

# ΕΞΩΦΥΛΛΟ

**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**  
**Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Φυσιολογίας**  
**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη:**  
**«Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογίας»**

**Τίτλος Διπλωματικής Διατριβής**  
**«Τα βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton ως *in vitro* μοντέλο**  
**ηπατικής τοξικότητας φαρμάκων και ουσιών»**

**Κυριακή Κατσαούνου**  
Βιολόγος

*Τριμελής Επιτροπή:*  
*Κουτσιλιέρης Μ., Ζουμπουρλής Β., Βαϊόπουλος Γ.*

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΟΝΑΔΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ  
**Αθήνα, Δεκέμβριος 2015**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Έρευνας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, κύριο Βασίλειο Ζουμπουρλή, επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας του μεταπτυχιακού μου, για την καθοδήγηση και τις πλούσιες γνώσεις που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της στο εργαστήριό που είναι επικεφαλής, όπως επίσης και στον μεταδιδακτορικό ερευνητή του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών κύριο Ιωάννη Χριστοδούλου για την ερευνητική και τεχνική καθοδήγηση του, την αμέριστη συμπαράσταση και την άψογη συνεργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή, κύριο Μιχαήλ Κουτσιλιέρη, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας και διευθυντή του εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, στο οποίο παρακολούθησα το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, όπως και τον Ομότιμο, κύριο Καθηγητή Γεώργιο Βαϊόπουλο για την επίβλεψή τους.

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τη συνεργάτιδα και φίλη Έλενα Τάκη για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και για τη στήριξη, τη βοήθεια και την αμέριστη συμπαράστασή της καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας εργασίας. Επιπρόσθετα, επιθυμώ να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Σωτήριο Γαλτσίδα, και Νικόλαο Χούρι, όπως και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Μελίνα Μητσιογιάννη και Ελισάβετ Κριτσοτάλακη για τη βοήθεια και τη στήριξή τους όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, που μου συμπαραστέκεται τόσο ηθικά, όσο και οικονομικά και με υποστηρίζει σε κάθε βήμα της ζωής μου και σε κάθε επιλογή μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει υπάρξει μια αλματώδης ανάπτυξη στις τεχνικές καλλιέργειας βλαστικών κυττάρων, που απομονώνονται από ανθρώπινα έμβρυα (hESCs), ή από ενήλικες. Η βελτιστοποίηση των συγκεκριμένων τεχνικών κυτταρικής καλλιέργειας καθιστά πλέον τα παραπάνω κύτταρα ευρέως διαθέσιμα. Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε πλειοδύναμα (pluripotent) και πολυδύναμα (multipotent). Το δυναμικό διαφοροποίησης που τα χαρακτηρίζει (pluri / multipotency), τα καθιστά «τα πλέον ειδικά» για χρήση σε *in vitro* δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας, όπως και αναπτυξιακής τοξικότητας. Οι έρευνες πλέον προσανατολίζονται τόσο στην ανακάλυψη νέων, όσο και στην εξέλιξη των ήδη υπαρχόντων τεχνικών τοξικότητας. Το αποτέλεσμα αυτών των ερευνών θεωρείται πως θα συμβάλει στην καλύτερη αξιολόγηση των χημικών ουσιών και των φαρμάκων, αλλά και των επιπτώσεών τους στην ανάπτυξη του οργανισμού και στις δημιουργούμενες βλάβες λόγω τοξικότητας σε ζωτικά όργανα, όπως το ήπαρ. Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη ενός συστήματος μεσεγγυματικών κυττάρων του ομφαλίου λώρου, με στόχο τον προσδιορισμό του ως «πρότυπου συστήματος ηπατοτοξικότητας φαρμάκων και νέων χημικών ουσιών». Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε ένα σύνολο ουσιών κυρίως ηπατικής τοξικότητας (αλλά και ηπατικής, καρδιακής, νεφρικής και άλλων) και εξήχθησαν αποτελέσματα που αφορούν τη μέση κυτταρική επιβίωση με τη χορήγηση των ουσιών αυτών (IC50), όπως επίσης και τα ποσοστά ορθής πρόβλεψης μεταξύ των υπολογισμένων πειραματικών τιμών και των *in silico* τιμών οξείας - από - του στόματος - τοξικότητας των πειραματοζώων (LD50). Συμπερασματικά, η προσπάθεια δημιουργίας ενός σταθερού *in vitro* συστήματος μελέτης της γενικευμένη ή οργανοειδικής τοξικότητας, βασισμένο στα βλαστικά κύτταρα, μπορεί να συνεισφέρει στο εγγύς μέλλον στην *in vitro* αξιολόγηση των κινδύνων που εμπεριέχονται σε νεοαναπτυσσόμενα φάρμακα, μειώνοντας έτσι τη χρήση των ζώων, στοχεύοντας στην καλύτερη πρόβλεψη της βιολογικής απόκρισης σε ένα εύρος ουσιών, και τέλος, ελαχιστοποιώντας το κόστος της φαρμακοπαραγωγής.

## SYNOPSIS

Over the last 20 years there has been a rapid development in both human embryonic (hESCs) and adult stem cell culture techniques that resulted in a significant increase in stem cells availability for research and potential use in cell therapies. Stem cells are divided into pluripotent and multipotent. The differentiation potency of stem cells (pluri /multipotency) makes them potentially attractive reagents for *in vitro* cytotoxicity and developmental toxicity assays. Lately research has been directed towards the improvement or replacement of many conventional models of toxicity screening with more relevant human systems. The result of these investigations will contribute to a better assessment of chemicals and drugs, to a better testing of potential developmental toxicants, and prediction of the side effects of these chemicals and drugs to vital organs such as the liver. The aim of this thesis is the development of a system based on umbilical cord mesenchymal stem cells, as an "in vitro hepatotoxicity model of drugs and new chemical substances." In this context, we studied a set of mainly hepatotoxic substances, and calculated their half maximal inhibitory concentration (IC50), as well as the system's prediction rates among calculated experimental values and the acute median oral lethal dose (LD50) *in silico* data. In conclusion, the development of a stem cells-based *in vitro* specific target organ/systemic toxicity model, may contribute, in the near future, to a more reliable risk assessment of potential drugs, to the reduction in the use of laboratory animals, and finally, to the decrease of the drug discovery cost.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
Συντμήσεις	9
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1. Βλαστικά κύτταρα: ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά	12
2. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton (ομφάλιος λώρος) και οι περιοχές απομόνωσής τους.	14
3. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton	17
4. Ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων στη βασική έρευνα	19
5. Μέθοδοι μελέτης της τοξικότητας χωρίς τη χρήση ζώων	20
5.1. Το εναλλακτικό κίνημα των 3Rs	20
5.2. <i>In vitro</i> τοξικότητα	21
5.3. Τελικά σημεία της <i>in vitro</i> τοξικότητας (endpoints)	22
5.4. Κυτταρικοί μηχανισμοί τοξικότητας	23
6. Τα βλαστικά κύτταρα ως εργαλεία εκτίμησης της τοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών	24
6.1. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες μελέτης της τοξικότητας	26
6.2. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες μελέτης αναπτυξιακής τοξικότητας	27
6.3. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες καταγραφής της κυτταρικής λειτουργίας μετά από έκθεση σε χημικές ουσίες	28
6.4. Συντήρηση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες τοξικότητας	29
7. Πρότυπα συστήματα μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου	30
7.1. Στοχεύοντας προς τη δημιουργία προτύπων συστημάτων βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου με σκοπό τη διάγνωση και τη θεραπεία	30
7.2. Η χρήση της τεχνολογίας των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου για την αξιολόγηση (screening) των φαρμάκων	32
7.3. Μείωση του κόστους ανάλυσης και εκτίμηση των φαρμακευτικών και τοξικών ουσιών με τη χρήση των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου	33
7.4. Ανάπτυξη <i>in vitro</i> κυτταρικών συστημάτων πρόβλεψης της απόκρισης του ανθρώπου σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις φαρμακευτικών ουσιών	36
8. Ήπαρ: η ανάπτυξη και οι λειτουργίες του οργάνου	37
9. Χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών HepG2, HepaRG και HH και η χρήση τους ως εργαλεία ανίχνευσης ηπατοτοξικότητας	40

10. Τα WJ-MSCs εκφράζουν γονίδια προγονικών και ώριμων ηπατοκυττάρων	43
11. Εφαρμογές στην τοξικολογία	45
11.1. Φαρμακοκινητική και τοξικοκινητική	45
11.2. Φαρμακευτικές ουσίες και ηπατοτοξικότητα	45
11.3. Μοντέλα ηπατοτοξικότητας	46
11.4. Ουσίες ήπιας οργανοειδικής (ηπατικής και μη) τοξικότητας	48
11.5. Ουσίες οξείας ηπατικής τοξικότητας	49
12. Μέθοδοι απομόνωσης και <i>in vitro</i> τοξικότητας και θεωρητικά σημεία των μεθόδων	56
12.1. Μέθοδος απομόνωσης μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του ομφαλίου λώρου	56
12.1.1. Απομόνωση και καλλιέργεια των κυττάρων της γέλης του Wharton του ανθρώπου	56
12.1.2. Κρυοσυντήρηση των επεξεργασμένων αιμοφόρων αγγείων – απομονωμένων από τον ομφάλιο λώρο	64
12.2. Μέθοδοι για δοκιμασίες <i>in vitro</i> κυτταροτοξικότητας	64
12.2.1. Η δοκιμασία MTS	65
12.2.2. Η δοκιμασία NRU	67
12.2.3. NRU- αντιμετώπιση προβλημάτων και προϋποθέσεις για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων	69
12.2.4. Κυτταρικές καλλιέργειες δύο (2D) και τριών διαστάσεων (3D) στην τοξικολογία	73
12.2.5. Η χρώση διπλού φθορισμού με φαλλοϊδίνη (Phalloidin) και DAPI, ως μέθοδος μέτρησης κυτταροτοξικότητας	75
13. Σκοπός της μελέτης	75
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
1. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν	78
2. Απομόνωση και Χαρακτηρισμός των βλαστικών κυττάρων WJ-MSCs	81
2.1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση και την επεξεργασία των WJ-MSCs	82
2.2. Απομόνωση και επεξεργασία των βλαστικών μεσεγχυματικών κυττάρων της γέλης του Wharton (WJ-MSCs) από ομφάλιο λώρο	83
3. Προετοιμασία υλικών καλλιέργειας	84
3.1. DMEM	85
3.2. DMEM/F12	85
3.3. DMEM/Ham's F12	85
3.4. PBS	86
3.5. Θρυψίνη	86

3.6.	Υγρό κατάψυξης κυττάρων	87
4.	Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών	87
4.1.	Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών NIH 3T3 και HepG2	87
4.2.	Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων	88
4.3.	Καλλιέργεια κυττάρων σε φλάσκα (ή τρυβλίο Petri)	88
4.4.	Αλλαγή θρεπτικού υλικού	89
4.5.	Θρυψινοποίηση κυττάρων	89
4.6.	Πάγωμα των κυττάρων	90
4.7.	Μονιμοποίηση κυττάρων	90
5.	Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας	91
5.1.	Δοκιμασία MTS	91
5.2.	Δοκιμασία NRU	92
6.	Πρωτόκολλο ηπατικής διαφοροποίησης των WJ-MSCs κυττάρων	93
7.	Ανοσοκυτταροχημεία ICC (ανοσοϊστοχημεία σε κυτταρικές σειρές)	95
8.	Στατιστική Ανάλυση	96

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.	Μελέτη ουσιών γενικευμένης και ηπατικής τοξικότητας, σε 8 κλιμακούμενες συγκεντρώσεις	99
1.1.	Προετοιμασία των συγκεντρώσεων και υπολογισμός των διαδοχικών αραιώσεων των δοκιμαζόμενων ουσιών για τις δοκιμασίες in vitro τοξικότητας	99
1.2.	Οι τιμές IC50	103
1.3.	Οι τιμές LD50	105
2.	Συσχέτιση γραμμικών παλινδρομήσεων WJ-MSCs - NIH 3T3 - HepG2 για το σύνολο των ουσιών	108
3.	Συσχέτιση γραμμικών παλινδρομήσεων WJ-MSCs - NIH 3T3 - HepG2 για τις ηπατοτοξικές ουσίες	110
4.	Αποτελέσματα πρόβλεψης τοξικότητας για το σύνολο των ουσιών	112
5.	Αποτελέσματα πρόβλεψης ηπατοτοξικότητας για τις ηπατοτοξικές ουσίες	113

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.	Συμπεράσματα πειραματικών αποτελεσμάτων	115
1.1.	Συμπέρασμα αποτελεσμάτων γενικευμένης τοξικότητας	115
1.2.	Συμπέρασμα αποτελεσμάτων ηπατοτοξικών ουσιών	115
1.3.	Μελλοντικές έρευνες	116

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

119



## Συντμήσεις

*hESCs: human Embryonic Stem Cells*

*iPSCs: induced Pluripotent Stem Cells*

*WJ-hMSCs: Wharton Jelly – human Mesenchymal Stem Cells*

*UC-MSCs: Umbilical Cord – Mesenchymal Stem Cells*

*hUVECs: human Umbilical Vein Endothelial Cells*

*UCB-MSCs: Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells*

*3Rs: Reduction, Refinement, Replacement*

*PBPK: Physiologically Based Pharmacokinetic Model*

*EURL-ECVAM: European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing*

*ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, USA*

*EST: Embryonic Stem cell Test*

*IC50: The half maximal Inhibitory Concentration*

*ID50: The half maximal inhibition of differentiation*

*LD50: The half maximal Lethal Dose*

*EC50: The term half maximal Effective Concentration*

*HepG2: Human hepatocellular carcinoma cells*

*HepaRG: Isolated from a donor with cholangiocarcinoma cells*

*HPH/HH: Human Primary Hepatocytes*

*PK: Pharmacokinetics*

*TK: Toxicokinetics*

*ADME: Absorption, Aistribution, Metabolism, and Excretion (in pharmacology)*

*ADR: Adverse Drug Reaction*

*MTS Assay: a Cell Proliferation Assay*

*NRU Assay: Neutral Ed Uptake Assay, for the estimation of Cell Viability*

*BALB/c 3T3: ινοβλάστες ποντικού*

*NHK: κερατινοκύτταρα ανθρώπου*

*NIH 3T3: αθανατοποιημένες ινοβλάστες ποντικού*

*OD: Optical Density*

*TAK-EIE: Τράπεζα Αρχεγόνων Κυττάρων- Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών*

*DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

*NEAA: Non-Essential Amino Acid*

*FBS: Fetus Bovine Serum*

*PBS: Phosphate Buffered Saline*

*TBS: Tris-Buffered Saline*

*DMSO: Dimethyl sulfoxide*

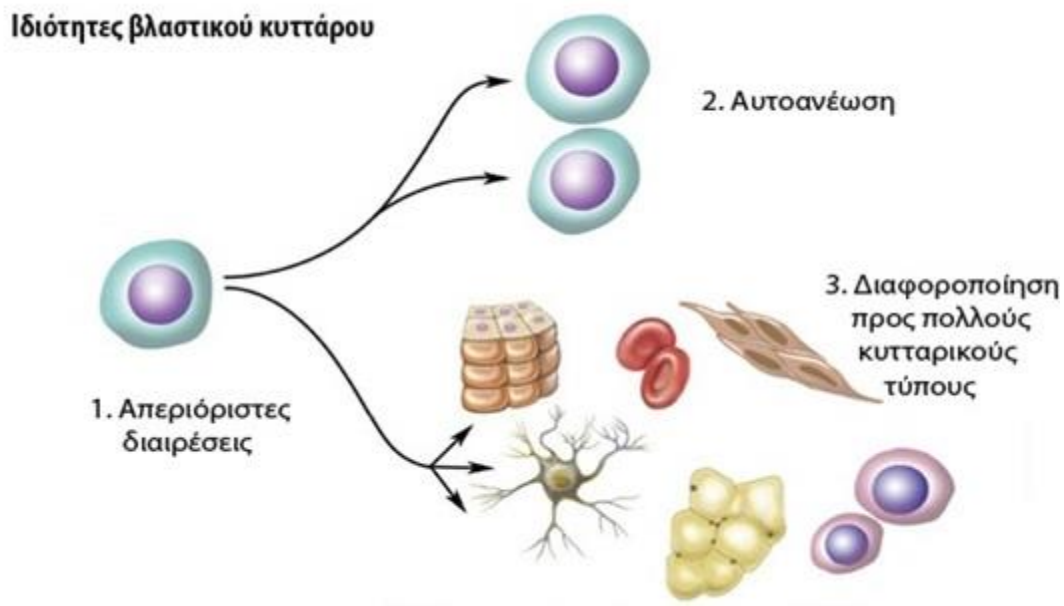
*ICC: ImmunoCytoChemistry*

*qRT-PCR: quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction*

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Βλαστικά κύτταρα: ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά

Ως «βλαστικό κύτταρο» χαρακτηρίζεται ένα κύτταρο που φέρει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Πρώτον, θα πρέπει να έχει ικανότητα αυτό-ανανέωσης (*self-renewal capacity*). Αυτό σημαίνει πως όταν ένα βλαστικό κύτταρο περάσει στη φάση της μιτωτικής διαίρεσης τότε θα δημιουργήσει είτε δύο ίδια βλαστικά κύτταρα (*συμμετρική διαίρεση*) ή ένα κύτταρο πανομοιότυπο με τον εαυτό του και ένα διαφοροποιημένο (*ασύμμετρη διαίρεση*), το οποίο θα μεταναστεύσει στον ανάλογο ιστό ή όργανο. Δεύτερον, το κύτταρο θα πρέπει να έχει την ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (*δυναμικό διαφοροποίησης*) και τρίτον, να δύναται να ανασυνθέτει *in vivo* λειτουργικούς ιστούς [1] (**Εικ.1**).



