bussolati. 2004. "Oxytocin and Oxytocin Receptors in Cancer Cells and Proliferation." *Journal of Neuroendocrinology* 16 (4): 362–64. <https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01165.x>.
- Castrillon, D. H., P. Gönczy, S. Alexander, R. Rawson, C. G. Eberhart, S. Viswanathan, S. DiNardo, and S. A. Wasserman. 1993. "Toward a Molecular Genetic Analysis of Spermatogenesis in *Drosophila Melanogaster*: Characterization of Male-Sterile Mutants Generated by Single P Element Mutagenesis." *Genetics* 135 (2): 489–505.
- Cauffman, G., H. Van de Velde, I. Liebaers, and A. Van Steirteghem. 2005. "DAZL Expression in Human Oocytes, Preimplantation Embryos and Embryonic Stem Cells." *Molecular Human Reproduction* 11 (6): 405–11. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah167>.
- Chambers, Ian, Jose Silva, Douglas Colby, Jennifer Nichols, Bianca Nijmeijer, Morag Robertson, Jan Vrana, Ken Jones, Lars Grotewold, and Austin Smith. 2007. "Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development." *Nature* 450 (7173): 1230–34. <https://doi.org/10.1038/nature06403>.
- Chang, Chia-Ming, Chung-Lan Kao, Yuh-Lih Chang, Ming-Jie Yang, Yu-Chih Chen, Bi-Lin Sung, Tung-Hu Tsai, Kuan-Chong Chao, Shih-Hwa Chiou, and Hung-Hai Ku. 2007. "Placenta-Derived Multipotent Stem Cells Induced to Differentiate into Insulin-Positive Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357 (2): 414–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.157>.
- Chang, Yu-Jen, Daniel Tzu-bi Shih, Ching-Ping Tseng, Tzu-Bou Hsieh, Don-Ching Lee, and Shiaw-Min Hwang. 2006. "Disparate Mesenchyme-Lineage Tendencies in Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Umbilical Cord Blood." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (3): 679–85. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0308>.
- Chen, Jing, Collin Melton, Nayoung Suh, Jeong Su Oh, Kathleen Horner, Fang Xie, Claudio Sette, Robert Blelloch, and Marco Conti. 2011. "Genome-Wide Analysis of Translation Reveals a Critical Role for Deleted in Azoospermia-like (Dazl) at the Oocyte-to-Zygote Transition." *Genes & Development* 25 (7): 755–66. <https://doi.org/10.1101/gad.2028911>.
- Chew, Joon-Lin, Yuin-Han Loh, Wensheng Zhang, Xi Chen, Wai-Leong Tam, Leng-Siew Yeap, Pin Li, et al. 2005. "Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2

- Complex in Embryonic Stem Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 25 (14): 6031–46. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005>.
- Chibbar, R., F. D. Miller, and B. F. Mitchell. 1993. “Synthesis of Oxytocin in Amnion, Chorion, and Decidua May Influence the Timing of Human Parturition.” *The Journal of Clinical Investigation* 91 (1): 185–92. <https://doi.org/10.1172/JCI116169>.
- Chien, Chih-Cheng, Betty Linju Yen, Fa-Kung Lee, Tsung-Hsuan Lai, Yao-Chang Chen, Shu-Hui Chan, and Hsing-I. Huang. 2006. “In Vitro Differentiation of Human Placenta-Derived Multipotent Cells into Hepatocyte-like Cells.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (7): 1759–68. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0521>.
- Cipriani, Sabrina, Daniela Bonini, Eleonora Marchina, Ioanna Balgouranidou, Luigi Caimi, Gigliola Grassi Zucconi, and Sergio Barlati. 2007. “Mesenchymal Cells from Human Amniotic Fluid Survive and Migrate after Transplantation into Adult Rat Brain.” *Cell Biology International* 31 (8): 845–50. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.01.037>.
- Clark, Amander T., Megan S. Bodnar, Mark Fox, Ryan T. Rodriguez, Michael J. Abeyta, Meri T. Firpo, and Renee A. Reijo Pera. 2004. “Spontaneous Differentiation of Germ Cells from Human Embryonic Stem Cells in Vitro.” *Human Molecular Genetics* 13 (7): 727–39. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh088>.
- Collier, Brian, Barbara Gorgoni, Carolyn Loveridge, Howard J Cooke, and Nicola K Gray. 2005a. “The DAZL Family Proteins Are PABP-Binding Proteins That Regulate Translation in Germ Cells.” *The EMBO Journal* 24 (14): 2656–66. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600738>.
- . 2005b. “The DAZL Family Proteins Are PABP-Binding Proteins That Regulate Translation in Germ Cells.” *The EMBO Journal* 24 (14): 2656–66. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600738>.
- Conconi, Maria Teresa, Patrizia Burra, Rosa Di Liddo, Chiara Calore, Michela Turetta, Silvia Bellini, Patrizio Bo, Gastone G. Nussdorfer, and Pier Paolo Parnigotto. 2006. “CD105(+) Cells from Wharton’s Jelly Show in Vitro and in Vivo Myogenic Differentiative Potential.” *International Journal of Molecular Medicine* 18 (6): 1089–96.
- Cooke, Howard J., Muriel Lee, Shona Kerr, and Matteo Ruggiu. 1996. “A Murine Homologue of the Human Daz Gene Is Autosomal and Expressed Only in Male and Female Gonads.” *Human Molecular Genetics* 5 (4): 513–16. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.4.513>.
- Coucouvanis, E., and G. R. Martin. 1999. “BMP Signaling Plays a Role in Visceral Endoderm Differentiation and Cavitation in the Early Mouse Embryo.” *Development (Cambridge, England)* 126 (3): 535–46.
- Dawood, M. Y., and F. S. Khan-Dawood. 1986. “Human Ovarian Oxytocin: Its Source and Relationship to Steroid Hormones.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 154 (4): 756–63. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(86\)90450-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(86)90450-3).
- De Coppi, Paolo, Georg Bartsch, M. Minhaj Siddiqui, Tao Xu, Cesar C. Santos, Laura Perin, Gustavo Mostoslavsky, et al. 2007. “Isolation of Amniotic Stem Cell Lines with Potential for Therapy.” *Nature Biotechnology* 25 (1): 100–106. <https://doi.org/10.1038/nbt1274>.