**Εικ. 1** Βασικά χαρακτηριστικά του βλαστικού κυττάρου

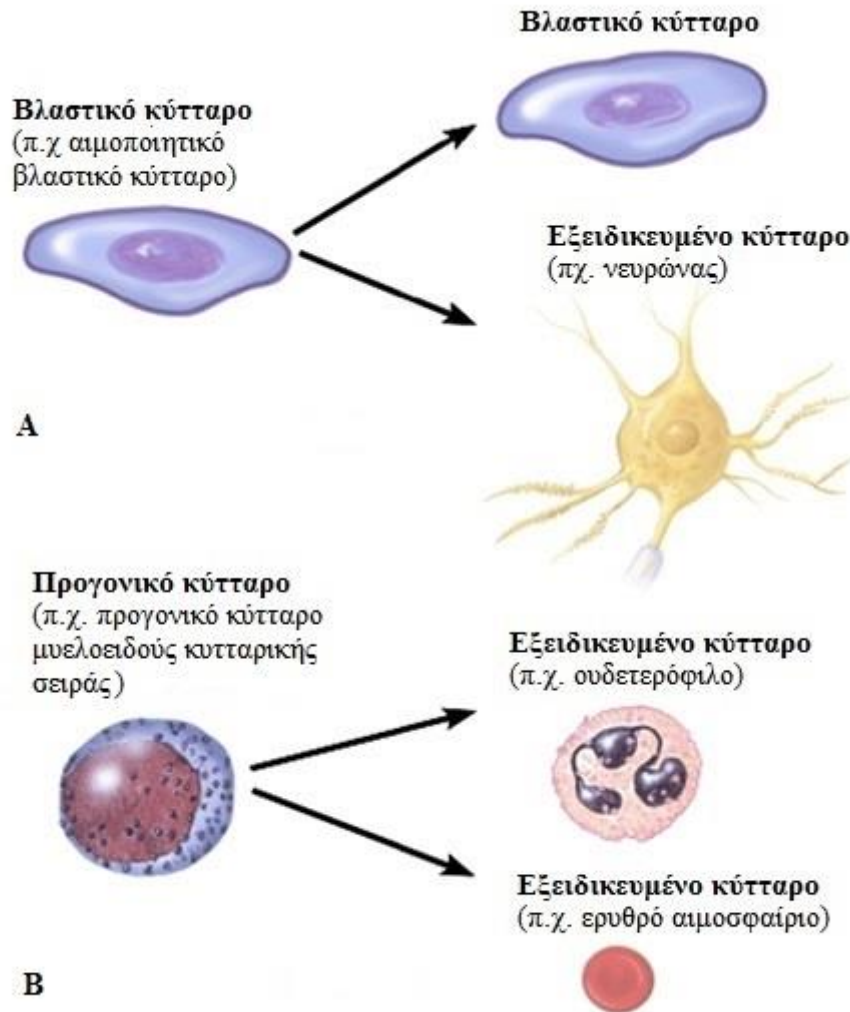
Διακρίνονται διαφορετικοί τύποι βλαστικών κυττάρων, ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησής τους [1]. Έτσι, ξεχωρίζουμε τα πλειοδύναμα (*pluripotent*) κύτταρα, στα οποία ανήκουν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (*embryonic stem cells*) που προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της

βλαστοκύστης, όπως επίσης και τα επαγόμενα πλειοδύναμα κύτταρα (*induced pluripotent stem cells, iPSCs*) που σχηματίζονται με τη μέθοδο του επαναπρογραμματισμού των ώριμων σωματικών κυττάρων σε κύτταρα με τις ιδιότητες των βλαστικών. Τα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ιστούς που προέρχονται και από τις τρεις εμβρυϊκές βλαστικές στιβάδες, δηλαδή του ενδοδέρματος, του μεσοδέρματος και του εξωδέρματος. Σε αντίθεση μ' αυτά, τα πολυδύναμα (*multipotent*) βλαστικά κύτταρα, έχουν την δυνατότητα της αυτό-ανανέωσης, αλλά η ικανότητα διαφοροποίησής τους είναι περιορισμένη. Μπορούν να ωριμάσουν σε κύτταρα του ιστού ή του οργάνου από το οποίο προέρχονται και ο κύριος ρόλος τους είναι να τα συντηρούν και να τα επιδιορθώνουν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων είναι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα λιπώδους ιστού, οστού και χόνδρου. Μία τρίτη κατηγορία βλαστικών κυττάρων είναι τα ολιγοδύναμα (*oligopotent*) ή μονοδύναμα (*unipotent*), τα οποία παράγονται και διαφοροποιούνται μέσα στους ιστούς. Η ονομασία τους προέρχεται από την ιδιότητά τους να μπορούν να σχηματίσουν τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα ενός μόνο ειδικού ιστού (ιστοειδικότητα). Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα ολιγοδύναμων βλαστικών κυττάρων, καθώς είναι ικανά να διαφοροποιηθούν τόσο σε μυελοειδή, όσο και σε λεμφοειδή κύτταρα (**Εικ.2**). Υπάρχουν επίσης, μελέτες που απέδειξαν ότι, τα κύτταρα των διακλαδώσεων του βρογχοκυψελιδικού αγωγού στους πνεύμονες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε βρογχικό επιθήλιο και σε κυψελιδικό επιθήλιο [2].

Η δημόσια συζήτηση γύρω από τα βλαστικά κύτταρα έχει πάρει μεγάλες διαστάσεις σε ότι αφορά τις εφαρμογές τους στην αναγεννητική ιατρική (*regenerative medicine*), την χρήση τους στους τομείς της γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας, καθώς και τη μελέτη της ανάπτυξης και εξέλιξης πολλών ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ειδικές κυτταρικές σειρές βλαστοκυττάρων για συγκεκριμένες ασθένειες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην μελέτη νέων φαρμάκων [3]. Παρά το γεγονός ότι υπάρχει πλέον σαφέστατη πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί στη χρήση τους, οι οποίοι απορρέουν κυρίως από το ότι:

- A. υπάρχουν ζητήματα ηθικής φύσεως στην χρήση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, καθώς η απομόνωσή τους προϋποθέτει την καταστροφή βλαστοκύστεων,
- B. τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσουν όγκους στα ποντίκια (τερατώματα) και

Γ. υπάρχουν προβλήματα που ανακύπτουν σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων λόγω έλλειψης ιστοσυμβατότητας.



Εικ. 2 Συμμετρική και ασύμμετρη διαίρεση των βλαστικών κυττάρων

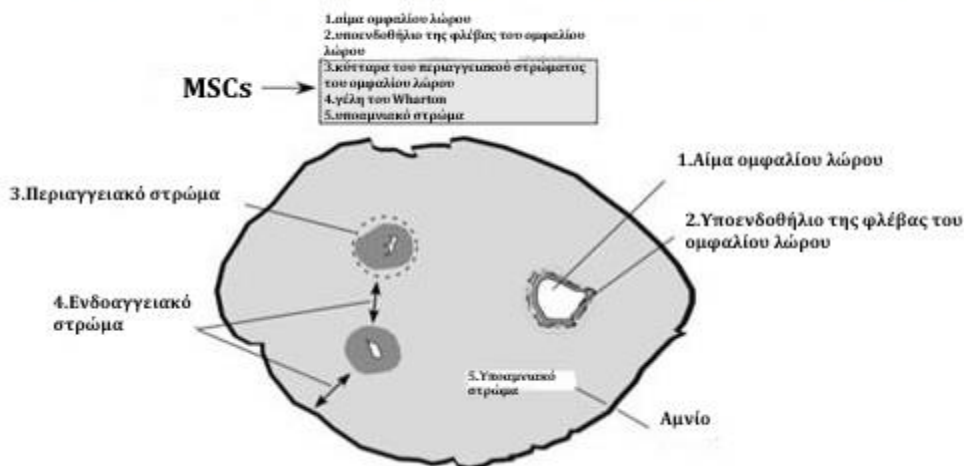
2. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton (ομφάλιος λώρος) και οι περιοχές απομόνωσής τους.

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το έμβρυο και ο πλακούντας συνδέονται με τον ελαστικό ομφάλιο λώρο (UC), ο οποίος περιέχει αιμοφόρα αγγεία. Οι ανταλλαγές ουσιών μεταξύ μητέρας-εμβρύου γίνονται διαμέσου του πλακούντα και του ομφάλιου λώρου. Ο ομφάλιος λώρος σχηματίζεται από τμήμα του λεκιθικού σάκου και της αλλαντοϊκής μεμβράνης. Παράλληλα, ο ομφάλιος λώρος παρέχει προστασία στα αιμοφόρα αγγεία από την συμπίεση, την στρέψη και την κάμψη, εξασφαλίζοντας έτσι, τη φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος από και προς το έμβρυο. Ανατομικά, ο ομφάλιος λώρος αποτελείται από δύο αρτηρίες και μία φλέβα. Τα τρία αυτά αγγεία είναι ενσωματωμένα μέσα σε μία ειδική βλενώδη μήτρα πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, που ονομάζεται γέλη του Wharton και καλύπτεται εξωτερικά από αμνιακό επιθήλιο. Η γέλη του Wharton περιέχει ένα πληθυσμό πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων στρώματος (*MSCs*), με μορφολογικά χαρακτηριστικά ινοβλαστών, που περιγράφονται με τον όρο *WJ-hMSCs* (*Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells*). Η προγενέστερη ονομασία τους ήταν «βλαστικά κύτταρα της μήτρας του ομφάλιου λώρου» (*UC-MSCs – Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells*), έτσι ώστε να διαφοροποιούνται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που απομονώνονται από την ομφάλια φλέβα (*hUVECs – Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), καθώς και από τα *MSCs* που απομονώνονται από το ομφάλιο αίμα (*UCB-MSCs – Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells*) [4].

Μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί διάφοροι τύποι βλαστικών κυττάρων από τις παρακάτω διακριτές περιοχές:

1. τον αμνιακό σάκο (από την εξωτερική επιθηλιακή στοιβάδα και την εσωτερική υποαμνιακή μεσεγχυματική στοιβάδα),
  2. τον χώρο της γέλης του Wharton (*WJ*),
  3. τον περιαγγειακό χώρο που περιβάλλει τα αγγεία, το υγρό και τον εξωτερικό χιτώνα των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων του ομφάλιου λώρου,
  4. τον ενδοθηλιακό χώρο (εσωτερικό τοίχωμα των φλεβών) και
  5. τον αγγειακό χώρο (το αίμα που βρίσκεται μέσα στα αιμοφόρα αγγεία του ομφάλιου λώρου)
- [5] (**Εικ.3**).

## ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ MSCs



Εικ. 3 Τυπική απεικόνιση της διαμόρφωσης του ομφαλίου λώρου στα θηλαστικά

Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί όροι όπως «υποαμνιακά», «ενδοαγγειακά», «περιαγγειακά» και "hUVEC" κύτταρα, ωστόσο η ακριβής ονοματολογία για αυτούς τους τύπους κυττάρων δεν έχει οριστικοποιηθεί ακόμα. Επιπλέον, μέχρι στιγμής δεν έχουν τυποποιηθεί απόλυτα οι μέθοδοι απομόνωσης και η περιοχή ενδιαφέροντος για τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton στον άνθρωπο (από εδώ και πέρα θα χρησιμοποιείται ο όρος WJ – hMSCs). Το γεγονός ότι δεν υπάρχει, ιστολογικά, σαφής διαχωρισμός μεταξύ των διαμερισμάτων, που περιγράφονται παραπάνω, δεν επιτρέπει την κατανόηση, αν οι απομονωμένοι πληθυσμοί βλαστοκυττάρων είναι ίδιοι ή διαφορετικοί. Επιπλέον, υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα απομόνωσης βλαστικών κυττάρων, κάτι που συμβάλει στην ακόμα μεγαλύτερη ετερογένεια μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών των βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton. Τα WJ-MSCs μπορούν να απομονωθούν κυρίως από δύο περιοχές, την ενδοαγγειακή περιοχή και το υποάμνιο. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί και η απομόνωση WJ-MSCs από την περιαγγειακή ζώνη. Έχουν πραγματοποιηθεί δομικές, ανοσοϊστοχημικές και λειτουργικές *in vitro* αναλύσεις, οι οποίες έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων μεταξύ των τριών αυτών περιοχών. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι περιοχές αυτές μπορεί να προέρχονται από διαφορετικές προϋπάρχουσες δομές [6]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα WJ-hMSCs που βρίσκονται κοντά



στην αμνιακή επιφάνεια, εμφανίζουν ενισχυμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ τα WJ-hMSCs που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με τα ομφάλια αγγεία εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα διαφοροποίησης.

### 3. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton

Η Διεθνής Επιτροπή για την Κυτταρική Θεραπεία (*International Society for Cellular Therapy*) έχει προτείνει τρία κριτήρια, με τα οποία καθορίζεται ο μεσεγχυματικός – βλαστικός χαρακτήρας ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Πιο συγκεκριμένα, τα MSCs πρέπει:

1. να εμφανίζουν ιδιότητες πλαστικότητας και κυτταρικής προσκόλλησης,
2. να μην εκφράζουν ή να εκφράζουν συγκεκριμένα ειδικούς δείκτες επιφανείας (να είναι αρνητικά για τους CD45-, CD34-, CD14-, CD11b-, CD79a-, CD19- και τα 2ης τάξης αντιγόνα λευκοκυττάρων στον άνθρωπο [HLA] και θετικά για άλλα επιφανειακά αντιγόνα όπως τα CD73+, CD29+, CD105+, CD90+) (**Πίνακας 1**) και
3. σε *in vitro* δοκιμασίες θα πρέπει να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα καθώς και σε κύτταρα μυός, λιπώδους ιστού και τένοντα.

Το 2010, ο Κίτα και οι συνεργάτες [7] του έθεσαν τα θεμέλια για το χαρακτηρισμό των κυττάρων της γέλης του Wharton, διαμορφώνοντας μία εικόνα του φαινοτυπικού προφίλ των βλαστικών κυττάρων που απομονώθηκαν από διαφορετικές περιοχές του ομφαλίου λώρου του ανθρώπου. Παρόλα αυτά, η δυνατότητα ακριβούς προσδιορισμού των χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton που απομονώνονται από διαφορετικές περιοχές, παρουσιάζει δυσκολίες εξαιτίας της υψηλής ετερογένειας των κυτταρικών πληθυσμών κατά την απομόνωση, την καλλιέργεια, και τις διαδικασίες ανάλυσής τους. Εν τούτοις, τα κύτταρα της γέλης του Wharton ικανοποιούν τα απαραίτητα κριτήρια για να χαρακτηρίζονται ως μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ή κύτταρα στρώματος:

<b>Μοριακός φαινότυπος μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενα από τη γέλη του Wharton</b>	
<b>WJ-MSCs:</b>	<b>WJ-MSCs:</b>
<b>Θετικοί κυτταρικοί δείκτες (επιφανειακά αντιγόνα)</b>	<b>Αρνητικοί κυτταρικοί δείκτες (επιφανειακά αντιγόνα)</b>
CD90	CD45
CD73	CD34
CD105	CD79A
CD13	CD19
CD44 (receptor of hyaluronic acid)	CD14
CD29/ CD49e (integrin for fibronectin)	CD11B
CD49b	HLADR
CD49f	
CD54	
CD166	
CD140a (receptor of PDGF)	

**Πίνακας 1** Η έκφραση των πρωτεϊνικών δεικτών επιφανείας των WJ-MSCs

1. διαθέτουν ικανότητα προσκόλλησης,
2. είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα χόνδρου, λίπους και οστών και
3. εκφράζουν τους παρακάτω δείκτες επιφανείας: CD105+ (ενδογλίνης, SH2), CD73+ (SH3), CD90+ (Thy-1), HLA-A,B,C+ (MHC τάξης I), CD34, CD45-, HLA-DR- (MHC τάξης II) [9].

Είναι εντυπωσιακό πως τα WJ-hMSCs, παράλληλα με τις ιδιότητες μεσεγχυματικών κυττάρων, παρουσιάζουν και ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ESCs). Συγκεκριμένα, τα WJ-hMSCs εκφράζουν τους δείκτες Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1 (στάδιο-ειδικό εμβρυϊκό αντιγόνο-1), SSEA-4, αλκαλική φωσφατάση, ενώ σχηματίζουν και *in vitro* “εμβρυοειδή σωματίδια”. Επιπλέον, εκφράζουν τους δείκτες πλειοδυναμίας Oct-4, Sox-2 και Nanog. Η έκφραση αυτή παρουσιάζεται σε χαμηλότερα επίπεδα από ό, τι στα ESCs. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν με δοκιμασίες ποσοτικής qRT-PCR και μελέτες ανάλυσης μικροσυστοιχιών. Τα προαναφερθέντα δεδομένα δεν δείχνουν ότι τα WJ-MSCs είναι ολοδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα, αποδεικνύουν όμως, ότι είναι πολυδύναμα. Οι μελέτες έκφρασης των γονιδίων με μικροσυστοιχιές επιβεβαιώνουν επίσης ότι τα WJ-hMSCs εκφράζουν δείκτες και των τριών αρχέγονων βλαστικών στοιβάδων [8].

#### 4. Ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων στη βασική έρευνα

Τα βλαστικά κύτταρα, στο σύνολό τους, προσφέρουν τη δυνατότητα για επιστημονικές μελέτες που εκτείνονται πέραν της αναγεννητικής ιατρικής. Προσφέρουν μία διέξοδο μέσα από την οποία είτε θα αναθεωρηθούν ή θα επισφραγιστούν πολλά από τα θεμελιώδη βιολογικά ερωτήματα. Παρατηρώντας τον τρόπο με τον οποίο τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα παράγουν εξειδικευμένα κύτταρα, είναι σαν να παρακολουθούμε την πρώιμη ανάπτυξη των ιστών και των οργάνων στο ανθρώπινο σώμα. Με την έρευνα πάνω στα βλαστικά κύτταρα μπορούμε να καταγράψουμε τις επιπτώσεις των γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να υπάρξουν μελέτες που να στοχεύουν στο κυρίαρχο ρόλο των γονιδίων στην ανάπτυξη του ανθρώπου και τον ρόλο των μεταλλάξεων στην απορρύθμιση των φυσιολογικών λειτουργιών. Επιπλέον, θα μπορεί να μελετηθεί σε βάθος ο τρόπος με τον οποίο οι διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες εισβάλλουν και καταστρέφουν τα κύτταρα του ανθρώπου. Ταυτόχρονα, από αυτές τις μελέτες μπορούν να προκύψουν συμπεράσματα για τη συμμετοχή των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην πρόκληση και επαγωγή των διαφόρων τύπων καρκίνου και άλλων νοσημάτων, καθώς και για την κυτταρική γήρανση και την φυσιολογικά προκαλούμενη αλλοίωση του γενετικού προφίλ των κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν επίσης να αποτελέσουν τομή στην παραδοσιακή χημική ιατρική. Η ικανότητά τους να διαιρούνται για μεγάλες χρονικές περιόδους και να διαφοροποιούνται σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων, καθιστά δυνατή και αξιόπιστη τη χρήση τους ως εργαλεία ελέγχου φαρμακευτικών ουσιών και αξιολόγησης των παρενεργειών των τοξινών, χωρίς να τίθεται κανένα ζήτημα κινδύνου για την υγεία των προσφερόμενων εθελοντών. Στο μέλλον, θα μπορεί να ελεγχθεί ταχέως η κυτταροτοξικότητα χιλιάδων ουσιών σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων που έχουν παραχθεί από βλαστοκύτταρα, κάνοντας έτσι την ανακάλυψη και χρήση των νέων φαρμάκων αποτελεσματικότερη και με πολύ χαμηλότερο κόστος.

Η διαδικασία που αποκαλείται πυρηνική μεταφορά αποτελεί μία άλλη πιθανή μέθοδο παραγωγής εμβρυικών βλαστοκυττάρων. Στα ζώα η πυρηνική μεταφορά διενεργείται με την εισαγωγή του πυρήνα ενός ήδη διαφοροποιημένου ενήλικου κυττάρου- για παράδειγμα ενός κυττάρου του δέρματος-σε ένα ωάριο από το οποίο έχει αφαιρεθεί ο πυρήνας. Το ωάριο αυτό, που πλέον περιέχει το γενετικό υλικό του κυττάρου του δέρματος, διεγείρεται ώστε να σχηματίσει μία βλαστοκύστη από

την οποία μπορούν να παραχθούν εμβρυικά βλαστοκύτταρα. Συνεπώς τα βλαστοκύτταρα που δημιουργούνται με τη μέθοδο αυτή, θα αποτελούν «κλώνους» του αρχικού ενήλικου κυττάρου, καθώς το πυρηνικό DNA τους, είναι όμοιο με το δικό του. Η χρήση της πυρηνικής μεταφοράς μπορεί να αποτελέσει βασικό εργαλείο για τον έλεγχο φαρμάκων που στοχεύουν σε γενετικές ασθένειες. Παραδείγματος χάρη, είναι δύσκολο να μελετηθεί η εξελικτική πορεία της νόσου Alzheimer ή του Parkinson εντός των εγκεφάλων ζώντων ασθενών (*in vivo*). Απομονώνοντας, όμως, κύτταρα εγκεφάλου ασθενούς που πάσχει από τη νόσο του Alzheimer και δημιουργώντας σειρά βλαστοκυττάρων με τη μέθοδο της πυρηνικής μεταφοράς, θα είναι δυνατή α) η ανίχνευση της πορείας της ασθένειας εργαστηριακά και β) η *in vitro* δοκιμή φαρμάκων για την αναγέννηση των κυττάρων που έχουν καταστραφεί, χωρίς να εκτίθεται σε κίνδυνο η υγεία του ασθενούς [9].

## 5. Μέθοδοι μελέτης της τοξικότητας χωρίς τη χρήση ζώων

### 5.1. Το εναλλακτικό κίνημα των 3Rs

**ANIMAL RESEARCH : researchers place a high priority on "The Three Rs".**

<p>Of the <b>98</b> Nobel Prizes awarded for Physiology or Medicine, <b>75</b> were directly dependent on animal research.  <a href="http://speakingofresearch.com/facts/the-animal-model/">http://speakingofresearch.com/facts/the-animal-model/</a></p>	<p><b>REDUCTION:</b>            Any strategy that will result in fewer animals being used in research.</p>	<p><b>REPLACEMENT:</b>            Methods which avoid or replace the use of animals in research.</p>	<p>Immunizations against <b>polio, diphtheria, mumps, rubella and hepatitis</b> save countless lives.  <a href="http://www.mofed.org/Animal_Research.htm">http://www.mofed.org/Animal_Research.htm</a></p>
<p>We share approximately <b>99%</b> of our DNA with mice.  <a href="http://speakingofresearch.com/facts/the-animal-model/">http://speakingofresearch.com/facts/the-animal-model/</a></p>			<p><b>95%</b> of all lab animals are specialty-bred rats and mice.  <a href="http://speakingofresearch.com/facts/the-animal-model/">http://speakingofresearch.com/facts/the-animal-model/</a></p>
<p><b>REFINEMENT</b>            Modification of experimental procedures in order to minimize pain.            A Time Out for the Mice: Szczepan Baran <a href="http://www.mendelstopod.com/podcast/a-time-out-for-the-mice-szczepan-baran">http://www.mendelstopod.com/podcast/a-time-out-for-the-mice-szczepan-baran</a></p>			
<p><b>"Thanks to animal research, many diseases that once killed millions of people every year are either treatable or have been eradicated altogether."</b> Frankie L. Trull President of Foundation of Biomedical Research <a href="http://www.mofed.org/Animal_Research.htm">http://www.mofed.org/Animal_Research.htm</a></p>			

Εικ. 4 Το εναλλακτικό κίνημα 3Rs

Το 1959, οι Βρετανοί ερευνητές Russell και Burch, εισήγαγαν για πρώτη φορά την έννοια των τριών R (*Reduction, Refinement and Replacement* ή *Μείωση, Βελτίωση και Αντικατάσταση*) στο κλασικό τους έργο, «*Οι Αρχές των μη βάνουσων πειραματικών τεχνικών*», θέτοντας τις βάσεις του εναλλακτικού κινήματος των 3Rs. Η εξέλιξη αυτή έχει αποτελέσει τομή στην ανάπτυξη δοκιμασιών που 1) μειώνουν τον αριθμό των ζώων που απαιτούνται για ένα πείραμα, 2) βελτιώνουν τις υπάρχουσες δοκιμασίες με την ελαχιστοποίηση του πόνου και του στρες των ζώων και 3) στοχεύουν στην πλήρη αντικατάσταση των υπάρχοντων ζωικών μοντέλων με εναλλακτικές μεθόδους [10] **(Εικ.4)**.

### 5.1. *In vitro* τοξικότητα

Η εις βάθος μελέτη μη-γενετοξικών (μη σχετιζόμενων, δηλαδή, με κυτταρογενετικές μεταλλαγές) *in vitro* δοκιμασιών τοξικότητας επανήλθε στο προσκήνιο στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Σε γενικές γραμμές, η *in vitro* τοξικότητα αφορά δοκιμές που δεν χρησιμοποιούν σπονδυλωτά ως συστήματα μοντελοποίησης. Η *in vitro* τοξικότητα αποτελεί την μελέτη των τοξικών επιδράσεων, όπως παρατηρούνται σε ένα σύστημα έξω από το σώμα ενός ζώντος οργανισμού [11]. Η *in vitro* κυτταροτοξικολογία ή κυτταροτοξικότητα αναφέρεται στη χρήση τεχνικών κυτταρικής καλλιέργειας στις έρευνες τοξικολογίας. Τα μοντέλα κυττάρων μπορεί να είναι είτε καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων ή αθανатоποιημένων και μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών ή βλαστικών κυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ορθή παρατήρηση των αποτελεσμάτων αυτής της δοκιμασίας είναι να υπάρχουν βασικές γνώσεις για την τοξικολογία των χημικών ουσιών που μελετώνται όπως είναι η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση τους.

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των *in vitro* μελετών είναι τα παρακάτω:

1. η δυνατότητα χρήσης κυττάρων του ανθρώπου,
2. η συγκριτική ευκολία στο χειρισμό των κυττάρων σε σχέση με τα ζωικά μοντέλα και η ευκολότερη λήψη αποτελεσμάτων,
3. η ευκολότερη εφαρμογή σύγχρονων βιοχημικών, κυτταρικών και μοριακών τεχνικών σε μηχανιστικές μελέτες, και
4. η δυνατότητα ανάλυσης μειγμάτων χημικών ουσιών

Παρόλα αυτά, υπάρχουν και δυσκολίες στις εφαρμογές των *in vitro* μεθόδων τοξικολογίας που αφορούν στο γεγονός ότι οι κυτταρικές καλλιέργειες είναι πολύ πιο απλοποιημένα συστήματα συγκριτικά με τον οργανισμό, στην αδυναμία μελέτης και διεξαγωγής συμπερασμάτων σχετικών με την ακριβή λειτουργία κρίσιμων συστημάτων του οργανισμού (π.χ. ορμονικό, ανοσοποιητικό, νευρικό σύστημα), και στον περιορισμό των περισσότερων *in vitro* δοκιμασιών σε δοκιμές οξείας τοξικότητας. Απόρροια των παραπάνω είναι η έλλειψη σαφήνειας των *in vitro* αποτελεσμάτων τοξικότητας συγκριτικά με τις αναμενόμενες επιδράσεις των εξεταζόμενων φαρμάκων στον οργανισμό του ανθρώπου.

## 5.2. Τελικά σημεία της *in vitro* τοξικότητας (endpoints)

Έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά τελικά σημεία για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας, τα οποία περιλαμβάνουν μετρήσεις διαφόρων βιολογικών παραμέτρων, όπως είναι οι παρακάτω:

A. Κυτταρικός θάνατος: μη-ειδικό τελικό σημείο, με το οποίο δεν δίνεται η δυνατότητα διερεύνησης των μηχανισμών που τον προκάλεσαν. Οι διάφορες χημικές ουσίες σκοτώνουν τα κύτταρα είτε με άμεση βλάβη των δομικών συστατικών του κυττάρου ή με έμμεση παρεμβολή στην κανονική φυσιολογία και το μεταβολισμό του κυττάρου.

B. Κυτταρική βιωσιμότητα: τελικό σημείο είναι η μέτρηση των ζωντανών κυττάρων.

Γ. Διαρροή της μεμβράνης: τελικό σημείο μέτρησης της κυτταρικής βλάβης είναι η εκτίμηση της εξωκυττάρωσης κυτταρικών συστατικών ή προϊόντων.

Δ. Ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός των κυττάρων: τελικό σημείο είναι ο προσδιορισμός του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μείωσης της σύνθεσης του DNA.,

E. Μορφολογία των κυττάρων: άρρηκτα συνδεδεμένες με την κυτταροτοξικότητα είναι οι μορφολογικές αλλαγές του κυττάρου. Τελικό σημείο είναι η εκτίμηση των αλλαγών στο μέγεθος, το σχήμα ή την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Στ. Κυτταρική λειτουργία: τελικό σημείο μέτρησης είναι η αποτίμηση της θερμοδυναμικής και μεταβολικής λειτουργίας. Το ATP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κυτταροτοξικότητας, αφού αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας του κυττάρου [12]. Ως δείκτες κυτταροτοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης, η αναστολή των μεταβολικών διεργασιών, η εξάντληση συν-παραγόντων

και η ελάττωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας (π.χ. ΜΤΤ, ΜΤΣ και ΧΤΤ: δοκιμασίες άλατος τετραζολίου).

Ζ. Κυτταρική προσκόλληση: ως δείκτης κυτταροτοξικότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί η προσκόλληση στην επιφάνεια της καλλιέργειας, η αποκόλληση από την επιφάνεια καλλιέργειας, και η προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου.

### 5.3. Κυτταρικοί μηχανισμοί τοξικότητας

*Τρεις είναι οι βασικοί μηχανισμοί τοξικότητας: η βασική κυτταροτοξικότητα, η οργανοειδική κυτταροτοξικότητα και η τοξικότητα των οργανιδίων.*

Στις αρχές της δεκαετίας του '80 ο Ekwal και οι συνεργάτες του [13] εισήγαγαν για πρώτη φορά τον όρο «Βασική κυτταροτοξικότητα», η οποία βασίζεται στις τοξικογενείς βλάβες των βασικών λειτουργιών των κυττάρων, οι οποίες είναι αποτέλεσμα της δράσης των χημικών ουσιών σε αυτά. Εξαιτίας αυτής της επίδρασης, αναπόφευκτα θα επηρεαστούν και πιο εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες. Ως «βασική κυτταρική τοξικότητα» ορίζονται οι δυσμενείς επιπτώσεις στα λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Μελέτες πάνω στη βασική κυτταρική τοξικότητα μπορούν να πραγματοποιηθούν μόνο σε αδιαφοροποίητα κύτταρα. Σε επίπεδο κυττάρου, η επίδραση της «βασικής κυτταροτοξικότητας» παρατηρείται στους παρακάτω δομικούς και λειτουργικούς παράγοντες:

1. στην ακεραιότητα των μεμβρανών και του κυτταροσκελετού,
2. στον κυτταρικό μεταβολισμό (π.χ. ως συνάρτηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας),
3. στη σύνθεση του DNA και των πρωτεϊνών,
4. στη σύνθεση /αποικοδόμηση /απελευθέρωση συστατικών ή προϊόντων του κυττάρου,
5. στην ιοντική ρύθμιση (π.χ. αντλίες Na /K και αντλία Ca /K),
6. στην κυτταρική διαίρεση και
7. στις κυτταρικές διεργασίες, όπως μετάφραση/πρωτεϊνοσύνθεση (ριβοσώματα) ή κατάτμηση/φαγοκυττάρωση (λυσοσώματα).

Βάσει όσων περιγράφησαν παραπάνω, οι *in vitro* δοκιμές τοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι για την συγκριτική μελέτη της τοξικότητας πολλών ουσιών και πιθανώς να αποτελέσουν μεθόδους που θα αντικαταστήσουν της *in vivo* δοκιμές τοξικότητας, και πιο συγκεκριμένα τις δοκιμές οξείας θανατηφόρου τοξικότητας (acute lethal toxicity).

Εν τούτοις, η *in vitro* τοξικότητα δεν αποτελεί αποτελεσματική δοκιμή για χημικές ουσίες οι οποίες απαιτούν βιομετατροπή (δηλαδή ενδοκυττάριο μεταβολισμό). Για τέτοιου είδους ουσίες χρησιμοποιούνται καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων που προέρχονται από όργανα τα οποία διατηρούν υψηλό επίπεδο ενζυμικής δραστηριότητας. Επιπρόσθετα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλου PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetic model) σε συνδυασμό με πληροφορίες σχετικές με την βιοκινητική των χημικών ουσιών. Το μοντέλο PBPK χρησιμοποιείται ως προσομοιωτής των δυναμικών της χημικής απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης των χημικών ουσιών και φαρμάκων στη κυτταρική σειρά που μελετάται [14].

Η «οργανοειδική τοξικότητα» ουσιαστικά αποτελεί κομμάτι της βασικής κυτταροτοξικότητας, η οποία εμφανίζεται στα όργανα - στόχους. Η μελέτη της οργανοειδικής κυτταροτοξικότητας απαιτεί καλλιέργειες πρωτογενών, πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων προερχόμενα από διαφορετικά όργανα.