- De Coppi, Paolo, Andrea Callegari, Angela Chiavegato, Lisa Gasparotto, Martina Piccoli, Jenny Taiani, Michela Pozzobon, et al. 2007. “Amniotic Fluid and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Can Be Converted to Smooth Muscle Cells in the Cryo-Injured Rat Bladder and Prevent Compensatory Hypertrophy of Surviving Smooth Muscle Cells.” *The Journal of Urology* 177 (1): 369–76. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.09.103>.
- Delo, Dawn M., Paolo De Coppi, Georg Bartsch, and Anthony Atala. 2006. “Amniotic Fluid and Placental Stem Cells.” *Methods in Enzymology* 419: 426–38. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19017-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19017-5).
- Devine, S. M., and R. Hoffman. 2000. “Role of Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation.” *Current Opinion in Hematology* 7 (6): 358–63.
- “Differential Ability of Somatic Stem Cells. - PubMed - NCBI.” n.d. Accessed August 23, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775520>.

- Ding, Dah-Ching, Woei-Cherng Shyu, and Shinn-Zong Lin. 2011. "Mesenchymal Stem Cells." *Cell Transplantation* 20 (1): 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>.
- Ditadi, Andrea, Paolo de Coppi, Olivier Picone, Laetitia Gautreau, Rim Smati, Emmanuelle Six, Delphine Bonhomme, et al. 2009. "Human and Murine Amniotic Fluid C-Kit+Lin- Cells Display Hematopoietic Activity." *Blood* 113 (17): 3953–60. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-182105>.
- Donovan, Peter J. 2001. "High Oct -Ane Fuel Powers the Stem Cell." *Nature Genetics* 29 (3): 246–47. <https://doi.org/10.1038/ng1101-246>.
- Dorfman, D. M., D. R. Genest, and R. A. Reijo Pera. 1999. "Human DAZL1 Encodes a Candidate Fertility Factor in Women That Localizes to the Prenatal and Postnatal Germ Cells." *Human Reproduction (Oxford, England)* 14 (10): 2531–36. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.10.2531>.
- Eberhart, C. G., J. Z. Maines, and S. A. Wasserman. 1996. "Meiotic Cell Cycle Requirement for a Fly Homologue of Human Deleted in Azoospermia." *Nature* 381 (6585): 783–85. <https://doi.org/10.1038/381783a0>.
- Fanchin, R. 2001. "Assessing Uterine Receptivity in 2001: Ultrasonographic Glances at the New Millennium." *Annals of the New York Academy of Sciences* 943 (September): 185–202. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03802.x>.
- Fleischman, R. A. 1993. "From White Spots to Stem Cells: The Role of the Kit Receptor in Mammalian Development." *Trends in Genetics: TIG* 9 (8): 285–90.
- Fridenshtein, A. Ia, I. I. Piatetskii-Shapiro, and K. V. Petrakova. 1969. "[Osteogenesis in transplants of bone marrow cells]." *Arkhir Anatomii, Gistologii I Embriologii* 56 (3): 3–11.
- Fu, Xia-Fei, Shun-Feng Cheng, Lin-Qing Wang, Shen Yin, Massimo De Felici, and Wei Shen. 2015. "DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development." *International Journal of Biological Sciences* 11 (10): 1226–35. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11536>.
- Fu, Yu-Show, Yun-Chih Cheng, Maan-Yuh Anya Lin, Henrich Cheng, Pei-Ming Chu, Shih-Chich Chou, Yang-Hsin Shih, Miao-Hwa Ko, and Min-Shan Sung. 2006. "Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons in Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (1): 115–24. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0053>.
- Fuchs, Julie R., Amir Kaviani, Jung-Tak Oh, David LaVan, Tatro Udagawa, Russell W. Jennings, Jay M. Wilson, and Dario O. Fauza. 2004. "Diaphragmatic Reconstruction with Autologous Tendon Engineered from Mesenchymal Amniocytes." *Journal of Pediatric Surgery* 39 (6): 834–38; discussion 834-838. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.02.014>.
- Fukuchi, Yumi, Hideaki Nakajima, Daisuke Sugiyama, Imiko Hirose, Toshio Kitamura, and Kohichiro Tsuji. 2004. "Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22 (5): 649–58. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-649>.
- Furuya, K., Y. Mizumoto, N. Makimura, C. Mitsui, M. Murakami, S. Tokuoka, N. Ishikawa, E. Imaizumi, E. Katayama, and K. Seki. 1995. "Gene Expressions of Oxytocin and Oxytocin Receptor in Cumulus Cells of Human Ovary." *Hormone Research* 44 Suppl 2: 47–49. <https://doi.org/10.1159/000184661>.
- Geijsen, Niels, Melissa Horoschak, Kitai Kim, Joost Gribnau, Kevin Eggan, and George Q. Daley. 2004. "Derivation of Embryonic Germ Cells and Male Gametes from Embryonic Stem Cells." *Nature* 427 (6970): 148–54. <https://doi.org/10.1038/nature02247>.
- Gill, Mark E., Yueh-Chiang Hu, Yanfeng Lin, and David C. Page. 2011. "Licensing of Gametogenesis, Dependent on RNA Binding Protein DAZL, as a Gateway to Sexual Differentiation of Fetal Germ Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (18): 7443–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104501108>.

- Gimpl, G., and F. Fahrenholz. 2001. "The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation." *Physiological Reviews* 81 (2): 629–83.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629>.
- Gosden, C. M. 1983. "Amniotic Fluid Cell Types and Culture." *British Medical Bulletin* 39 (4): 348–54. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071847>.
- Grisafi, Davide, Martina Piccoli, Michela Pozzobon, Andrea Ditadi, Patrizia Zaramella, Lino Chiandetti, Giovanni Franco Zanon, et al. 2008. "High Transduction Efficiency of Human Amniotic Fluid Stem Cells Mediated by Adenovirus Vectors." *Stem Cells and Development* 17 (5): 953–62. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0188>.
- Guo, Ying, Charlie Mantel, Robert A. Hromas, and Hal E. Broxmeyer. 2008. "Oct 4 Is Critical for Survival/Antiapoptosis of Murine Embryonic Stem Cells Subjected to Stress. Effects Associated with STAT3/Survivin." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (1): 30.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0401>.
- Hasegawa, Eri, Takeshi Karashima, Eisuke Sumiyoshi, and Masayuki Yamamoto. 2006. "C. Elegans CPB-3 Interacts with DAZ-1 and Functions in Multiple Steps of Germline Development." *Developmental Biology* 295 (2): 689–99. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.002>.
- Haston, Kelly M., Joyce Y. Tung, and Renee A. Reijo Pera. 2009. "Dazl Functions in Maintenance of Pluripotency and Genetic and Epigenetic Programs of Differentiation in Mouse Primordial Germ Cells in Vivo and in Vitro." *PloS One* 4 (5): e5654.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005654>.
- He, Jing, Kayleigh Stewart, Hazel L. Kinnell, Richard A. Anderson, and Andrew J. Childs. 2015. "Correction: A Developmental Stage-Specific Switch from DAZL to BOLL Occurs during Fetal Oogenesis in Humans, but Not Mice." *PloS One* 10 (8): e0136009.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136009>.
- He, Shenghui, Daisuke Nakada, and Sean J. Morrison. 2009. "Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 377–406.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>.
- Hoehn, H., and D. Salk. 1982. "Morphological and Biochemical Heterogeneity of Amniotic Fluid Cells in Culture." *Methods in Cell Biology* 26: 11–34.
- Hou, Lingling, Hua Cao, Dongmei Wang, Guorong Wei, Cixian Bai, Yong Zhang, and Xuetao Pei. 2003. "Induction of Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells in Vitro." *International Journal of Hematology* 78 (3): 256–61.
- Hübner, Karin, Guy Fuhrmann, Lane K. Christenson, James Kehler, Rolland Reinbold, Rabindranath De La Fuente, Jennifer Wood, Jerome F. Strauss, Michele Boiani, and Hans R. Schöler. 2003. "Derivation of Oocytes from Mouse Embryonic Stem Cells." *Science* 300 (5623): 1251–56.
<https://doi.org/10.1126/science.1083452>.
- Huntriss, J., M. Hinkins, B. Oliver, S. E. Harris, J. C. Beazley, A. J. Rutherford, R. G. Gosden, S. E. Lanzendorf, and H. M. Picton. 2004. "Expression of MRNAs for DNA Methyltransferases and Methyl-CpG-Binding Proteins in the Human Female Germ Line, Preimplantation Embryos, and Embryonic Stem Cells." *Molecular Reproduction and Development* 67 (3): 323–36.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20030>.
- Ilancheran, Sivakami, Anna Michalska, Gary Peh, Euan M. Wallace, Martin Pera, and Ursula Manuelpillai. 2007. "Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential." *Biology of Reproduction* 77 (3): 577–88.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055244>.
- In 't Anker, Pieterella S., Sicco A. Scherjon, Carin Kleijburg-van der Keur, Willy A. Noort, Frans H. J. Claas, Roelof Willemze, Willem E. Fibbe, and Humphrey H. H. Kanhai. 2003. "Amniotic Fluid as a Novel Source of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Transplantation." *Blood* 102 (4): 1548–49. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1291>.
- Jeong, Ju Ah, Seung Hyun Hong, Eun Ji Gang, Chiyoung Ahn, Soo Han Hwang, Il Ho Yang, Hoon Han, and Hoon Kim. 2005. "Differential Gene Expression Profiling of Human Umbilical Cord

- Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells by DNA Microarray." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (4): 584–93. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0304>.
- Jiang, Xun, Pengcheng Cui, Wenxian Chen, Daqing Zhao, Jiasheng Luo, Guize Li, and An Sun. 2002. "[Study on the directed inducing process of cartilage cells differentiated from human marrow mesenchymal stem cells]." *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 37 (2): 137–39.
- Johnson, Joshua, Jacqueline Canning, Tomoko Kaneko, James K. Pru, and Jonathan L. Tilly. 2004. "Germline Stem Cells and Follicular Renewal in the Postnatal Mammalian Ovary." *Nature* 428 (6979): 145–50. <https://doi.org/10.1038/nature02316>.
- Johnstone, Brian, and Jung U. Yoo. 1999. "Autologous Mesenchymal Progenitor Cells in Articular Cartilage Repair." *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 367 (October): S156. https://journals.lww.com/clinorthop/Abstract/1999/10001/Autologous_Mesenchymal_Progenitor_Cells_in.17.aspx.
- Joo, Sunyoung, In Kap Ko, Anthony Atala, James J. Yoo, and Sang Jin Lee. 2012. "Amniotic Fluid-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine Research." *Archives of Pharmacal Research* 35 (2): 271–80. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0207-7>.
- Kadiyala, S., R. G. Young, M. A. Thiede, and S. P. Bruder. 1997. "Culture Expanded Canine Mesenchymal Stem Cells Possess Osteochondrogenic Potential in Vivo and in Vitro." *Cell Transplantation* 6 (2): 125–34. [https://doi.org/10.1016/s0963-6897\(96\)00279-5](https://doi.org/10.1016/s0963-6897(96)00279-5).
- Kang, Xin-Qin, Wei-Jin Zang, Li-Jun Bao, Dong-Ling Li, Xiao-Li Xu, and Xiao-Jiang Yu. 2006. "Differentiating Characterization of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro." *Cell Biology International* 30 (7): 569–75. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.02.007>.
- Kaviani, A., T. E. Perry, A. Dzakovic, R. W. Jennings, M. M. Ziegler, and D. O. Fauza. 2001. "The Amniotic Fluid as a Source of Cells for Fetal Tissue Engineering." *Journal of Pediatric Surgery* 36 (11): 1662–65. <https://doi.org/10.1053/jpsu.2001.27945>.
- Keating, Armand. 2008. "How Do Mesenchymal Stromal Cells Suppress T Cells?" *Cell Stem Cell* 2 (2): 106–8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.007>.
- Kee, Kehkooi, Vanessa T. Angeles, Martha Flores, Ha Nam Nguyen, and Renee A. Reijo Pera. 2009. "Human DAZL, DAZ and BOULE Genes Modulate Primordial Germ-Cell and Haploid Gamete Formation." *Nature* 462 (7270): 222–25. <https://doi.org/10.1038/nature08562>.