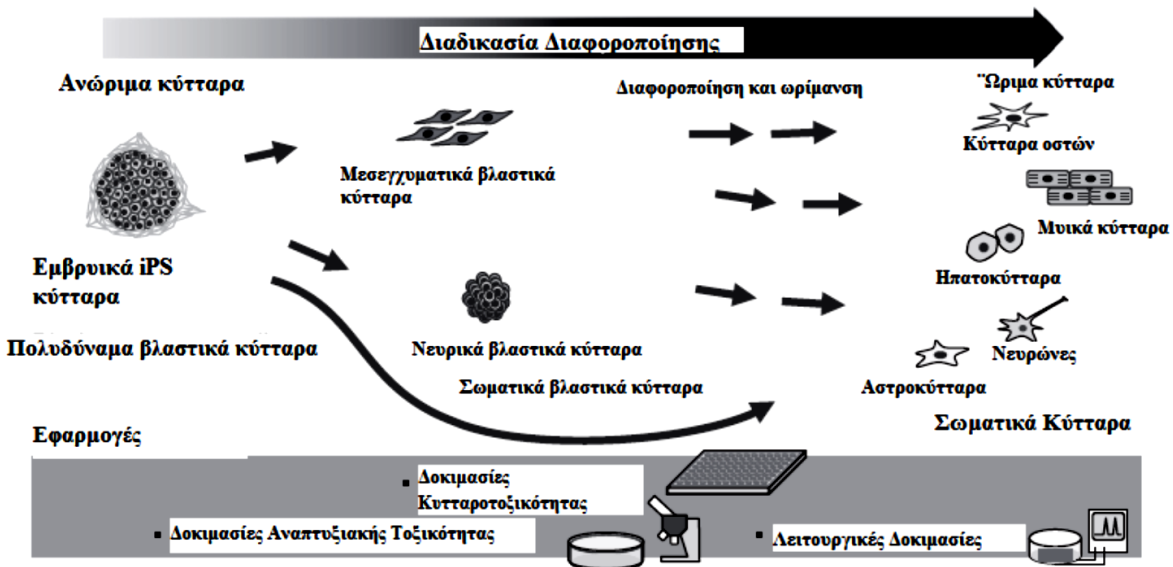
Τέλος η τοξικότητα των οργανιδίων θα μπορούσε να μελετηθεί έμμεσα σε κυτταρικές καλλιέργειες με εξέταση των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων.

## **6. Τα βλαστικά κύτταρα ως εργαλεία εκτίμησης της τοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών**

Οι δοκιμασίες τοξικότητας με τη χρήση των βλαστικών κυττάρων μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες, βάσει της τοξικότητας που προκαλούν στα κύτταρα:



1. δοκιμασίες κυτταρικής τοξικότητας: υπολογίζεται η οξεία τοξικότητα των κυττάρων προκαλούμενη από φαρμακευτικές ουσίες με τον προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης και τον υπολογισμό του ποσοστού επιβίωσης,
2. δοκιμασίες αναπτυξιακής τοξικότητας: υπολογίζεται η αναστολή της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων σε διαφόρους τύπους κυτταρικών σειρών,
3. λειτουργικές δοκιμασίες τοξικότητας: προσδιορίζεται η αναστολή ή η διέγερση της κυτταρικής λειτουργίας των διαφοροποιημένων κυττάρων [15, 16] (Εικ.5).



*Εικ 5 Τα αναπτυξιακά στάδια των βλαστοκυττάρων σε συνδυασμό με τις εφαρμογές τους σε τοξικολογικές αναλύσεις. Τόσο τα ανώριμα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα όσο και τα σωματικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας για να αξιολογηθεί η καταστροφική επίδραση των τοξικών ουσιών στην επιβίωση αλλά και οι επιδράσεις στην κυτταρική διαφοροποίηση*

## 6.1. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες μελέτης της τοξικότητας

Όλες οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας στοχεύουν, σε γενικές γραμμές, στον προσδιορισμό των επιδράσεων των υπό δοκιμή φαρμακευτικών ουσιών σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πολυτρυβλία 96 βοθρίων και επεξεργάζονται στις εκάστοτε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις για τις χημικές ουσίες δοκιμής. Τα ποσοστά της κυτταρικής επιβίωσης που προκύπτουν, αποτελούν και το βαθμό τοξικότητας. Μέχρι σήμερα, έχει δοκιμαστεί μία πληθώρα τεχνικών τοξικότητας σε ιστοειδικές κυτταρικές σειρές με χαρακτηριστική εγγενή κυτταρική λειτουργία, μέσω των οποίων έχουν σχεδιαστεί απλουστευμένες *in vitro* δοκιμασίες τοξικότητας, οι οποίες μπορούν να αντικαθιστούν τις *in vivo* δοκιμασίες τοξικότητας [16]. Ένα παράδειγμα ιστοειδικής κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται ευρέως σε δοκιμασίες *in vitro* τοξικότητας, αποτελεί η κυτταρική σειρά Caco-2 προερχόμενη από αδενοκαρκίνωμα του επιθηλίου του παχέος εντέρου [17].

Παρά τα όσα περιεγράφηκαν παραπάνω, ο ίδιος ο ανθρώπινος οργανισμός χαρακτηρίζεται από εντυπωσιακά πολύπλοκες βιολογικές διαδικασίες συγκριτικά με τις απομονωμένες κυτταρικές σειρές. Αυτό οφείλεται στην άμεση ενεργοποίηση διαφορετικών μεταβολικών οδών (πολυπαραγοντικότητα) μετά από τη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών, όπως τα σύμπλοκα μετάλλων ή τα ξενοβιοτικά μικρού ΜΒ και την μετανάστευσή τους στα κύτταρα-στόχους. Παραδείγματα τέτοιων βιολογικών λειτουργιών αποτελούν: 1) η μετατροπή των ξενοβιοτικών, μετά την από του στόματος ή την υποδόρια λήψη τους, σε ουρία μέσω της διαδικασίας της πέψης ή της απορρόφησης μέσα στο αίμα και της κατανομής τους στους ιστούς, 2) ο αυστηρός έλεγχος στον οποίο υπόκεινται τα ξενοβιοτικά, όταν πρόκειται να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ώστε να προσληφθούν από τα νευρικά κύτταρα του ΚΝΣ.

Έχει αναφερθεί ότι, τα αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα έχουν πολύ διαφορετική απόκριση σε φάρμακα συγκριτικά με τις διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, τα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες στην καλλιέργεια και να εκφράζουν μόρια-φορείς, οι οποίοι μεταφέρουν τα ξενοβιοτικά έξω από το κύτταρο [16]. Πριν από περίπου μία δεκαετία δημοσιεύτηκε από τον Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (EURL-ECVAM) ένα πρωτόκολλο το οποίο περιγράφει τη δοκιμασία EST (Embryonic Stem cell Test). Με την δοκιμασία αυτή ερευνήθηκε η εμβρυϊκή τοξικότητα με τη χρήση εμβρυϊκών

βλαστοκυττάρων ποντικού, η οποία και επικυρώθηκε από επόμενες μελέτες [18]. Ταυτόχρονα, οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και κυτταρικής διαφοροποίησης χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των κινδύνων τοξικότητας από τις χορηγούμενες χημικές ενώσεις, με τη χρήση υπολογιστικών φύλλων. Στην προαναφερθείσα μέθοδο, έχουν βασιστεί πολλές δοκιμασίες ES τοξικότητας με τη χρήση διαφορετικών κυτταρικών σειρών βλαστοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, για μετρήσεις ES τοξικότητας χρησιμοποιούνται σωματικά βλαστικά κύτταρα, ενώ για μετρήσεις τοξικότητας μετάλλων βιοϊατρικής χρήσης χρησιμοποιούνται νευρικά και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα [19]. Σε πολλές μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν εξίσου πολυδύναμα και σωματικά βλαστικά κύτταρα σε δοκιμασίες τοξικότητας και διαφοροποίησης. Το αποτέλεσμα αυτών των συνδυαστικών μεθόδων ήταν η καταγραφή και ο υπολογισμός της αναπτυξιακής τοξικότητας των βλαστοκυττάρων [19-21].

Με τις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας υπολογίζεται η κυτταρική καταστροφή (απόπτωση, κυτταρικός θάνατος, αδυναμία διαφοροποίησης). Μία παρατήρηση, όμως, που πρέπει να γίνει είναι η εξής: η τιμή IC50 ποικίλει ανάλογα με τη σύσταση του καλλιεργητικού μέσου που χρησιμοποιείται στην κυτταρική καλλιέργεια. Τα βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά σε διαφορετικό καλλιεργητικό μέσο σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές και άρα, τα δεδομένα που λαμβάνουμε με τη χρήση βλαστοκυττάρων, χρειάζονται περαιτέρω ανάλυση, ώστε να υπάρχει ορθή σύγκριση με τις καθιερωμένες τιμές συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών (control).

## **6.2. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες μελέτης αναπτυξιακής τοξικότητας**

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, πιθανές μη φυσιολογικές διαφοροποιήσεις των βλαστικών κυττάρων οδηγούν σε αναπτυξιακές ανωμαλίες και καρκινογένεση. Οι δοκιμασίες αναπτυξιακής τοξικότητας χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των κινδύνων που προκαλούν οι παραπάνω μη φυσιολογικές διαφοροποιήσεις, μετρώντας το βαθμό διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Μερικές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για αυτούς τους υπολογισμούς είναι η κυτταρομετρία ροής, η μέτρηση αποικιών ελευθέρων κυττάρων, η γονιδιακή έκφραση και η μικροσκοπία φθορισμού [20]. Βάσει των κανονισμών που ετέθησαν από τον EURL-ECVAM, στις δοκιμασίες εμβρυϊκής τοξικότητας ES, πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι

μελέτης της τοξικότητας συνδυαστικά με μεθόδους αναπτυξιακής τοξικότητας σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και σε 3T3 ινοβλάστες [18-21]. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζονται οι τιμές IC50 για τους 3T3 ινοβλάστες παράλληλα και συγκριτικά με τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Επιπρόσθετα, οι τιμές ID50 των βλαστικών κυττάρων (μείωση κατά 50% του βαθμού διαφοροποίησής τους) προκύπτουν από τον υπολογισμό του βαθμού διαφοροποίησής τους σε κύτταρα του μυοκαρδίου. Και οι 2 παραπάνω παράμετροι (IC50, ID50) λαμβάνονται υπόψιν σε μετρήσεις αναπτυξιακής τοξικότητας. Όσον αφορά, όμως, στο πρωτόκολλο αναπτυξιακής τοξικότητας ES, υπολογίζεται μόνο η τιμή ID50, εξαιτίας του γεγονότος ότι η διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων περιορίζεται μόνο σε καρδιομυοκύτταρα.

Αντίθετα με τις δοκιμασίες αναπτυξιακής τοξικότητας, όσο αφορά την νευρο-αναπτυξιακή τοξικότητα υπάρχουν ακόμα, πολλές μελέτες που πρέπει να προχωρήσουν, ώστε να προκύψουν ευαίσθητες τεχνικές για συγκριτικές μελέτες φαρμάκων διαφόρων νόσων που προσβάλλουν το ΚΝΣ. Έως τώρα, έχουν αναφερθεί νέες μέθοδοι με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και τεχνικών μεταγραφομικής ανάλυσης (qPCR, μικροσυστοιχίες) [22]. Για τις μετρήσεις της νευρο-αναπτυξιακής τοξικότητας χρησιμοποιούνται εξίσου πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και νευρικά βλαστοκύτταρα. Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει πρόοδος στις δοκιμασίες νευροτοξικότητας στο επίπεδο της ανάλυσης της κυτταρικής διαφοροποίησης, της μετανάστευσης και της ανάπτυξης των κυττάρων με τη μελέτη των τρισδιάστατων δομών των νευροσφαιρών (neurospheres) [21].

### **6.3. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες καταγραφής της κυτταρικής λειτουργίας μετά από έκθεση σε χημικές ουσίες**

Η άδεια της χρήσης των πολυδύναμων και των σωματικών βλαστικών κυττάρων παράκαμψε το ηθικό εμπόδιο που προϋπήρχε για την συλλογή κυττάρων από ιστούς ενηλίκων ανθρώπων. Πρόσφατα, προχώρησαν διάφορες μελέτες για την κατανόηση των μηχανισμών της ηλεκτροφυσιολογίας και της μεταβολικής λειτουργίας διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων από εμβρυϊκά (ES cells) και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPS cells) [22, 23], που προήλθαν από διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα. Υπάρχουν 2 τύποι κυττάρων, οι οποίοι αποτελούν «πρότυπες ομάδες ελέγχου» για δοκιμασίες καταγραφής της κυτταρικής λειτουργίας, με

τη χρήση ηλεκτροφυσιολογικών μετρήσεων. Αυτούς τους τύπους αποτελούν τα κύτταρα του μυοκαρδίου και τα νευρικά κύτταρα. Τέτοιου είδους διαφοροποιημένα κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν στην επιφάνεια ενός συστήματος πολύ-ηλεκτροδίων, μέσου του οποίου παρατηρούνται και υπολογίζονται το δυναμικό ενέργειας τους, καθώς και ο πολλαπλασιασμός τους [24]. Επιπρόσθετα, έχουν γίνει μελέτες όπου μετά τη διαφοροποίηση των ES/ iPSCs σε νευρώνες, έχει μελετηθεί το κατώφλι της αυθόρμητης δημιουργίας δικτύου νευρώνων, η οποία κυμαίνεται ανάλογα με τη σύσταση του καλλιεργητικού μέσου [25].

Τα ηπατοκύτταρα, εξαιτίας της μεταβολικής τους δραστηριότητας, αποτελούν και αυτά σημαντικά εργαλεία στις τοξικολογικές μεθόδους, όπως και στις μεθόδους συγκριτικής ανάλυσης των φαρμάκων. Πρόσφατες έρευνες αναφέρονται στην παραγωγή μεταβολικά ενεργών ηπατοκυττάρων από ανθρώπινα ES και πολυδύναμα iPSCs [22]. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών έδειξαν έκκριση αλβουμίνης, αποθήκευση γλυκογόνου, ενεργότητα του κυτοχρώματος P450 (CYP450), όπως και ικανότητα μεταβολισμού των φαρμάκων στα οποία εκτέθηκαν τα διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα. Σε κυτταρικές σειρές με έκδηλες τις παραπάνω κυτταρικές λειτουργίες εφαρμόζονται βασικές λειτουργικές μέθοδοι, όπως οι ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις και οι μεταβολικές λειτουργικές μέθοδοι. Υπάρχουν, βεβαίως κι άλλα κριτήρια πέρα από την λειτουργία του κυττάρου, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της κυτταρικής φυσιολογίας, όπως για παράδειγμα το κυτταρικό σχήμα, τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

#### **6.4. Συντήρηση των βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες τοξικότητας**

Μία από τις μεγαλύτερες δυσκολίες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των βλαστικών κυττάρων είναι η συντήρησή τους σε ιδανικές συνθήκες. Αναγκαία συνθήκη για τη χρήση ES και iPS βλαστικών κυττάρων σε δοκιμασίες τοξικότητας, αποτελεί η συντήρησή τους σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Αυτό επιτυγχάνεται, με προσθήκη κυτταρικών στρωμάτων τροφοδοσίας (feeder layers) των βλαστοκυττάρων και πιο συγκεκριμένα από τροφοδοτικά στρώματα ινοβλαστών ποντικού. Ένα βασικό μειονέκτημα αυτής της διαδικασίας, αποτελεί η διάκριση μεταξύ της άμεσης και έμμεσης μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία προκύπτει από την προσθήκη κάποιας ουσίας στην καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, δεν μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό αν η τοξική ουσία που

προστίθεται στην καλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων, επιδρά άμεσα στα βλαστοκύτταρα ή στο κυτταρικό στρώμα τροφοδοσίας από ινοβλάστες ποντικού. Πρόσφατα, έχουν δημιουργηθεί και χρησιμοποιούνται συστήματα καλλιέργειας βλαστοκυττάρων ελεύθερα στρωμάτων τροφοδοσίας, που χρησιμοποιούν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και άλλες ενώσεις, με τις οποίες το συγκεκριμένο πρόβλημα μπορεί να παρακαμφθεί [26]. Αυτό που μένει να ερευνηθεί είναι, το αν τα αποτελέσματα των τοξικολογικών μελετών μεταξύ των δυο συστημάτων βλαστικών κυττάρων (του κλασσικού και του ελευθέρου κυτταρικού στρώματος τροφοδοσίας) διαφέρουν ή είναι ίδια, ενδεχομένως μετά και από κανονικοποίηση ορισμένων τιμών.

## **7. Πρότυπα συστήματα μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου**

### **7.1. Στοχεύοντας προς τη δημιουργία προτύπων συστημάτων βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου με σκοπό τη διάγνωση και τη θεραπεία**

Η ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους των διαφόρων ιστών κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, δίνει τη δυνατότητα στον οργανισμό να αναδημιουργεί, ως ένα βαθμό, τους εκάστοτε ιστούς εξαιτίας πιθανών τραυματισμών, ή ακόμα και μετά από χημειοθεραπείες που προκαλούν ευρεία κυτταροτοξικότητα. Αντίθετα από τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, τα σωματικά βλαστικά κύτταρα που παράγονται σε θέσεις όπως ο μυελός των οστών και το ήπαρ, έχουν περιορισμένη δυνατότητα αναπτυξιακής διαφοροποίησης και γι' αυτό συχνά χαρακτηρίζονται και ως πολυδύναμα.