- Kee, Kehkooi, Joanna M. Gonsalves, Amander T. Clark, and Renee A. Reijo Pera. 2006. "Bone Morphogenetic Proteins Induce Germ Cell Differentiation from Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cells and Development* 15 (6): 831–37. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.15.831>.
- Kehler, James, Elena Tolkunova, Birgit Koschorz, Maurizio Pesce, Luca Gentile, Michele Boiani, Hilda Lomeli, et al. 2004. "Oct4 Is Required for Primordial Germ Cell Survival." *EMBO Reports* 5 (11): 1078–83. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400279>.
- Kim, Jeong Beom, Boris Greber, Marcos J. Araújo-Bravo, Johann Meyer, Kook In Park, Holm Zaehres, and Hans R. Schöler. 2009. "Direct Reprogramming of Human Neural Stem Cells by OCT4." *Nature* 461 (7264): 649–643. <https://doi.org/10.1038/nature08436>.
- Kim, Jeong Beom, Vittorio Sebastiano, Guangming Wu, Marcos J. Araújo-Bravo, Philipp Sasse, Luca Gentile, Kinarm Ko, et al. 2009. "Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells." *Cell* 136 (3): 411–19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.023>.
- Kim, Seok Jin, Chang Hee Song, Hwa Jung Sung, Young Do Yoo, Dong Ho Geum, Sun Hwa Park, Ji Hyun Yoo, et al. 2007. "Human Placenta-Derived Feeders Support Prolonged Undifferentiated Propagation of a Human Embryonic Stem Cell Line, SNUhES3: Comparison with Human Bone Marrow-Derived Feeders." *Stem Cells and Development* 16 (3): 421–28. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0098>.
- Kiss, Alexander, and Jens D. Mikkelsen. 2005. "Oxytocin--Anatomy and Functional Assignments: A Minireview." *Endocrine Regulations* 39 (3): 97–105.

- Kretser, David de. 2007. "Totipotent, Pluripotent or Unipotent Stem Cells: A Complex Regulatory Enigma and Fascinating Biology." *Journal of Law and Medicine* 15 (2): 212–18.
- Kunisaki, Shaun M., Myriam Armant, Grace S. Kao, Kristen Stevenson, Haesook Kim, and Dario O. Fauza. 2007. "Tissue Engineering from Human Mesenchymal Amniocytes: A Prelude to Clinical Trials." *Journal of Pediatric Surgery* 42 (6): 974–79; discussion 979-980. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2007.01.031>.
- Lawson, K. A., N. R. Dunn, B. A. Roelen, L. M. Zeinstra, A. M. Davis, C. V. Wright, J. P. Korving, and B. L. Hogan. 1999. "Bmp4 Is Required for the Generation of Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo." *Genes & Development* 13 (4): 424–36. <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.424>.
- Lee, Heon-Jin, Abbe H. Macbeth, Jerome Pagani, and W. Scott Young. 2009. "Oxytocin: The Great Facilitator of Life." *Progress in Neurobiology* 88 (2): 127–51. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.001>.
- Li, Changdong, Weiyuan Zhang, Xiaoxia Jiang, and Ning Mao. 2007. "Human-Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Proliferation and Function of Allogeneic Immune Cells." *Cell and Tissue Research* 330 (3): 437–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0504-5>.
- Li, Dong, Guo-Yun Wang, Bai-Hua Dong, Yue-Cun Zhang, Yuan-Xiu Wang, and Bing-Cui Sun. 2007. "Biological Characteristics of Human Placental Mesenchymal Stem Cells and Their Proliferative Response to Various Cytokines." *Cells, Tissues, Organs* 186 (3): 169–79. <https://doi.org/10.1159/000105674>.
- Lin, Yanfeng, and David C. Page. 2005a. "Dazl Deficiency Leads to Embryonic Arrest of Germ Cell Development in XY C57BL/6 Mice." *Developmental Biology* 288 (2): 309–16. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.032>.
- . 2005b. "Dazl Deficiency Leads to Embryonic Arrest of Germ Cell Development in XY C57BL/6 Mice." *Developmental Biology* 288 (2): 309–16. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.032>.
- Ludwig, Mike, and Gareth Leng. 2006. "Dendritic Peptide Release and Peptide-Dependent Behaviours." *Nature Reviews. Neuroscience* 7 (2): 126–36. <https://doi.org/10.1038/nrn1845>.
- MacGill, Markus. 2015. "What Is Oxytocin? Why Is Oxytocin Called the Love Hormone?" *Medical News Today*, September.
- Mantel, Charlie, and Hal E. Broxmeyer. 2007. "A New Connection between the Spindle Checkpoint, Asymmetric Cell Division and Cytokine Signaling." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (2): 144–46. <https://doi.org/10.4161/cc.6.2.3791>.
- Marcus, Akiva J., Thomas M. Coyne, Judah Rauch, Dale Woodbury, and Ira B. Black. 2008. "Isolation, Characterization, and Differentiation of Stem Cells Derived from the Rat Amniotic Membrane." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 76 (2): 130–44. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00194.x>.
- McGee, Elizabeth. 2011. "Regenerative Medicine Meets Gynecology PREFACE." *Seminars in Reproductive Medicine* 29 (January): 3–4. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1268698>.
- McGuckin, C. P., N. Forraz, M.-O. Baradez, S. Navran, J. Zhao, R. Urban, R. Tilton, and L. Denner. 2005a. "Production of Stem Cells with Embryonic Characteristics from Human Umbilical Cord Blood." *Cell Proliferation* 38 (4): 245–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2005.00346.x>.
- . 2005b. "Production of Stem Cells with Embryonic Characteristics from Human Umbilical Cord Blood." *Cell Proliferation* 38 (4): 245–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2005.00346.x>.
- Medrano, Jose V., Cyril Ramathal, Ha N. Nguyen, Carlos Simon, and Renee A. Reijo Pera. 2012. "Divergent RNA-Binding Proteins, DAZL and VASA, Induce Meiotic Progression in Human Germ Cells Derived in Vitro." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (3): 441–51. <https://doi.org/10.1002/stem.1012>.
- "Midtrimester Amniocentesis for Prenatal Diagnosis. Safety and Accuracy." 1976. *JAMA* 236 (13): 1471–76. <https://doi.org/10.1001/jama.1976.03270140023016>.

- Miki, Toshio, Thomas Lehmann, Hongbo Cai, Donna B. Stolz, and Stephen C. Strom. 2005. "Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (10): 1549–59. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0357>.