Μία άλλη κατηγορία βλαστικών κυττάρων, τα iPSCs μπορούν να απομονωθούν από υγιείς δότες και ασθενείς, ώστε να χρησιμοποιηθούν στη διεξαγωγή νέων ερευνητικών δοκιμών. Η περαιτέρω κατανόηση και η περιγραφή των παθολογικών μηχανισμών των υπό μελέτη νόσων, μπορεί να δώσει τη δυνατότητα δημιουργίας αναλυτικών πλατφορμών, που με ακρίβεια θα περιγράψουν τις κυτταρικές λειτουργίες των πλειοδύναμων αυτών βλαστικών κυττάρων και την εμπλοκή τους στους παραπάνω παθολογικούς μηχανισμούς. Ταυτόχρονα, λειτουργικές τεχνικές Γενομικής μπορούν να

παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται σε συγκεκριμένα παθολογικά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των iPSCs, έχει δοθεί η δυνατότητα δημιουργίας γενετικώς ταυτοσημων κυττάρων με αυτά που απομονώθηκαν από τον αρχικό ιστό. Πιο συγκεκριμένα, τα iPSCs παρήχθησαν με επιγενετικό επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων στα οποία προκλήθηκε εξωγενώς η έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, υπεύθυνων για την αποδιαφοροποίηση των κυττάρων, έτσι ώστε αυτά πλέον να βρίσκονται σε μία κατάσταση ομοιάζουσα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Ο Yamanaka και οι συνεργάτες του βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι «παράγοντες υπεύθυνοι για τη διατήρηση της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τη μείωση της πολυδυναμίας των σωματικών βλαστικών κυττάρων των ενηλίκων» κατόρθωσαν να ταυτοποιήσουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct3/4, Sox2, Klf4 και c-Myc, οι οποίοι επαναπρογραμματίζουν ινοβλάστες ποντικού σε iPSCs [26]. Αυτό αποδείχθηκε καθώς έπειτα από κάποιες εβδομάδες προέκυψαν κύτταρα με μορφολογία και επιφανειακά αντιγόνα που ομοίαζαν με αυτά των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Το 2007 ανακοινώθηκε ο επαναπρογραμματισμός των ινοβλαστών του ανθρώπου σε iPSCs, με τη χρήση του ίδιου συνδυασμού μεταγραφικών παραγόντων αλλά και αντικαθιστώντας τους Klf4 και c-Myc με τους Nanog και Lin28 [27].

Όλες αυτές οι ερευνητικές εξελίξεις αναδεικνύουν τις τεράστιες δυνατότητες γύρω από την τεχνολογία των iPSCs. Σε κλινικό επίπεδο, παρόλα αυτά, η χρήση των iPSCs είναι περιορισμένη, καθώς εγείρει ζητήματα επικινδυνότητας λόγω: 1) της πιθανής επαγόμενης μεταλλαξιγένεσης από την ενσωμάτωση των ιικών φορέων στο γενετικό υλικό, και 2) της πιθανής υπερέκφρασης των εισαχθέντων γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων, μερικά εκ των οποίων θεωρούνται ογκογονίδια, όπως για παράδειγμα το c-Myc. Στην προσπάθεια μείωσης αυτών των κινδύνων, οι επιστήμονες έχουν οδηγηθεί σε δοκιμές καθοδηγούμενης έκφρασης των προαναφερθέντων μεταγραφικών παραγόντων. Η καθοδηγούμενη έκφραση επιτυγχάνεται με τη χρήση πλασμιδίων, «επισωματικών» φορέων που δεν ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό (nonintegrating “episomal” vectors), και τη χρήση του συστήματος τρανσποζονίων piggyBac. Πιο πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί μία νέα, πολλά υποσχόμενη μέθοδος επαναπρογραμματισμού, που βασίζεται στη χρήση mRNA και

microRNA. Οι παραπάνω μέθοδοι, σε συνδυασμό με την τεχνολογία των iPSCs, θα δώσουν νέες προοπτικές στην Αναγεννητική Ιατρική, ενώ παράλληλα θα συμβάλλουν στην περιγραφή των μηχανισμών αιτιοπαθογένειας σπάνιων ασθενειών, με σκοπό την ανάπτυξη εξατομικευμένων διαγνωστικών και θεραπευτικών εργαλείων [28, 29].

## **7.2. Η χρήση της τεχνολογίας των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου για την αξιολόγηση (screening) των φαρμάκων**

Τα ζωικά μοντέλα αποτελούν αναμφισβήτητο το «golden standard» για την ταυτοποίηση και την καταγραφή των παρενεργειών των φαρμακευτικών ουσιών στην ανάπτυξη των θηλαστικών. Εν τούτοις, υπάρχουν περιορισμοί στην ικανότητά τους να προβλέψουν την τοξικότητα των φαρμάκων στους ανθρώπους. Διάφορα φάρμακα, που προηγουμένως έχουν μελετηθεί σε ζωικά μοντέλα, παρά την προβλεπόμενη ασφάλειά τους που προκύπτει από τα πειράματα, είναι υπεύθυνα για την πρόκληση σοβαρών τοξικών βλαβών και αποβολών κατά τη διάρκεια της κύησης στον άνθρωπο. Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στην μεγαλύτερη ευαισθησία των ανθρώπινων εμβρύων έναντι αυτών των φαρμάκων, σε αντίθεση με τα έμβρυα των πειραματόζωνων. Κλασικό παράδειγμα τέτοιου φαρμάκου αποτέλεσε, στο παρελθόν, η θαλιδομίδη, η οποία προκάλεσε τερατογενέσεις, όταν γινόταν λήψη της από μέλλουσες μητέρες προς αποφυγή των πρωινών ναυτιών της κύησης [30]. Άλλο παράδειγμα αποτελεί η χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος TGN1412 σε κλινικές δοκιμές 6 ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση, ρευματοειδή αρθρίτιδα και λευχαιμία [31], οι οποίοι στο σύνολό τους εμφάνισαν πολύ-οργανική ανεπάρκεια και θάνατο. Με αφορμή την ανάγκη ανακάλυψης ενός νέου μοντέλου τοξικότητας, με μεγαλύτερη ικανότητα πρόβλεψης και αυτοματοποίησης της απόκρισης του ανθρώπου σε φαρμακευτικές ουσίες, οι έρευνες έχουν πλέον προσανατολιστεί στη χρήση των βλαστικών κυττάρων που απομονώνονται από τον άνθρωπο, ως συστήματα ανίχνευσης της φαρμακευτικής τοξικότητας. Με τα συστήματα αυτά, όχι μόνο θα αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των προκλινικών δοκιμών κυτταροτοξικότητας των δοκιμαζόμενων φαρμάκων, αλλά παράλληλα θα μετριάστουν και οι δημόσιες ανησυχίες που αφορούν στη χρήση ζώων στην έρευνα.

Η διερεύνηση της τοξικότητας μίας ουσίας αποτελεί βασικό ζητούμενο στην ανάπτυξη και στο σχεδιασμό φαρμάκων, ιδιαιτέρως αν ληφθεί υπόψιν το γεγονός πως η εκτίμηση της οργανικής



ανεπάρκειας εξαιτίας τοξικών βλαβών, μπορεί να υπάρξει μόνο στα τελικά στάδια της νόσου. Ταυτόχρονα, υπάρχει μεγάλη δυσκολία στην εκτίμηση της τοξικότητας στα πρώιμα στάδια σε ερευνητικό επίπεδο, καθώς και σε *in vitro* πειράματα με μετασχηματισμένες ή προερχόμενες από ζωικά μοντέλα κυτταρικές σειρές. Η παραπάνω δυσκολία είναι πιθανό να ξεπεραστεί, αν υπάρξει πρώιμη εκτίμηση σε φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπου, τα οποία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά ως προς την έκφραση και τις μεταβολικές τους αποκρίσεις σε σχέση με τα ήδη υπάρχοντα μοντέλα *in vitro* μελέτης. Αναπτυσσόμενες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές με εγγενείς λειτουργίες - προερχόμενες από βλαστικά κύτταρα, μπορούν να αποτελέσουν το βασικό εργαλείο για τη δημιουργία συστημάτων εκτίμησης των φαρμάκων.

Σημαντικά είναι τα δεδομένα ερευνών που αφορούν την βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας των βλαστικών κυττάρων προς την αποτελεσματικότερη διαφοροποίησή τους στους ζητούμενους κυτταρικούς τύπους. Ενδεικτικά, έχει αποδειχτεί η σημασία της χρήσης ικριωμάτων για την παραγωγή λειτουργικών ηπατοκυττάρων, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να αποτελέσουν σύστημα αξιολόγησης των πρώιμων επιπτώσεων και παρενεργειών των φαρμάκων (σε κλίμακα από πρώιμες παρενέργειες σε όψιμες). Επίσης, η σύσταση του καλλιεργητικού μέσου είναι καθοριστική για την διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων σε ώριμους νευρώνες, δομικά και φαινοτυπικά κατάλληλους για χρήση σε τεχνικές εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας με υψηλή ακρίβεια [32]. Συνεπώς, από βλαστοκύτταρα που απομονώνονται από τον άνθρωπο, κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, μπορούν να προκύψουν διαφοροποιημένα κύτταρα και ιστοί, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως μοντέλα εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας, με υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλό κόστος.

### **7.3. Μείωση του κόστους ανάλυσης και εκτίμηση των φαρμακευτικών και τοξικών ουσιών με τη χρήση των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου**

Η νέα τεχνολογία των πρότυπων συστημάτων των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών δεδομένων που προκύπτουν από *in vitro* συστήματα, έτσι ώστε να διενεργούνται παράλληλα και μελέτες της δόσοεξαρτώμενης απόκρισης στο μελετώμενο φάρμακο. Επιπλέον, γίνεται δυνατή και η ανάλυση δεδομένων που αφορούν την έκφραση γονιδίων/ πρωτεϊνών και την εξαγωγή συμπερασμάτων για το μεταβολικό προφίλ του κυττάρου. Έτσι, δίνεται

η δυνατότητα πρόβλεψης των ποικίλων αποκρίσεων του ανθρώπου σε φάρμακα με πολύ χαμηλό κόστος.

Για την ανάπτυξη μεθόδων πρόβλεψης της κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων, θα πρέπει να δίνεται προσοχή στις εξής παραμέτρους:

1. την δυνατότητα πρόσβασης σε απεριόριστες ποσότητες βλαστοκυττάρων που θα έχουν προβλέψιμη συμπεριφορά σε συνθήκες καλλιέργειας,
2. τη δημιουργία πρωτοκόλλων που θα αφορούν τη διαδικασία διαφοροποίησης, τον ακριβή προσδιορισμό των σταδίων της διαφοροποίησης.

Όλα τα παραπάνω έχουν ως στόχο τελικά την εξακρίβωση της ασφάλειας του εκάστοτε φαρμάκου.

Πράγματι, τα ανθρώπινα ESCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χαρτογράφηση αναπτυξιακών μονοπατιών, συνεπώς και για τη δημιουργία των μοντέλων αναπτυξιακής τοξικότητας. Από την άλλη, τα iPSCs προσφέρουν τη δυνατότητα μελέτης της ιστοειδικής ποικιλομορφίας των φυσιολογικών αποκρίσεων στα φάρμακα, καθώς γίνεται εφικτή η διαφοροποίηση σε κύτταρα διαφορετικών ιστών που ενδέχεται να υποστούν βλάβες λόγω τοξικότητας (**Εικ.6**).

Τα κύρια όργανα που μπορούν να υποστούν βλάβες από την τοξικότητα των φαρμάκων είναι το ήπαρ, η καρδιά καθώς και ο νευρικός ιστός. Πιο συγκεκριμένα τα ογκοκατασταλτικά φάρμακα ευθύνονται για τα περισσότερα περιστατικά οξείας τοξικής ανεπάρκειας του ήπατος και της καρδιάς στους ασθενείς. Αυτό το δεδομένο καθιστά τα ηπατοκύτταρα και τα καρδιομυοκύτταρα, ως τα κυριότερα παράγωγα βλαστοκυττάρων σε προκλινικές μελέτες τοξικότητας. Τα ηπατοκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από τη μεταβολική τους ενεργότητα, έχουν τον βασικότερο ρόλο στο μεταβολισμό των ουσιών, συνεπώς η ευαισθησία που επιδεικνύουν στους ελέγχους κυτταροτοξικότητας είναι σε μεγάλο βαθμό ενδεικτική της ασφάλειας των εξεταζόμενων φαρμάκων.

Η Μεταβολομική και διάφορες άλλες μέθοδοι μελέτης του γενετικού προφίλ δείχνουν να υπόσχονται την ταυτοποίηση βιοδεικτών, οι οποίοι ευθύνονται για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων. Η νέα αυτή τεχνολογία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί

για τη χαρτογράφηση των περίπλοκων μονοπατιών της φυσιολογικής απόκρισης σε φάρμακα. Βιολογικά συστήματα προσέγγισης και *in silico* μέθοδοι που προκύπτουν μέσω της Γενομικής, της Πρωτεομικής, της Μεταγραφομικής και της Μεταβολομικής, μπορούν να αποτελέσουν τομή στην ενσωμάτωση και σύνθεση αποτελεσμάτων από διαφορετικές ερευνητικές προσεγγίσεις και να στοχοθετήσουν τις μελλοντικές έρευνες [6]. Οι έρευνες αυτές θα βασίζονται σε ανέξοδες μεθόδους πρόβλεψης της γενεοτοξικότητας, της καρκινογένεσης και της ανοσοτοξικότητας.



**Εικ 6** Σχεδιασμός πρωτοκόλλου διαφοροποίησης και ωρίμανσης ηπατοκυττάρων προερχόμενων από iPSCs.

#### 7.4. Ανάπτυξη *in vitro* κυτταρικών συστημάτων πρόβλεψης της απόκρισης του ανθρώπου σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις φαρμακευτικών ουσιών

Ένας προοπτικός στόχος της τοξικολογίας είναι η ανάπτυξη *in vitro* συστημάτων, τα οποία θα αντικατοπτρίζουν την ποικιλομορφία των αποκρίσεων των κυττάρων έναντι των χημικών ουσιών και των φαρμάκων σε διαφορετικούς ανθρώπινους πληθυσμούς. Μεταξύ των κυτταρικών σειρών βλαστοκυττάρων προερχόμενων από διαφορετικούς ανθρώπους, παρατηρείται τεράστια ποικιλομορφία ως προς τον βαθμό και το ρυθμό διαφοροποίησης τους. Έτσι, ενώ κάποιες από αυτές τις διαφοροποιήσεις σχετίζονται με τυχαία γεγονότα ή και με τις διαφορετικές τεχνικές που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια, ο σημαντικότερος παράγοντας ποικιλομορφίας είναι το γενετικό προφίλ του ατόμου που αποτέλεσε την πηγή αυτών των κυτταρικών σειρών. Η κατανόηση των παραπάνω παραδοχών καθιστά φανερή την ανάγκη απομόνωσης και μελέτης ολόενα και περισσότερων κυτταρικών σειρών από άτομα με διαφορετικές ευαισθησίες σε φάρμακα, νόσους και διαφορετικό ιστορικό έκθεσης σε εξωγενείς παράγοντες, έτσι ώστε να επιτευχθεί η εξαγωγή συμπερασμάτων που να καλύπτει ένα ευρύτερο φάσμα της πληθυσμιακής ποικιλομορφίας.

Οι μεγάλες διαφορές που εντοπίζονται στους ανθρώπους σε γενετικό επίπεδο, είναι αποτέλεσμα γενετικών πολυμορφισμών. Άρα, για την αντικειμενικότερη πρόβλεψη της χημικής απόκρισης των φαρμάκων στο άνθρωπο, είναι αναγκαία η δημιουργία κυτταρικών σειρών από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα από ένα σύνολο ατόμων διαφορετικών ηλικιών, γενεών, φύλλου και ιατρικού ιστορικού. Τα ήδη μελετημένα συστήματα των βλαστικών κυττάρων αποτελούν μοντέλα πρόβλεψης και περιγραφής της πολυπλοκότητας των γενετικών μεταλλάξεων που προκαλούνται από διάφορα νοσήματα. Αποτελούν επίσης επικουρικά εργαλεία στη μεταφραστική έρευνα και στην ανάπτυξη των φαρμάκων. Πράγματι, τα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από τον άνθρωπο επιτρέπουν τη δημιουργία νέων *in vitro* μοντέλων, τα οποία θα προσομοιάζουν ανθρώπινους φαινότυπους που σχετίζονται με συγκεκριμένες ασθένειες. Τα μοντέλα αυτά θα μπορούσαν να θεμελιώσουν την δημιουργία πληθυσμιακών πλατφορμών για μεταφραστικές έρευνες, και να χρησιμοποιηθούν στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, σχετικών με την πρόγνωση, την διάγνωση και την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών.

Ένα φάρμακο μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες σε ορισμένους ασθενείς εξαιτίας του γενετικού τους προφίλ ή λόγω έκθεσής τους σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Μέχρι τώρα δεν έχουν ανακαλυφθεί μέθοδοι που να προβλέπουν τυχόν μεμονωμένες παρενέργειες στο εκάστοτε φάρμακο. Πιθανώς, μελλοντικά θα χρησιμοποιούνται iPSC βλαστικά κύτταρα, προερχόμενα από ασθενείς με γνωστή ευαισθησία ή αντίσταση σε διάφορα φάρμακα, για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης κυτταροτοξικότητας.

Συμπερασματικά, με την τεχνολογία των βλαστικών κυττάρων, μπορούν να προσφερθούν πρωτοφανείς ευκαιρίες στο επίπεδο της εξατομίκευσης της φαρμακευτικής θεραπείας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα iPSCs έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται χωρίς να διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα, για μεγάλα χρονικά διαστήματα, και όταν μπαίνουν στη διαδικασία της διαφοροποίησης να δίνουν κύτταρα και από τις τρεις εμβρυϊκές στιβάδες, (δηλαδή εν δυνάμει όλες τις σωματικές κυτταρικές σειρές). Συνεπώς, με την συγκεκριμένη τεχνολογία, δίνεται η δυνατότητα δημιουργίας *in vitro* μοντέλων από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από ξεχωριστά άτομα, καθιστώντας εφικτή την καταγραφή των διαφορετικών προδιαθεσικών παραγόντων κινδύνου για διάφορες ασθένειες. Οι εξελίξεις στην τεχνολογία των βλαστικών κυττάρων μπορεί να γίνουν η βάση για την ανακάλυψη νέων, εξατομικευμένων φαρμάκων, καθώς και για την ανάπτυξη αποδοτικότερων και οικονομικότερων μοντέλων ελέγχου της τοξικότητας [33].