- Miki, Toshio, and Stephen C. Strom. 2006. "Amnion-Derived Pluripotent/Multipotent Stem Cells." *Stem Cell Reviews* 2 (2): 133–42. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0020-0>.
- Milunsky, Aubrey. 1979. "Amniotic Fluid Cell Culture." In *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention, and Treatment*, edited by Aubrey Milunsky, 75–91. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3438-5_4.
- Mitchell, Kathy E., Mark L. Weiss, Brianna M. Mitchell, Phillip Martin, Duane Davis, Lois Morales, Bryan Helwig, et al. 2003. "Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 21 (1): 50–60. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-50>.
- Moore, Frederick L., Jadwiga Jaruzelska, David M Dorfman, and Renee A Reijo-Pera. 2004. "Identification of a Novel Gene, DZIP (DAZ-Interacting Protein), That Encodes a Protein That Interacts with DAZ (Deleted in Azoospermia) and Is Expressed in Embryonic Stem Cells and Germ Cells." *Genomics* 83 (5): 834–43. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.11.005>.
- Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. "Clonal Mesenchymal Progenitors from Human Bone Marrow Differentiate in Vitro According to a Hierarchical Model." *Journal of Cell Science* 113 (Pt 7) (April): 1161–66.
- Nadri, S., and M. Soleimani. 2007. "Comparative Analysis of Mesenchymal Stromal Cells from Murine Bone Marrow and Amniotic Fluid." *Cytotherapy* 9 (8): 729–37. <https://doi.org/10.1080/14653240701656061>.
- Nakamura, Shuhei, Kayo Kobayashi, Toshiya Nishimura, Shin-ichi Higashijima, and Minoru Tanaka. 2010. "Identification of Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost Medaka." *Science (New York, N.Y.)* 328 (5985): 1561–63. <https://doi.org/10.1126/science.1185473>.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, and A. Smith. 1998a. "Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4." *Cell* 95 (3): 379–91. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81769-9).
- . 1998b. "Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4." *Cell* 95 (3): 379–91. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81769-9).
- Niederberger, C., A. I. Agulnik, Y. Cho, D. Lamb, and C. E. Bishop. 1997. "In Situ Hybridization Shows That Dazla Expression in Mouse Testis Is Restricted to Premeiotic Stages IV–VI of Spermatogenesis." *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 8 (4): 277–78.
- Noronha, Irene L., Rita C. Cavaglieri, Felipe L. Janz, Sergio A. Duarte, Marco A. B. Lopes, Marcelo Zugaib, and Sergio P. Bydlowski. 2011. "The Potential Use of Stem Cells Derived from Human Amniotic Fluid in Renal Diseases." *Kidney International Supplements* 1 (3): 77–82. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.18>.
- Ohinata, Yasuhide, Hiroshi Ohta, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, Teruhiko Wakayama, and Mitinori Saitou. 2009. "A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice." *Cell* 137 (3): 571–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.014>.
- Ohinata, Yasuhide, Bernhard Payer, Dónal O'Carroll, Katia Ancelin, Yukiko Ono, Mitsue Sano, Sheila C. Barton, et al. 2005. "Blimp1 Is a Critical Determinant of the Germ Cell Lineage in Mice." *Nature* 436 (7048): 207–13. <https://doi.org/10.1038/nature03813>.
- Okamoto, K., H. Okazawa, A. Okuda, M. Sakai, M. Muramatsu, and H. Hamada. 1990. "A Novel Octamer Binding Transcription Factor Is Differentially Expressed in Mouse Embryonic Cells." *Cell* 60 (3): 461–72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90597-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90597-8).

- Pan, H.A. 2002. "Expression of DAZL Protein in the Human Corpus Luteum." *Molecular Human Reproduction* 8 (June): 540–45. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.6.540>.
- Pan, Hung-Chuan, Fu-Chou Cheng, Chun-Jung Chen, Shu-Zhen Lai, Chi-Wen Lee, Dar-Yu Yang, Ming-Hong Chang, and Shu-Peng Ho. 2007. "Post-Injury Regeneration in Rat Sciatic Nerve Facilitated by Neurotrophic Factors Secreted by Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 14 (11): 1089–98. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2006.08.008>.
- Pappa, Kalliopi I., and Nicholas P. Anagnostou. 2009. "Novel Sources of Fetal Stem Cells: Where Do They Fit on the Developmental Continuum?" *Regenerative Medicine* 4 (3): 423–33. <https://doi.org/10.2217/rme.09.12>.
- Paquin, Joanne, Bogdan A. Danalache, Marek Jankowski, Samuel M. McCann, and Jolanta Gutkowska. 2002. "Oxytocin Induces Differentiation of P19 Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (14): 9550–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.152302499>.
- Park, In-Hyun, Rui Zhao, Jason A. West, Akiko Yabuuchi, Hongguang Huo, Tan A. Ince, Paul H. Lerou, M. William Lensch, and George Q. Daley. 2008. "Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotency with Defined Factors." *Nature* 451 (7175): 141–46. <https://doi.org/10.1038/nature06534>.
- Parolini, Ornella, Francesco Alviano, Gian Paolo Bagnara, Grozdana Bilic, Hans-Jörg Bühring, Marco Evangelista, Simone Hennerbichler, et al. 2008. "Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (2): 300–311. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0594>.
- Perin, Laura, Stefano Giuliani, Sargis Sedrakyan, Stefano DA Sacco, and Roger E. De Filippo. 2008. "Stem Cell and Regenerative Science Applications in the Development of Bioengineering of Renal Tissue." *Pediatric Research* 63 (5): 467–71. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181660653>.
- Pesce, M., and H. R. Schöler. 2000. "Oct-4: Control of Totipotency and Germline Determination." *Molecular Reproduction and Development* 55 (4): 452–57. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200004\)55:4<452::AID-MRD14>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<452::AID-MRD14>3.0.CO;2-S).
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143–47. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- Plant, Tony M., and Anthony J. Zeleznik. 2014. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press.
- Pochampally, Radhika R., Jason R. Smith, Joni Ylostalo, and Darwin J. Prockop. 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): 1647–52. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1967>.
- Prusa, Andrea-Romana, and Markus Hengstschlager. 2002. "Amniotic Fluid Cells and Human Stem Cell Research: A New Connection." *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 8 (11): RA253-257.
- Prusa, Andrea-Romana, Erika Marton, Margit Rosner, Gerhard Bernaschek, and Markus Hengstschlager. 2003a. "Oct-4-Expressing Cells in Human Amniotic Fluid: A New Source for Stem Cell Research?" *Human Reproduction (Oxford, England)* 18 (7): 1489–93. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg279>.
- . 2003b. "Oct-4-Expressing Cells in Human Amniotic Fluid: A New Source for Stem Cell Research?" *Human Reproduction (Oxford, England)* 18 (7): 1489–93. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg279>.

- Rao, V. V., C. Löffler, J. Battey, and I. Hansmann. 1992. "The Human Gene for Oxytocin-Neurophysin I (OXT) Is Physically Mapped to Chromosome 20p13 by in Situ Hybridization." *Cytogenetics and Cell Genetics* 61 (4): 271–73. <https://doi.org/10.1159/000133420>.
- Rehni, Ashish K., Nirmal Singh, Amteshwar S. Jaggi, and Manjeet Singh. 2007. "Amniotic Fluid Derived Stem Cells Ameliorate Focal Cerebral Ischaemia-Reperfusion Injury Induced Behavioural Deficits in Mice." *Behavioural Brain Research* 183 (1): 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.05.028>.
- Reijo, R. A., D. M. Dorfman, R. Slee, A. A. Renshaw, K. R. Loughlin, H. Cooke, and D. C. Page. 2000. "DAZ Family Proteins Exist throughout Male Germ Cell Development and Transit from Nucleus to Cytoplasm at Meiosis in Humans and Mice." *Biology of Reproduction* 63 (5): 1490–96. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1490>.
- Reijo, R., R. K. Alagappan, D. C. Page, and P. Patrizio. 1996. "Severe Oligozoospermia Resulting from Deletions of Azoospermia Factor Gene on Y Chromosome." *The Lancet* 347 (9011): 1290–93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)90938-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)90938-1).
- Reményi, A., A. Tomilin, E. Pohl, K. Lins, A. Philippsen, R. Reinbold, H. R. Schöler, and M. Wilmanns. 2001. "Differential Dimer Activities of the Transcription Factor Oct-1 by DNA-Induced Interface Swapping." *Molecular Cell* 8 (3): 569–80.
- Roubelakis, Maria G., Kalliopi I. Pappa, Vasiliki Bitsika, Dimitra Zagoura, Antonia Vlahou, Helen A. Papadaki, Aristidis Antsaklis, and Nicholas P. Anagnou. 2007. "Molecular and Proteomic Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Amniotic Fluid: Comparison to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells and Development* 16 (6): 931–52. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0036>.
- Ruggiu, M., R. Speed, M. Taggart, S. J. McKay, F. Kilanowski, P. Saunders, J. Dorin, and H. J. Cooke. 1997. "The Mouse Dazl Gene Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Gametogenesis." *Nature* 389 (6646): 73–77. <https://doi.org/10.1038/37987>.
- Russell, and Brunton. 2009. "Oxytocin (Peripheral/Central Actions and Their Regulation), Encyclopedia of Neuroscience 2009," 2009.
- Sakai, Daisuke, Joji Mochida, Yukihiro Yamamoto, Takeshi Nomura, Masahiko Okuma, Kazuhiro Nishimura, Tomoko Nakai, Kiyoshi Ando, and Tomomitsu Hotta. 2003. "Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Embedded in Atelocollagen Gel to the Intervertebral Disc: A Potential Therapeutic Model for Disc Degeneration." *Biomaterials* 24 (20): 3531–41. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00222-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00222-9).
- Saunders, P. T. K., J. M. A. Turner, M. Ruggiu, M. Taggart, P. S. Burgoyne, D. Elliott, and H. J. Cooke. 2003. "Absence of MDazl Produces a Final Block on Germ Cell Development at Meiosis." *Reproduction*, 589–597.
- Saxena, R., L. G. Brown, T. Hawkins, R. K. Alagappan, H. Skaletsky, M. P. Reeve, R. Reijo, et al. 1996. "The DAZ Gene Cluster on the Human Y Chromosome Arose from an Autosomal Gene That Was Transposed, Repeatedly Amplified and Pruned." *Nature Genetics* 14 (3): 292–99. <https://doi.org/10.1038/ng1196-292>.
- Schaeffer, J. M., J. Liu, A. J. Hsueh, and S. S. Yen. 1984. "Presence of Oxytocin and Arginine Vasopressin in Human Ovary, Oviduct, and Follicular Fluid." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 59 (5): 970–73. <https://doi.org/10.1210/jcem-59-5-970>.
- Schmidt, Dörthe, Anita Mol, Christian Breymann, Josef Achermann, Bernhard Odermatt, Matthias Gössi, Stefan Neuenschwander, et al. 2006. "Living Autologous Heart Valves Engineered from Human Prenatally Harvested Progenitors." *Circulation* 114 (1 Suppl): I125–131. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001040>.
- Schöler, H. R., G. R. Dressler, R. Balling, H. Rohdewohld, and P. Gruss. 1990a. "Oct-4: A Germline-Specific Transcription Factor Mapping to the Mouse t-Complex." *The EMBO Journal* 9 (7): 2185–95.

- . 1990b. “Oct-4: A Germline-Specific Transcription Factor Mapping to the Mouse t-Complex.” *The EMBO Journal* 9 (7): 2185–95.
- Schrans-Stassen, B. H., P. T. Saunders, H. J. Cooke, and D. G. de Rooij. 2001. “Nature of the Spermatogenic Arrest in Dazl -/- Mice.” *Biology of Reproduction* 65 (3): 771–76. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.771>.
- Seboun, E., S. Barbaux, T. Bourgeron, S. Nishi, A. Agulnik, M. Egashira, N. Nikkawa, et al. 1997. “Gene Sequence, Localization, and Evolutionary Conservation of DAZLA, a Candidate Male Sterility Gene.” *Genomics* 41 (2): 227–35.
- Seligman, J., and D. C. Page. 1998. “The Dazh Gene Is Expressed in Male and Female Embryonic Gonads before Germ Cell Sex Differentiation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245 (3): 878–82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8530>.