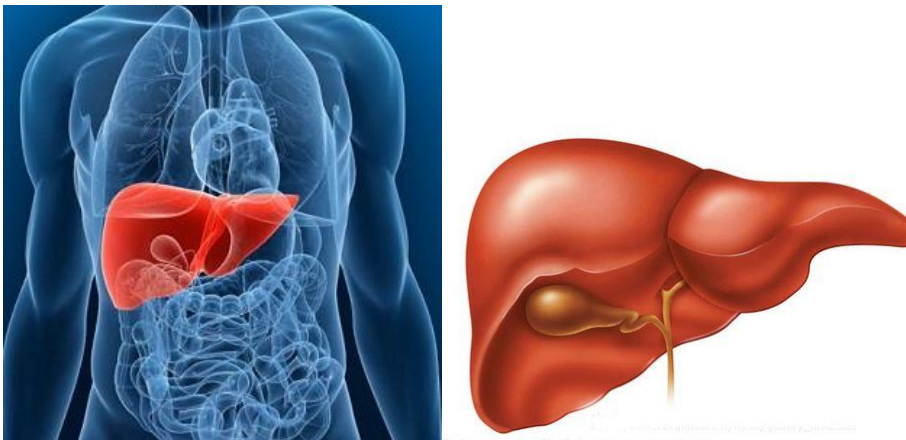
## 8. Ήπαρ: η ανάπτυξη και οι λειτουργίες του οργάνου

Το ήπαρ αποτελεί το μεγαλύτερο αδένιο του σώματος (**Εικ.7**) και παρουσιάζει τόσο ενδοκρινείς όσο και εξωκρινείς ιδιότητες. Στις λειτουργίες του ενδοκρινικού συστήματος περιλαμβάνεται η έκκριση διαφόρων ορμονών, όπως των ινσουλίνο-μιμητικών αυξητικών παραγόντων, του αγγειοτενσινογόνου και της θρομβοποιητίνης, ενώ η εξωκρινής μοίρα του ήπατος παράγει τη χολή. Το ήπαρ είναι επίσης απαραίτητο για την αποθήκευση του γλυκογόνου, την αποτοξίνωση του αίματος (εξαιτίας φαρμάκων), τον έλεγχο του μεταβολισμού, τη ρύθμιση της σύνθεσης και της μεταφοράς της χοληστερόλης, το μεταβολισμό της ουρίας και τέλος ευθύνεται για τη ρύθμιση της έκφρασης μιας

σειράς πρωτεϊνών του πλάσματος συμπεριλαμβανομένης της αλβουμίνης και των απολιποπρωτεϊνών.

Εφόσον, λοιπόν, το ήπαρ αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ρυθμιστές των φυσιολογικών διεργασιών του οργανισμού, ηπατικές νόσοι όπως η ηπατική ίνωση, η ηπατίτιδα και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, οδηγούν σε υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας, τέτοια που οι ηπατικές νόσοι αποτελούν την τέταρτη αιτία θανάτου μεταξύ των ενηλίκων ατόμων στο δυτικό κόσμο.

Η μεγάλη επιβάρυνση της υγείας, καθώς και το μεγάλο οικονομικό κόστος που προκαλείται από τις ηπατικές νόσους, οδηγούν προς μια κατεύθυνση ολοένα και μεγαλύτερης κατανόησης των βασικών αναπτυξιακών μηχανισμών που ελέγχουν τη διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων και τη λειτουργία τους (*Σχέδιο Δράσης για την Έρευνα των Ηπατικών Νόσων/ Action Plan for Liver Disease Research*).



*Εικ 7 Το ήπαρ αποτελεί το μεγαλύτερο αδένιο και ταυτόχρονα το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος*

Κατά τη διάρκεια των δυο τελευταίων δεκαετιών σημειώθηκαν σημαντικές εξελίξεις όσο αφορά τη διερεύνηση του ήπατος και των λειτουργιών του. Η μάζα του ήπατος αντιπροσωπεύει το 2-

5% του σωματικού βάρους, αποτελείται ως επί τω πλείστων από ηπατοκύτταρα (**Πίνακας 2**), στα οποία διασπώνται και συντίθενται πρωτεΐνες μέσω κλασικών βιοχημικών διαδικασιών. (Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την απομόνωση μεταγραφικών και αυξητικών παραγόντων, καθώς και μορίων σηματοδότησης και ορμονών, τα οποία πιθανά δεν αναγνωρίζονται από άλλα όργανα και ιστούς). Κατά τη διάρκεια του δεύτερου μισού του 20ου αιώνα, η αλματώδης ανάπτυξης της Μοριακής Βιολογίας, διευκόλυνε να κατανοηθούν οι μηχανισμοί ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης των ηπατοκυττάρων, περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο κυτταρικό τύπο. Ταυτόχρονα, πολλές τεχνολογικές καινοτομίες που αφορούσαν την κυτταρική λειτουργία, όπως η δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών, οι δοκιμασίες ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και οι δοκιμασίες *in vivo* γονιδιακού αποτυπώματος, εφαρμόστηκαν πρώτα στο ήπαρ. Εκτός από την ταχεία πρόοδο στην κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης, η αναγεννητική ικανότητα του ήπατος, επέτρεψε επίσης την κατανόηση των μηχανισμών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του κυτταρικού κύκλου και της *in vivo* επιδιόρθωσης του DNA των θηλαστικών. Σχεδόν το σύνολο των παραπάνω προόδων, περιγράφει θεμελιώδεις μηχανισμούς που εφαρμόζονται σε όλες τις πτυχές της βιολογίας [34].

Κυτταρικός τύπος	Θέση στο ήπαρ	Λειτουργία
Ηπατοκύτταρο	Παρέγχυμα	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περίπου το 70% του πληθυσμού των κυττάρων του ήπατος</li> <li>• Έκκριση πρωτεϊνών</li> <li>• Έκκριση χολής</li> <li>• Μεταβολισμός χοληστερόλης</li> <li>• Αποτοξίνωση</li> <li>• Μεταβολισμός ουρίας</li> <li>• Μεταβολισμός γλυκόζης/ γλυκογόνου</li> <li>• Απόκριση οξείας φάσης</li> <li>• Πήξη του αίματος</li> </ul>
Κύτταρο του χοληδόχου πόρου	Χοληφόρος αγωγός του Hering	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περίπου το 3% του πληθυσμών των κυττάρων του ήπατος</li> <li>• Σχηματισμός χοληφόρου αγωγού για τη μεταφορά της χολής</li> <li>• Έλεγχος της χολικής ροής</li> <li>• Ανταλλαγή νερού και διττανθρακικών</li> <li>• Έλεγχος του χολικού pH</li> </ul>
Ενδοθηλιακό κύτταρο	Ενδοθηλιακά αγγεία	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Σχηματισμός αρτηριών, φλεβών, αρτηριδίων και φλεβιδίων</li> <li>• Έλεγχος αιματικής ροής</li> <li>• Επίδραση στην στρωμάτωση του παρεγχύματος</li> </ul>
Κολποειδές ενδοθηλιακό κύτταρο	Κολποειδικός χώρος	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περίπου το 2,5% του λοβιδώδους παρεγχύματος</li> <li>• Σχηματισμός τριχοειδών καναλιών για τη σωστή κυκλοφορία του αίματος</li> <li>• Υψηλή ειδικευση</li> <li>• Επιτρέπει την μετακίνηση μορίων και πρωτεϊνών μεταξύ του ορού και των ηπατοκυττάρων</li> <li>• Απομάκρυνση άχρηστων μακρομορίων μέσω της αιματικής κυκλοφορίας</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Έκκριση κυτοκινών</li> <li>• Παρουσίαση αντιγόνου</li> <li>• Πήξη του αίματος</li> </ul>
Κύτταρο Pit	Ηπατικοί φυσικοί φονείς	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Σπάνια κύτταρα</li> <li>• Κυτταροτοξική δραστηριότητα</li> </ul>
Κύτταρο Kupffer	Κολποειδικός χώρος	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περίπου το 2% του ήπατος</li> <li>• Απομάκρυνση ξένων ουσιών</li> <li>• Έκκριση κυτοκινών και πρωτεασών</li> </ul>
Ηπατικό αστεροειδές κύτταρο	Περικολποειδικός χώρος	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περίπου το 1% των ηπατικών κυττάρων</li> <li>• Έλεγχος μικροαγγειακού τόνου</li> <li>• Παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας σε περίπτωση βλάβης</li> <li>• Αποθήκευση βιταμίνης Α και ρετινοειδών</li> <li>• Ενεργοποίηση για παραγωγή λείων μυϊκών κυττάρων</li> <li>• Η κύρια πηγή κολλαγόνου στο ήπαρ κατά την ίνωση</li> <li>• Έκκριση κυτοκινών</li> </ul>

*Πίνακας 2 Οι επικρατέστεροι κυτταρικοί τύποι του ήπατος ενηλίκων και οι λειτουργίες τους*

## 9. Χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών HepG2, HepaRG και HPH και η χρήση τους ως εργαλεία ανίχνευσης ηπατοτοξικότητας

Ένας από τους βασικούς στόχους στη φαρμακοβιομηχανία σήμερα είναι η βελτίωση των τεχνικών έγκαιρης ανίχνευσης της ηπατοτοξικότητας που προκαλείται από ένα νέο φάρμακο. Πάνω από 900 φάρμακα ή βότανα έχουν σχετιστεί με ηπατοτοξικές αντιδράσεις, ενώ η ηπατοτοξικότητα αποτελεί την συνηθέστερη αιτία απόσυρσης ουσιών από την αγορά, όπως και την πρώτη αιτία θανάτου λόγω ανεπιθύμητης ενέργειας φαρμάκου. Γίνεται συνεπώς φανερό η αναγκαιότητα ανάπτυξης αξιόπιστων μοντέλων ελέγχου των φαρμακευτικών ουσιών για την πιθανή πρόκληση ηπατικών βλαβών.

Το αντιπροσωπευτικότερο μοντέλο ελέγχου ηπατοτοξικότητας είναι τα ανθρώπινα πρωτογενή ηπατοκύτταρα (HPH), καθώς διατηρούν την χαρακτηριστική μεταβολική δραστηριότητα των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Τα ηπατοκύτταρα είναι επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στο ήπαρ. Παίζουν κύριο ρόλο στην επίτευξη σημαντικών λειτουργιών του οργάνου. Πιο συγκεκριμένα, τα ηπατοκύτταρα δρουν επικουρικά στην αποτοξίνωση του αίματος και συνθέτουν πρωτεΐνες



μεταφοράς, όπως είναι η λιποπρωτεΐνη, η λευκωματίνη και η τρανσφερίνη. Επιπλέον, πρωτογενείς και δευτερογενείς κυτταρικές καλλιέργειες ηπατοκυττάρων αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την μελέτη των μηχανισμών ηπατικής αναγέννησης και διαφοροποίησης. Παρόλα αυτά, τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα, ενώ είναι η πιο «ειδική» κυτταρική σειρά για δοκιμασίες ελέγχου ηπατοτοξικότητας, δεν είναι και η «ιδανική». Κατά τη διάρκεια παλαιότερων μελετών, τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα παρουσίασαν περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού στην κυτταροκαλλιέργεια. Επιπροσθέτως, όταν διεγείρονταν προς κυτταρική διαίρεση, έχαναν τις λειτουργίες διαφοροποίησής τους, όπως την βασική ικανότητα σύνθεσης και έκκρισης αλβουμίνης και τρανσφερίνης. Παρά το γεγονός πως έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των παραγόντων που εξαναγκάζουν τα ηπατοκύτταρα προς την απώλεια των παραπάνω ικανοτήτων τους, τα πρώιμα και τα δευτερογενή ηπατοκύτταρα παραμένουν ακατάλληλα για χρήση σε ορισμένες ιατρικές και φαρμακολογικές εφαρμογές και τεχνολογίες. Μεταξύ αυτών των εφαρμογών είναι η γονιδιακή θεραπεία, η δημιουργία βιο- τεχνητών οργάνων, η μεταμόσχευση κυττάρων, η παραγωγή φαρμάκων και οι δοκιμές φαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών. Οι τεχνολογίες αυτές μπορούν να είναι αποτελεσματικές, εάν χρησιμοποιηθούν είτε ηπατοκυτταρικοί κλώνοι ή αθανατοποιημένα ηπατοκύτταρα ή αδιαφοροποίητα κύτταρα με χαρακτηριστικά ηπατοκυττάρου. Παραδείγματα τέτοιων κυτταρικών σειρών είναι τα κύτταρα HepG2 (κύτταρα ηπατοβλαστώματος), όπως και τα HepaRG (όψιμα διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα χολαγγειοκαρκινώματος). Τα κύτταρα HepaRG έχουν απομονωθεί από συγκεκριμένο τύπο ηπατοκαρκινώματος (χολαγγειοκαρκίνωμα) και έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης προς ηπατοκύτταρα και προς κύτταρα της χοληδόχου κύστης. Όταν διαφοροποιούνται σε ηπατοκύτταρα, εκφράζουν χαρακτηριστικά ένζυμα, όπως τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, CYP3A4 και CYP7A1. Η έκφραση των ενζύμων αυτών, αν και σε χαμηλότερα επίπεδα από το πρωτογενή ηπατοκύτταρα, τους δίνει πλεονέκτημα ως μοντέλο *in vitro* ηπατοτοξικότητας, καθώς η μεταβολική τους λειτουργία είναι αντιπροσωπευτικότερη των HepG2. Επίσης, θεωρούνται και πιο σταθερά στην κυτταροκαλλιέργεια, καθώς μπορούν να διατηρηθούν έως και 6 εβδομάδες. Αντιθέτως, στα κύτταρα HepG2 δεν ανιχνεύεται το mRNA των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, όπως και το mRNA άλλων ενζύμων σχετικών με τον μεταβολισμό των φαρμάκων.

Το 2012 ο Gerets H. και οι συνεργάτες του [35] ξεκίνησαν μια προσπάθεια περαιτέρω χαρακτηρισμού των κυτταρικών μοντέλων HepG2, HepaRG και HH. Πιο συγκεκριμένα, στόχευσαν στον χαρακτηρισμό των γονιδιακών επιπέδων έκφρασης αυτών των κυτταρικών μοντέλων, όπως επίσης

και στην ανάλυση του μεταβολικού κυτοχρώματος P450 (CYP450) και των δυνατοτήτων του. Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν μετά την έκθεση των παραπάνω κυτταρικών σειρών σε 3 επαγωγικούς παράγοντες του CYP450, τις πρωτεΐνες BNF (betanaphthoflavone), PB (φαινοβαρβιτάλη) και RIF (ριφαμπικίνη), ήταν τα εξής:

1. Τα κύτταρα HepG2 ανταποκρίθηκαν ασθενώς στην έκθεση και στους τρεις επαγωγικούς παράγοντες, κάτι που εξηγείται από την πολύ χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα του CYP450 στα HepG2 συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου HPH).
2. Τα HepaRG (ανεξαρτήτως δότη) ανταποκρίθηκαν άμεσα στην έκθεση και στις τρεις πρωτεΐνες, σύμφωνα με την απόκριση στη γονιδιακή έκφραση κάθε μίας πρωτεΐνης και στη μεταβολική δραστηριότητα του CYP450.

Κατά συνέπεια, τα κύτταρα HepaRG μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμασίες ανίχνευσης/εκτίμησης της μεταβολικής δραστηριότητας του CYP450 είτε ως υποκατάστατο ή συμπληρωματικά με τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα.

Ο δεύτερος στόχος των παραπάνω ερευνητών ήταν να διερευνήσουν την ικανότητα πρόβλεψης και ανίχνευσης ηπατοτοξινών από τα διαφορετικά κυτταρικά μοντέλα. Σε 16 ηπατοτοξικές και 5 μη-ηπατοτοξικές ουσίες που δοκιμάστηκαν, τα κρουσυντηρημένα HH εξέφρασαν το μεγαλύτερο ποσοστό ευαισθησίας που κυμάνθηκε μεταξύ 31% και 44% (αναλόγως του δότη), τα HepaRG ακολούθησαν με 13% και τα κύτταρα HepG2 εξέφρασαν το χαμηλότερο ποσοστό ευαισθησίας της τάξης του 6,3%. Τελικά κανένα από τα μοντέλα δεν έδωσε τις επιθυμητές ευαισθησίες (80-100%). Συμπερασματικά, η υψηλή μεταβολική δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 και η επαγωγιμότητα των κυτταρικών σειρών δεν είναι απαραίτητες ευθέως ανάλογες της υψηλής ευαισθησίας για την ανίχνευση ηπατοτοξικών φαρμάκων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση πυρηνικών υποδοχέων παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό των κυττάρων. Παρά ταύτα, η παρουσία ή η απουσία των πυρηνικών υποδοχέων δεν εξηγεί πλήρως τις αιτίες που μερικά κυτταρικά μοντέλα αποτελούν εργαλεία πρόγνωσης της ηπατοτοξικότητας, όμως άλλα όχι, ενώ υπάρχουν παράγοντες όπως τα ένζυμα φάσης II, τα οποία θα μπορούσαν να παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο.