- Seligman, Judith, and David C. Page. 1998. “TheDazhGene Is Expressed in Male and Female Embryonic Gonads before Germ Cell Sex Differentiation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245 (3): 878–82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8530>.
- Sessarego, Nadia, Alessia Parodi, Marina Podestà, Federica Benvenuto, Massimo Mogni, Valentina Raviolo, Mario Lituanica, et al. 2008. “Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Amniotic Fluid: Solid Perspectives for Clinical Application.” *Haematologica* 93 (3): 339–46. <https://doi.org/10.3324/haematol.11869>.
- Shah, Chirag, Michael J. W. Vangompel, Villian Naeem, Yanmei Chen, Terrance Lee, Nicholas Angeloni, Yin Wang, and Eugene Yujun Xu. 2010. “Widespread Presence of Human BOULE Homologs among Animals and Conservation of Their Ancient Reproductive Function.” *PLoS Genetics* 6 (7): e1001022. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001022>.
- Shaw, Sheng Wen S., Anna L. David, and Paolo De Coppi. 2011. “Clinical Applications of Prenatal and Postnatal Therapy Using Stem Cells Retrieved from Amniotic Fluid.” *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 23 (2): 109–16. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32834457b1>.
- Shi, Qin, JingWei Gao, Yao Jiang, Baolan Sun, Wei Lu, Min Su, Yunzhao Xu, Xiaoqing Yang, and Yuquan Zhang. 2017. “Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Endometrial Cells.” *Stem Cell Research & Therapy* 8 (1): 246. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0700-5>.
- Shi, Wenjing, Hui Wang, Guangjin Pan, Yijie Geng, Yunqian Guo, and Duanqing Pei. 2006. “Regulation of the Pluripotency Marker Rex-1 by Nanog and Sox2.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (33): 23319–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601811200>.
- Siegel, Nicol, Margit Rosner, Michaela Hanneder, Alessandro Valli, and Markus Hengstschläger. 2007. “Stem Cells in Amniotic Fluid as New Tools to Study Human Genetic Diseases.” *Stem Cell Reviews* 3 (4): 256–64. <https://doi.org/10.1007/s12015-007-9003-z>.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers. 1988. “Inhibition of Pluripotential Embryonic Stem Cell Differentiation by Purified Polypeptides.” *Nature* 336 (6200): 688–90. <https://doi.org/10.1038/336688a0>.
- Smith, A. G., and M. L. Hooper. 1987. “Buffalo Rat Liver Cells Produce a Diffusible Activity Which Inhibits the Differentiation of Murine Embryonal Carcinoma and Embryonic Stem Cells.” *Developmental Biology* 121 (1): 1–9. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90132-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90132-1).
- Stefanidis, Konstantinos, Dimitris Loutradis, Vasiliki Anastasiadou, Ritsa Bletsas, Erasmia Kiapekou, Peter Drakakis, Panos Beretsos, Evangelia Elenis, Spiros Mesogitis, and Aris Antsaklis. 2008. “Oxytocin Receptor- and Oct-4-Expressing Cells in Human Amniotic Fluid.” *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 24 (5): 280–84. <https://doi.org/10.1080/09513590801977167>.
- Stefanidis, Konstantinos, Dimitris Loutradis, Lemonika Koumbi, Vasiliki Anastasiadou, Vasiliki Dinopoulou, Erasmia Kiapekou, Alexandros A. Lavdas, Spiros Mesogitis, and Aris Antsaklis. 2008. “Deleted in Azoospermia-Like (DAZL) Gene-Expressing Cells in Human Amniotic Fluid: A New Source for Germ Cells Research?” *Fertility and Sterility* 90 (3): 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.106>.

- Stefanidis, Konstantinos, Vasileios Pergialiotis, Dimitrios Christakis, Dimitrios Loutradis, and Aristides Antsaklis. 2013. "Nodal, Nanog, DAZL and SMAD Gene Expression in Human Amniotic Fluid Stem Cells." *Journal of Stem Cells* 8 (1): 17–23.
- Streubel, B., G. Martucci-Ivessa, T. Fleck, and R. E. Bittner. 1996. "[In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook]." *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)* 146 (9–10): 216–17.
- Tai, Mei-Hui, Chia-Cheng Chang, Matti Kiupel, Joshua D. Webster, L. Karl Olson, and James E. Trosko. 2005. "Oct4 Expression in Adult Human Stem Cells: Evidence in Support of the Stem Cell Theory of Carcinogenesis." *Carcinogenesis* 26 (2): 495–502. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh321>.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." *Cell* 131 (5): 861–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Tamagawa, Tomoharu, Satoshi Oi, Isamu Ishiwata, Hiroshi Ishikawa, and Yukio Nakamura. 2007. "Differentiation of Mesenchymal Cells Derived from Human Amniotic Membranes into Hepatocyte-like Cells in Vitro." *Human Cell* 20 (3): 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2007.00032.x>.
- Telfer, Evelyn E., and David F. Albertini. 2012. "The Quest for Human Ovarian Stem Cells." *Nature Medicine* 18 (3): 353–54. <https://doi.org/10.1038/nm.2699>.
- Teramura, Takeshi, Toshiyuki Takehara, Nobuyuki Kawata, Nahoko Fujinami, Tasuku Mitani, Makoto Takenoshita, Kazuya Matsumoto, et al. 2007. "Primate Embryonic Stem Cells Proceed to Early Gametogenesis In Vitro." *Cloning and Stem Cells* 9 (2): 144–56. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.0070>.
- Thackare, Hemlata, Helen D. Nicholson, and Kate Whittington. 2006. "Oxytocin--Its Role in Male Reproduction and New Potential Therapeutic Uses." *Human Reproduction Update* 12 (4): 437–48. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk002>.
- "The Human Protein Atlas." n.d. Accessed August 23, 2019. <http://www.proteinatlas.org/>.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, R. A. Becker, and J. P. Hearn. 1995. "Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (17): 7844–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7844>.
- Torricelli, F., L. Brizzi, P. A. Bernabei, G. Gheri, S. Di Lollo, L. Nutini, E. Lisi, M. Di Tommaso, and E. Cariati. 1993. "Identification of Hematopoietic Progenitor Cells in Human Amniotic Fluid before the 12th Week of Gestation." *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia* 98 (2): 119–26.
- Toyooka, Yayoi, Naoki Tsunekawa, Ryuko Akasu, and Toshiaki Noce. 2003. "Embryonic Stem Cells Can Form Germ Cells in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (20): 11457–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1932826100>.
- Tsai, Ming-Song, Shiaw-Min Hwang, Kuang-Den Chen, Yun-Shien Lee, Li-Wen Hsu, Yu-Jen Chang, Chao-Nin Wang, et al. 2007. "Functional Network Analysis of the Transcriptomes of Mesenchymal Stem Cells Derived from Amniotic Fluid, Amniotic Membrane, Cord Blood, and Bone Marrow." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (10): 2511–23. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0023>.
- Tsai, Ming-Song, Jia-Ling Lee, Yu-Jen Chang, and Shiaw-Min Hwang. 2004. "Isolation of Human Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Second-Trimester Amniotic Fluid Using a Novel Two-Stage Culture Protocol." *Human Reproduction (Oxford, England)* 19 (6): 1450–56. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh279>.

- Uccelli, Antonio, Vito Pistoia, and Lorenzo Moretta. 2007. "Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy for Immunosuppression?" *Trends in Immunology* 28 (5): 219–26. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.03.001>.
- Underwood, Mark A., William M. Gilbert, and Michael P. Sherman. 2005. "Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore." *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 25 (5): 341–48. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211290>.
- Wakitani, S., T. Goto, S. J. Pineda, R. G. Young, J. M. Mansour, A. I. Caplan, and V. M. Goldberg. 1994. "Mesenchymal Cell-Based Repair of Large, Full-Thickness Defects of Articular Cartilage." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 76 (4): 579–92. <https://doi.org/10.2106/00004623-199404000-00013>.
- Wang, Jianlong, Sridhar Rao, Jianlin Chu, Xiaohua Shen, Dana N. Levasseur, Thorold W. Theunissen, and Stuart H. Orkin. 2006. "A Protein Interaction Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells." *Nature* 444 (7117): 364–68. <https://doi.org/10.1038/nature05284>.
- Weiss, Mark L., Satish Medicetty, Amber R. Bledsoe, Raja Shekar Rachakatla, Michael Choi, Shosh Merchav, Yongquan Luo, Mahendra S. Rao, Gopalrao Velagaleti, and Deryl Troyer. 2006. "Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (3): 781–92. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0330>.
- White, Yvonne A. R., Dori C. Woods, Yasushi Takai, Osamu Ishihara, Hiroyuki Seki, and Jonathan L. Tilly. 2012. "Oocyte Formation by Mitotically Active Germ Cells Purified from Ovaries of Reproductive-Age Women." *Nature Medicine* 18 (3): 413–21. <https://doi.org/10.1038/nm.2669>.
- White, Yvonne A. R., Dori C. Woods, and Antony W. Wood. 2011. "A Transgenic Zebrafish Model of Targeted Oocyte Ablation and de Novo Oogenesis." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240 (8): 1929–37. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22695>.
- Wolbank, Susanne, Anja Peterbauer, Marc Fahrner, Simone Hennerbichler, Martijn van Griensven, Guido Stadler, Heinz Redl, and Christian Gabriel. 2007. "Dose-Dependent Immunomodulatory Effect of Human Stem Cells from Amniotic Membrane: A Comparison with Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue." *Tissue Engineering* 13 (6): 1173–83. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0313>.
- Woods, Dori C., Evelyn E. Telfer, and Jonathan L. Tilly. 2012. "Oocyte Family Trees: Old Branches or New Stems?" *PLoS Genetics* 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002848>.
- Wylie, Chris. 1999. "Germ Cells." *Cell* 96 (2): 165–74. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80557-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80557-7).
- Xu, E. Y., F. L. Moore, and R. A. Pera. 2001. "A Gene Family Required for Human Germ Cell Development Evolved from an Ancient Meiotic Gene Conserved in Metazoans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (13): 7414–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.131090498>.
- Yamaji, Masashi, Yoshiyuki Seki, Kazuki Kurimoto, Yukihiro Yabuta, Mihoko Yuasa, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, Yasuhide Ohinata, and Mitinori Saitou. 2008. "Critical Function of Prdm14 for the Establishment of the Germ Cell Lineage in Mice." *Nature Genetics* 40 (8): 1016–22. <https://doi.org/10.1038/ng.186>.
- Yamanaka, Shinya. 2012. "Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future." *Cell Stem Cell* 10 (6): 678–84. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>.
- Yen, B. Linju, Chih-Cheng Chien, Yao-Chang Chen, Jen-Tse Chen, Jing-Shan Huang, Fa-Kung Lee, and Hsing-I. Huang. 2008. "Placenta-Derived Multipotent Cells Differentiate into Neuronal and Glial Cells in Vitro." *Tissue Engineering. Part A* 14 (1): 9–17. <https://doi.org/10.1089/ten.a.2006.0352>.
- Yen, Pauline H. 2004. "Putative Biological Functions of the DAZ Family." *International Journal of Andrology* 27 (3): 125–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00469.x>.

- Young, R. G., D. L. Butler, W. Weber, A. I. Caplan, S. L. Gordon, and D. J. Fink. 1998. "Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon Repair." *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 16 (4): 406–13. <https://doi.org/10.1002/jor.1100160403>.
- Zhang, Wenwen, Jianfu Zhang, Ming Xu, and Yongmei Zhang. 2007. "Effect of Oxytocin on Gastric Ischemia-Reperfusion Injury in Rats." *Frontiers of Medicine in China* 1 (4): 433–37. <https://doi.org/10.1007/s11684-007-0085-4>.
- Zhao, Peng, Hirohiko Ise, Minoru Hongo, Masao Ota, Ikuo Konishi, and Toshio Nikaido. 2005. "Human Amniotic Mesenchymal Cells Have Some Characteristics of Cardiomyocytes." *Transplantation* 79 (5): 528–35. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000149503.92433.39>.
- Zou, Kang, Zhe Yuan, Zhaojuan Yang, Huacheng Luo, Kejing Sun, Li Zhou, Jie Xiang, et al. 2009. "Production of Offspring from a Germline Stem Cell Line Derived from Neonatal Ovaries." *Nature Cell Biology* 11 (5): 631–36. <https://doi.org/10.1038/ncb1869>.