Θα μπορούσε κανείς να αναρωτηθεί αν έχει σημασία να προβλέπεται η ηπατοτοξικότητα μέσω μετρήσεων των τελικών σημείων κυτταροτοξικότητας (λόγω της χαμηλής ευαισθησίας των κυτταρικών μοντέλων στην ανίχνευση ηπατοτοξικών ουσιών). Πράγματι, εξαιτίας της έντασής του (ως κυτταρική λειτουργία), ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να μην θεωρηθεί ως η καταλληλότερη παράμετρος για την κατανόηση των μηχανισμών ηπατοτοξικότητας με βάση τα δεδομένα κυτταρικά μοντέλα (HepG2, HepaRG, HPH). Αυτό μπορεί να γίνει κατανοητό, αν κανείς λάβει υπόψιν του πως ένας μηχανισμός ηπατοτοξικότητας δεν οδηγεί απαραίτητα σε κυτταρικό θάνατο, αλλά περιλαμβάνει την καταστροφή άλλων εσωτερικών κυτταρικών διεργασιών. Για παράδειγμα, η σχέση μεταξύ της *in vitro* τοξικότητας των ηπατοκυττάρων και της επαγόμενης από φάρμακο ηπατικής βλάβης, δεν έχει προσδιοριστεί επαρκώς μέχρι σήμερα [36]. Ενδεχομένως, θα μπορούσαν να αναπτυχθούν καλύτερα εργαλεία πρόβλεψης ηπατοτοξικότητας, τα οποία να βασίζονται σε πιο ειδικά τελικά σημεία, όπως στην έλλειψη μιτοχονδριακής λειτουργίας, την αναστολή του κυτοχρώματος P450 και την διαμεσολαβούμενη- από τον- μεταβολίτη τοξικότητα [37].

Συνοψίζοντας, τα κύτταρα HepG2 αποκρίνονται ασθενώς στους επαγωγικούς παράγοντες συγκριτικά με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές, όπως επίσης έχουν πολύ χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα του CYP450. Από την άλλη πλευρά, αν και τα κύτταρα HepaRG φαίνεται να αποτελούν κατάλληλο κυτταρικό μοντέλο για μελέτες επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης, δεν αποτελούν ταυτόχρονα και μοντέλο πρόβλεψης ηπατοτοξικότητας, όπως τα ανθρώπινα πρωτογενή ηπατοκύτταρα (HPH). Κατά συνέπεια, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για τον προσδιορισμό ενός αποτελεσματικού μοντέλου πρόβλεψης ηπατοτοξικότητας με ευαισθησία 80-90%.

## 10. Τα WJ-MSCs εκφράζουν γονίδια προγονικών και ώριμων ηπατοκυττάρων

Το 2008, ο Campard D. και οι συνεργάτες του [38] έδειξαν για πρώτη φορά πως ο ομφάλιος λώρος των τελειόμηνων νεογνών μπορεί να θεωρηθεί πηγή μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, με *in vitro* ηπατοκυτταρικό δυναμικό. Τα βλαστικά αυτά κύτταρα είναι ικανά να εμφυτευθούν *in vivo* στο ηπατικό παρέγχυμα του δέκτη και να διατηρήσουν τους ηπατικούς δείκτες για πάνω από 6 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση. Πράγματι, το φαινοτυπικό προφίλ των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων

του ομφαλίου λώρου επιβεβαίωσε αποτελέσματα προηγούμενων μελετών ως εξής: τα WJ-MSCs ήταν θετικά για τους επιφανειακούς δείκτες CD90, CD73, CD44, CD29 και CD13, οι οποίοι αποτελούν και δείκτες επιφάνειας των προγονικών ηπατικών κυττάρων του ανθρώπου [39-41].

Επιπλέον, η σταθερή έκφραση δεικτών όπως οι Alb (αλβουμίνη), AFP (α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη/ α-φετοπρωτεΐνη), Connexin 32 (κοννεξίνη 32), CK19 (κυτταροκερατίνη 19) αποτελεί στοιχείο ομοιότητας των WJ-MSCs με ηπατοβλάστες [42] (**Πίνακας 3**).

Η πιο σημαντική από τις παραπάνω εκφράσεις δεικτών είναι αυτή της CK19. Η CK19 είναι μια χαρακτηριστική πρωτεΐνη των προγονικών ηπατοκυττάρων, όπως επίσης και των κυττάρων της χολυδόχου κύστης[42-45]. Παρά ταύτα, η συσχέτιση των WJ-MSCs με τα προγονικά κύτταρα της χοληδόχου κύστης αποκλείστηκε, λόγω αφενός της έκφρασης χαρακτηριστικών ηπατικών δεικτών από τα βλαστικά κύτταρα και αφετέρου εξαιτίας της απουσίας του δείκτη CK7, ο οποίος εκφράζεται φυσιολογικά από τα κύτταρα της χοληδόχου κύστης.

<b>Επίπεδα έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών ηπατοκυττάρων κατά τα στάδια διαφοροποίησης των WJ-MSCs</b>			
	<i>Ηπατικά βλαστικά κύτταρα</i>	<i>Ηπατοβλάστες</i>	<i>Ώριμα ηπατοκύτταρα</i>
<b>ALB</b>	(χαμηλά επίπεδα έκφρασης)	↑	↑
<b>AFP</b>	-	↑	-
<b>CK19</b>	↑	↓	-
<b>CK18</b>	-	↓	↑
<b>Ηπατο-ειδικές πρωτεΐνες</b>	-	(χαμηλά επίπεδα έκφρασης)	↑

**Πίνακας 3** Απεικόνιση της αυξομείωσης των επιπέδων έκφρασης τεσσάρων χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών δεικτών των ηπατοκυττάρων, όπως και των ηπατο-ειδικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και τελικής ωρίμανσης των WJ-MSCs σε ώριμα ώριμα ηπατοκύτταρα

Πρέπει όμως να τονιστεί πως τα WJ-MSCS εκφράζουν και γονίδια ώριμων ηπατοκυττάρων, όπως είναι η πρωτεΐνη AAT (A1- αντιθρυψίνη) και το ένζυμο TDO (οξυγενάση της τρυπτοφάνης). Ωστόσο, η απώλεια έκφρασης των -καθοριστικών για τη λειτουργία των ώριμων ηπατοκυττάρων- ενζύμων HerPar1, TAT και P450, «υπονοεί» πως τα WJ-MSCs έχουν κυρίως χαρακτηριστικά κάποιου ενδιάμεσου προγονικού τύπου μεταξύ ηπατοβλάστης και ώριμου ηπατοκυττάρου και άρα προσομοιάζουν περισσότερο κύτταρα ιστού ενδοθηλιακής προέλευσης[43].

## **11. Εφαρμογές στην τοξικολογία**

### **11.1. Φαρμακοκινητική και τοξικοκινητική**

Η φαρμακοκινητική (PK) αποτελεί έναν από τους βασικούς κλάδους της φαρμακολογίας, βάσει του οποίου μελετώνται όλες οι παράμετροι που σχετίζονται με την χορηγούμενη φαρμακευτική ουσία σε συνάρτηση με το χρόνο, σε όλη τη διακίνηση του φαρμάκου στον οργανισμό, κατά τη διάρκεια των πορειών απορρόφησης, κατανομής, βιομετατροπής και απέκκρισης. Από την άλλη πλευρά, η τοξικοκινητική (TK) αποτελεί εφαρμογή της φαρμακοκινητικής, και πιο συγκεκριμένα, σχετίζεται με την προκαλούμενη από την συστηματική έκθεση στην ένωση τοξικότητα σε πειραματόζωα. Βασικό ρόλο, λοιπόν, στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων, παίζει η καθιέρωση «TK μοντέλων», τα οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την περιγραφή και την πρόβλεψη της συμπεριφορά μιας τοξικής ένωσης εντός ενός πειραματόζωου. Για παράδειγμα, σε ποια όργανα και ιστούς του σώματος τείνει μια ουσία να εισέλθει ή/και να μεταβολιστεί και να εκκριθεί ή να συσσωρευτεί (λίπος, σπλήνας, ήπαρ κτλ).

### **11.2. Φαρμακευτικές ουσίες και ηπατοτοξικότητα**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το ήπαρ αποτελεί το βασικότερο όργανο του μεταβολισμού των φαρμάκων. Δεν είναι μόνο ο μεγαλύτερος αδένας του σώματος, αλλά και το μεγαλύτερο συμπαγές όργανο με το μεγαλύτερο αριθμό λειτουργιών του να αφορούν το συντονισμό

της μεταβολικής ομοιόστασης, την επεξεργασία των θρεπτικών συστατικών και την αποτοξίνωση. Ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός πως μια πιθανή ηπατική βλάβη προκαλούμενη από φάρμακα, έχει μεγάλη φαρμακολογική (και οικονομική) σημασία, δεδομένης όχι μόνο της σημαντικότητας της συγκεκριμένης οργανοειδικής ανεπιθύμητης ενέργειας του φαρμάκου (adverse drug reaction, ADR) που συνδέεται άμεσα με τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα, αλλά και τη λογιστική φθορά των υποψήφιων φαρμάκων κατά τα όψιμα στάδια της ανάπτυξής τους στη φαρμακοβιομηχανία.

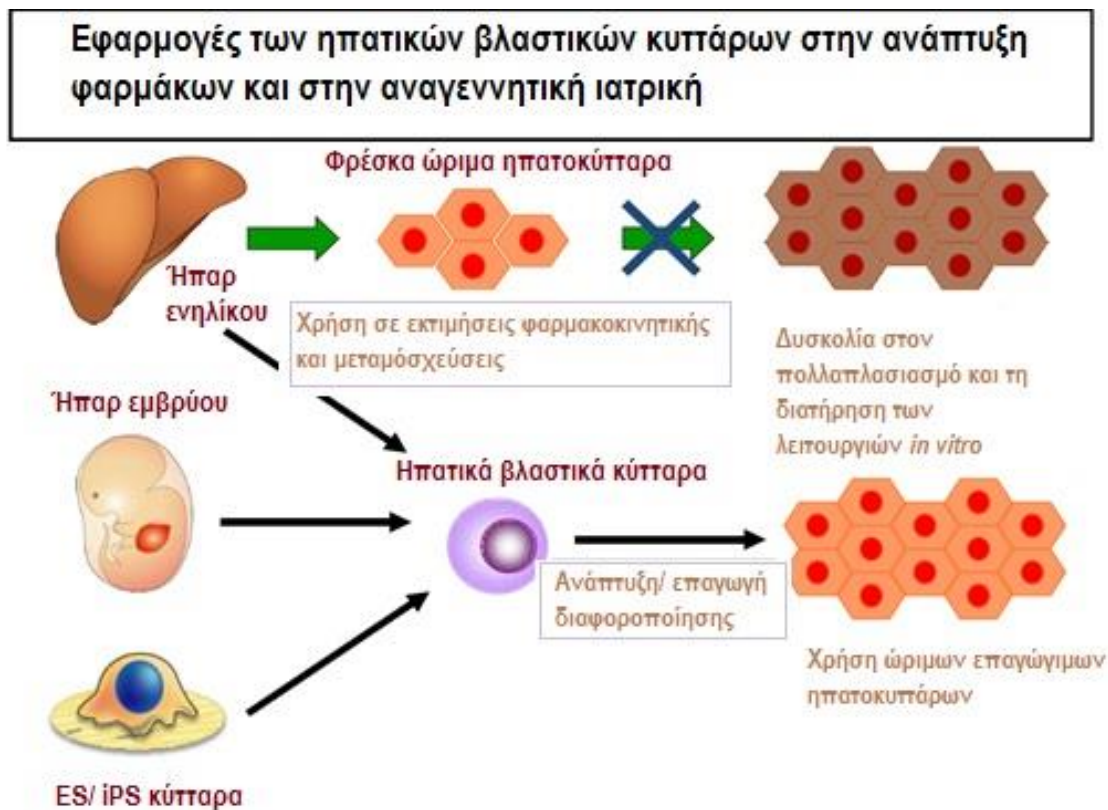
### 11.3. Μοντέλα ηπατοτοξικότητας

Αν και, μέχρι σήμερα, τα πειραματόζωα και τα *in vivo* πειράματα σε ζώα αποτελούν τα κατατοπιστικότερα μοντέλα ηπατοτοξικότητας, είναι σαφές πια, πως γίνεται ολοένα και λιγότερο επιθυμητή η εκτεταμένη χρήση τους σε μελέτες φαρμακολογικής και τοξικολογικής ασφάλειας, όπως επίσης και στην έρευνα για την κατανόηση των μηχανισμών ενδεχόμενης ηπατικής βλάβης προκαλούμενη από φάρμακα και την εξέταση νέων χημικών ουσιών για πρόκληση ADR [46]. Επιπλέον λόγοι που συντελούν στην αναζήτηση νέων μοντέλων ηπατοτοξικότητας είναι το μεγάλο οικονομικό κόστος της εκτροφής των ζώων, ζητήματα βιοηθικής που εγείρονται γύρω από τη χρήση ζώων, καθώς και η ετερογένεια μεταξύ των ειδών (ανθρώπου-ζώων, όπως και των διαφορετικών ειδών ζώων μεταξύ τους), η οποία εμποδίζει την άμεση μετάφραση των δεδομένων στην κλινική πράξη.

Σχετικά με τα διαθέσιμα *in vitro* μοντέλα ηπατοτοξικότητας, τα ανθρώπινα πρωτογενή ηπατοκύτταρα (HPH) θεωρούνται το «χρυσό πρότυπο» (golden standard) για το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών και τις μελέτες κυτταροτοξικότητας [47]. Ωστόσο, οι λόγοι που περιγράφηκαν παραπάνω και αφορούν στη σπάνια διαθεσιμότητα των HPH κυττάρων, τις περίπλοκες διαδικασίες απομόνωσής τους, την περιορισμένη διάρκεια ζωής τους, την ταχεία από-διαφοροποίηση των κυττάρων στην καλλιέργεια και ιδιαίτερα στην ταχύτατη απώλεια της ενζυμικής έκφρασης του CYP450 συνιστούς σοβαρούν περιορισμούς στη χρήση των συγκεκριμένων κυττάρων ως *in vitro* συστημάτων ελέγχου [48].

Οι επιστήμονες, στην προσπάθεια να ξεπεράσουν τους παραπάνω περιορισμούς, στράφηκαν στη χρήση αθανатоποιημένων ηπατικών κυττάρων προερχόμενων από τις κυτταρικές σειρές ανθρώπινου ηπατοβλαστώματος (HepG2) και ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HepaRG), που αποτελούν ιδανική εναλλακτική λύση λόγω της απεριόριστης διαθεσιμότητάς τους, της θεωρητικά άπειρης διάρκειας ζωής τους και της φαινοτυπικής στους σταθερότητας. Ωστόσο, ένα βασικό τους μειονέκτημα είναι η μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα αυτών των κυττάρων σε σχέση με αυτή των HPH.

Η καθοριστική ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένης και της ηπατικής, παρέχει τη δυνατότητα για το σχεδιασμό ευέλικτων *in vitro* μοντέλων για τη μελέτη διαφορετικών πτυχών της ηπατοτοξικότητας. Πιο συγκεκριμένα, τα WJ-MSCs έχουν περιγραφεί και στο παρελθόν ως το πλέον κατάλληλο μοντέλο, μεταξύ άλλων πληθυσμών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, για τη χρήση σε μεθόδους της αναγεννητικής ιατρικής, όπως και στο σχεδιασμό ανίχνευσης της τοξικότητας (Εικ.8).



Εικ 8 Τα ηπατικά βλαστικά κύτταρα και οι εφαρμογές τους

#### 11.4. Ουσίες ήπιας οργανοειδικής (ηπατικής και μη) τοξικότητας

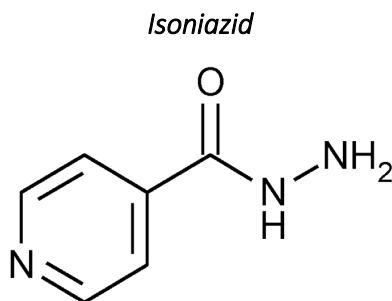
Οι εξεταζόμενες ουσίες ήπιας οργανοειδικής τοξικότητας που δοκιμάστηκαν στις τρεις κυτταρικές σειρές WJ-MSCs, HepG2 και NIH3T3, όπως και οι βασικές χρήσεις τους απεικονίζονται στον **Πίνακα 4**.

<u>Φαρμακευτική ουσία</u>	<u>Χρήση</u>
<i>Glycerol</i>	(αρνητικός μάρτυρας ελέγχου - σχεδόν καθόλου τοξική ουσία)
<i>SDS (sodium dodecyl sulfate)</i>	(θετικός μάρτυρας ελέγχου - πολύ τοξική ουσία)
<i>Methotrexate</i>	Αντινεοπλασματικός, ανοσοτροποποιητικός, ανοσοκατασταλτικός παράγοντας (θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και συνδυαστικά με άλλα φάρμακα διάφορων καρκινικών τύπων)
<i>Acetylsalicylic Acid</i>	Αντιθρομβωτικός παράγοντας. Αναλγητική και αντιυπερική δράση
<i>Lithocholic Acid</i>	Εκλεκτικός αντινεοπλασματικός παράγοντας του νευροβλαστώματος
<i>Erythromycin</i>	Αντιβιοτικό, θεραπεία δερματολογικών παθήσεων
<i>Disulfiram</i>	Φάρμακο για την αντιμετώπιση της εξάρτησης από την αιθυλική αλκοόλη, φάρμακο για το νευρικό σύστημα, χρήση στη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος (καρκίνος εγκεφάλου)
<i>Cyclosporine A</i>	Αντινεοπλασματικός και ανοσοτροποποιητικός παράγοντας (θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας)
<i>Flutamide</i>	Μη-στεροειδές αντι-ανδρογόνο (θεραπεία του καρκίνου του προστάτη), αντινεοπλασματικός και ανοσοτροποποιητικός παράγοντας (ενδοκρινική θεραπεία)
<i>Cis Platin</i>	Αντινεοπλασματικός και ανοσοκατασταλτικός παράγοντας. Ενώσεις πλατίνας
<i>Chloroquine Phosphate</i>	Αντιπαρασιτικό, ανθελονοσιακό, αντιπρωτοζωικό, εντομοκτόνο φάρμακο

**Πίνακας 4** Φαρμακευτικές ουσίες ήπιας οργανοειδικής τοξικότητας και η κλινική τους χρήση



### 11.5. Ουσίες οξείας ηπατικής τοξικότητας



Η οργανική ένωση ισονιαζίδη (isoniazid), γνωστή και ως INH (ισο-νικοτυλ-υδραζίδη), διατίθεται στο εμπόριο με διάφορες εμπορικές ονομασίες, όπως Hydra, Isovit, Laniazid, Nydrazid. Αποτελεί φαρμακευτική αγωγή πρώτης γραμμής για την πρόληψη και τη θεραπεία της φυματίωσης. Η ένωση αυτή συντέθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα [49], αλλά η αντι-φυματική της δράση αναφέρθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της 10ετίας του 1950, οπότε και 3 φαρμακευτικές εταιρίες επιχειρήσαν ανεπιτυχώς να πατεντάρουν το συγκεκριμένο φάρμακο ταυτόχρονα. Η σημαντικότερη εκ των 3 φαρμακευτικών εταιριών υπήρξε η Roche, η οποία λάνσαρε το Rimifon, το 1952 [50]. Η ισονιαζίδη χορηγείται είτε από το στόμα, ή ενδομυϊκά, ή ενδοφλέβια και βάσει των οδηγιών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) πρέπει να βρίσκεται στο βασικό κατάλογο φαρμάκων του κράτους. Η ισονιαζίδη κατασκευάζεται από ισο-νικοτινικό οξύ, το οποίο έχει παραχθεί από μεθυλο-πυριδίνη [51].

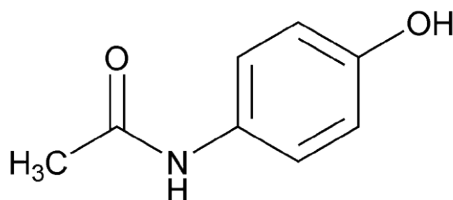
Η ισονιαζίδη αποτελεί προφάρμακο και ενεργοποιείται με την παρουσία ενός βακτηριακού ενζύμου καταλάσης-υπεροξειδάσης, το οποίο στο μυκοβακτήριο της φυματίωσης ονομάζεται KatG. Μέσω του KatG δημιουργείται ένα σύμπλεγμα ισονικοτινικού- ακυλο- NADH. Το σύμπλοκο αυτό δεσμεύεται ισχυρά σε μια πρωτεΐνη- φορέα, γνωστή ως InhA, μπλοκάροντας έτσι το φυσικό υπόστρωμα ενοϋλ- AcpM και παρεμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου της συνθάσης λιπαρού οξέος. Αυτή η διαδικασία αναστέλλει τη σύνθεση μυκολικού οξέος, που αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος του μυκοβακτηρίου. Με την ενεργοποίηση της ισονιαζίδης μέσω του KatG παράγονται μια σειρά από οξείδια, συμπεριλαμβανομένου του νιτρικού οξειδίου [52], το οποίο έχει

δειχθεί πως είναι επίσης σημαντικό για τη δράση ενός άλλου αντι-μυκοβακτηριακού προφαρμάκου, του PA-824 [53].

Η ισονιαζίδη έχει βακτηριοκτόνο δράση σε αποικίες ταχέως διαιρουμένων μυκοβακτηρίων, αλλά σε αποικίες μυκοβακτηρίων βραδείας ανάπτυξης έχει βακτηριοστατική δράση. Είναι αναστολέας του συστήματος P450 και ως εκ τούτου αποτελεί πηγή ελευθέρων ριζών [54].

Στο επίπεδο των παρενεργειών, η ισονιαζίδη μπορεί να προκαλέσει σοβαρές και ενίοτε θανατηφόρες ηπατικές βλάβες. Η ηπατοτοξικότητα αυτή μπορεί να αποφευχθεί μέσω στενής κλινικής παρακολούθησης. Η ισονιαζίδη μεταβολίζεται στο ήπαρ κυρίως μέσω ακετυλίωσης και dehydrazination. Σε ορισμένους ασθενείς η λήψη θεραπείας με ισονιαζίδη έδρασε ηπατοτοξικά. Για την παραπάνω ηπατοτοξικότητα πιστεύεται πως ευθύνεται ο μεταβολίτης N-ακετυλοϋδραζίνη [55].

*Acetaminophen*

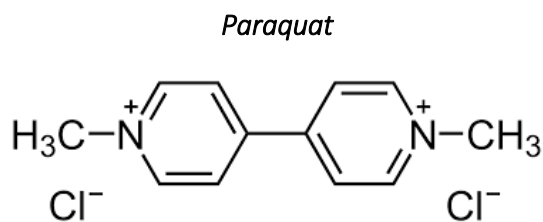


Η ακεταμινοφαίνη (acetaminophen), επίσης γνωστή και ως παρακεταμόλη, αποτελεί ένα ευρείας χρήση αναλγητικό και αντιπυρετικό φάρμακο (ταξινομείται ως ήπιο αναλγητικό) [56]. Οι κοινές εμπορικές ονομασίες του φαρμάκου είναι Tylenol και Panadol. Σε συνδυασμό με οπιοειδή αναλγητικά, ή και ΜΣΑΦ (NSAIDs) η ακεταμινοφαίνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την διαχείριση των έντονων μετεγχειρητικών πόνων και πόνων από καρκίνο [57].

Ενώ στις συνιστώμενες δόσεις η ακεταμινοφαίνη είναι γενικά ασφαλής, μπορεί να προκαλέσει ακόμα και θάνατο ακόμα και σε μικρή υπερδοσολογία. Σε αντίθεση με άλλα ήπια αναλγητικά, η

ακεταμινοφαίνη είναι σημαντικά πιο τοξική εάν ληφθεί σε μικρή υπερβολική δόση, ενώ αντίθετα είναι λιγότερο τοξική όταν λαμβάνεται χρονίως στις συνιστώμενες δόσεις [58].

Ο μεταβολισμός της ακεταμινοφαίνης λαμβάνει χώρα στον ήπαρ και η ουσία είναι ηπατοτοξική. Η συχνότερη παρενέργεια της ακεταμινοφαίνης είναι η οξεία ηπατική ανεπάρκεια και θάνατος από υπερδοσολογία. Αξιοσημείωτο είναι ότι το 2011 ο FDA απαίτησε την αναγραφή του κινδύνου σοβαρής ηπατικής βλάβης στις αντενδείξεις όλων των ετικετών των προϊόντων που περιέχουν ακεταμινοφαίνη [59] και ταυτόχρονα ξεκίνησε δημόσιο εκπαιδευτικό πρόγραμμα ενημέρωσης των καταναλωτών για τις παρενέργειες του φαρμάκου [60]. Ο κίνδυνος οξείας ηπατικής ανεπάρκειας εξαιτίας της λήψης ακεταμινοφαίνης αυξάνεται στους χρόνια αλκοολικούς ή σε ασθενείς με ηπατική βλάβη. Η υπερδοσολογία ακεταμινοφαίνης αποτελεί την κύρια αιτία θανάτων στον δυτικό κόσμο [61,62].



Το paraquat, με χημική ονομασία 1,1''-διμέθυλ- 4,4'- διπυριδινικό ιόν, αποτελεί ένα παρασιτοκτόνο (χημικό ζιζανιοκτόνο) που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος ζιζανίων (ανεπιθύμητων φυτών) σε αγροτικές καλλιέργειες συμπεριλαμβανομένων των δημητριακών, σπορέλαιων, φρούτων και λαχανικών. Το paraquat είναι ουσία ταχείας δράσης και μη- εκλεκτική, που σημαίνει ότι σκοτώνει ένα ευρύ φάσμα ετήσιων αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων, όταν έρχεται σε επαφή με αυτά. Είναι επίσης ισχυρά τοξικό για τον άνθρωπο και τα ζώα. Το 2011 αποδείχθηκε από τον Kamel F. και τους συνεργάτες του [60], πως η ανάπτυξη της νόσου του Parkinson συνδέεται με την έκθεση σε paraquat [64].

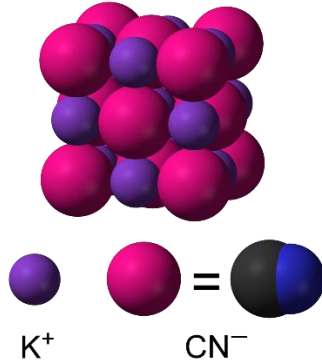
Το paraquat συντέθηκε για πρώτη φορά το 1882, ωστόσο οι ζιζανιοκτόνες ιδιότητές του ανακαλύφθηκαν το 1955 [65]. Το paraquat κατασκευάστηκε και πωλήθηκε για πρώτη φορά από την ICI/ Syngenta στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Σήμερα αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα και χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση ενέκρινε τη χρήση του paraquat το 2004, αλλά η Σουηδία με τη στήριξη της Δανίας, της Φινλανδίας και της Αυστρίας άσκησε έφεση εναντίον αυτής της απόφασης την οποία και κέρδισε το 2007, οδηγώντας το Δικαστήριο να ακυρώσει την παραπάνω απόφαση. Η βασική επιχειρηματολογία υπέρ της απόσυρσης του ζιζανιοκτόνου ήταν πως οι έρευνες έδειξαν αποτελέσματα στα οποία λανθασμένα δεν υπήρχαν ενδείξεις νευροτοξικότητας που σχετιζονταν με το paraquat, όπως επίσης πως θα έπρεπε ήδη από το 2004 να έχουν ξεκινήσει έρευνες σχετικά με την εμφάνιση της νευροεκφυλιστικής νόσου του Parkinson μέσω της επαφής με paraquat [66].

Όταν το paraquat λαμβάνεται από του στόματος στην καθαρή του μορφή (χωρίς αραιώσεις ή προσμίξεις) είναι εξαιρετικά τοξικό για τα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου και οδηγεί δυνητικά σε σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας ARDS). Στην περίπτωση αυτή μπορεί να υπάρξει θάνατος ακόμα και 30 μέρες μετά την κατάποση. Το αραιωμένο paraquat που χρησιμοποιείται για τον ψεκασμό των καλλιιεργειών είναι λιγότερο τοξικό [65].

Σε μελέτες οξείας τοξικότητας έχει αποδειχθεί ότι το paraquat είναι εξαιρετικά τοξικό, όταν λαμβάνεται δια της αναπνευστικής οδού από τα πειραματόζωα και κατατάσσεται στην Κατηγορία Τοξικότητας I. Δια της στοματικής οδού είναι τοξικό (Κατηγορία Τοξικότητας II), ενώ μέσω του δέρματος είναι μετρίων τοξικό (Κατηγορία Τοξικότητας III). Προκαλεί σοβαρό ερεθισμό των ματιών (Κατηγορία II), και ελάχιστο δερματικό ερεθισμό (Κατηγορία IV, ελαφρώς τοξικό) [67]. Σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου Νόσων, η κατάποση paraquat μπορεί να προκαλέσει ηπατική, καρδιακή, πνευμονική και νεφρική ανεπάρκεια εντός έως και 30 ημερών μετά την κατάποση [68]. Τέλος η κατάποσή του ευθύνεται για πολλούς τυχαίους θανάτους από δηλητηρίαση και αυτοκτονίες [69].

### Potassium Cyanide (κυανιούχο κάλιο)



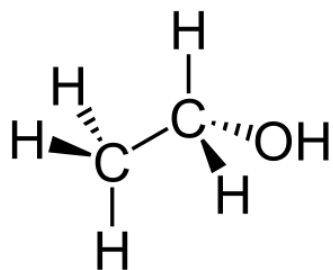
Το κυανιούχο κάλιο αποτελεί μια ανόργανη ένωση με χημικό τύπο KCN. Η άχρωμη αυτή κρυσταλλική ένωση, έχει παρόμοια εμφάνιση με τη ζάχαρη και πολύ μεγάλη διαλυτότητα στο νερό. Το KCN χρησιμοποιείται στην εξόρυξη χρυσού, όπως επίσης στην οργανική σύνθεση και τον γαλβανισμό [70].

Το KCN είναι ιδιαίτερα τοξικό. Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του KCN παράγονται μικρές ποσότητες υδροκυανίου HCN, το οποίο εκκρίνει τη χαρακτηριστική μυρωδιά του πικραμυγδάλου [71]. Ωστόσο η ικανότητα να συλλάβει κάποιος τη συγκεκριμένη μυρωδιά είναι γενετικά προκαθορισμένη. Η εισπνοή του προϊόντος της υδρόλυσης HCN είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη για τον άνθρωπο, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, το KCN αποτελεί ισχυρό αναστολέα της κυτταρικής αναπνοής, αφού ενεργεί πάνω στο μιτοχονδριακό κυτόχρωμα C, με συνέπεια να παρεμποδίζει την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτή η διαδικασία παρεμποδίζει το σώμα να παράγει ενέργεια μέσω της οξείδωσης των τροφών. Συνέπεια του αναερόβιου μεταβολισμού αποτελεί η γαλακτική οξέωση. Ο θάνατος μέσω της οξείας δηλητηρίασης από υδροκυάνιο προέρχεται από την υποξία του νευρικού ιστού.

Στο παρελθόν το κυανιούχο κάλιο χρησιμοποιήθηκε ευρέως ως μέσο αυτοκτονιών και δολοφονιών.

Για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος που προκαλείτε από την απελευθέρωση HCN, μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα KCN και υπεροξειδίου του υδρογόνου ή υποχλωριώδους νατρίου. Η διατήρηση αυτών των διαλυμάτων σε βασικό pH, μπορεί να εξαλείψει την πιθανότητα παραγωγής υδροκυανίου [72].

*Ethanol (αιθυλική αλκοόλη)*

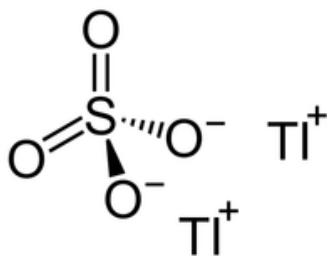


Η αιθυλική αλκοόλη (κοινώς οινόπνευμα ή αλκοόλ) αποτελεί μια οργανική ένωση που περιέχει άνθρακα (C), υδρογόνο (H) και οξυγόνο (O) στο μόριό της. Η χημικά «καθαρή» αιθανόλη (EtOH), σε ιδανικές συνθήκες (θερμοκρασία 25°C και πίεση 1 atm) βρίσκεται σε υγρή μορφή και είναι άχρωμη, εύφλεκτη και πτητική. Επιπλέον ανήκει στα νευροτοξικά ψυχοενεργά ναρκωτικά [73,74], καθώς είναι από τα αρχαιότερα ψυχανγωγικά ποτά που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. Η κατανάλωση αιθυλικής αλκοόλης μπορεί να προκαλέσει οξεία αλκοολική δηλητηρίαση (κοινώς μέθη) και αποτελεί συνηθισμένο επείγον ιατρικό πρόβλημα.

Φαρμακοκινητική: η αιθανόλη απορροφάται ταχέως από το πεπτικό και ενώ η απορρόφησή της επιταχύνεται με την παρουσία νερού, επιβραδύνεται κυρίως από την ύπαρξη τροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος. Επηρεάζεται επίσης από το είδος του ποτού και τη συγκέντρωσή του σε οινόπνευμα. Μέγιστα επίπεδα στο αίμα παρατηρούνται μετά από 30-60 λεπτά, από τη λήψη με άδειο στομάχι. Για δεδομένη δόση οιοπνεύματος, οι γυναίκες εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα, ίσως λόγω αφενός μειωμένου φαινομένου πρώτης διόδου από το ήπαρ και αφετέρου μειωμένης δραστηριότητας της αλκοολικής δεϋδρογονάσης στον γαστρικό βλεννογόνο.

Η αιθανόλη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ, ενώ λιγότερο από 10% αποβάλλεται αναλλοίωτη από τους πνεύμονες, νεφρούς, δέρμα και κόπρανα και διαχέεται σε όλα τα υγρά του σώματος, ενώ διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τον πλακούντα. Στον μεταβολισμό της συμμετέχουν τρία ενζυμικά συστήματα: η αλκοολική δεϋδρογονάση, το μικροσωμιακό οξειδωτικό σύστημα της αιθανόλης και η καταλάση. Η αλκοολική δεϋδρογονάση είναι το σημαντικότερο από τα τρία ένζυμα. Παρότι η απομάκρυνση της αιθανόλης από το ανθρώπινο σώμα, γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω της δεϋδρογονάσης της αιθανόλης στο ήπαρ, η διαδικασία της απομάκρυνσης είναι περιορισμένη. Έτσι η απομάκρυνση του οινοπνεύματος γίνεται με κινητική μηδενικής τάξης (σταθερός ρυθμός) σε πιο χαμηλά επίπεδα αιθανόλης και με κινητική πρώτης τάξης (η απομάκρυνση του φαρμάκου είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του) σε υψηλότερα επίπεδα, ιδίως σε χρόνια αλκοολικούς [75]. Η χρόνια χρήση οινοπνεύματος μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στο ήπαρ, όπως οξεία ηπατική ανεπάρκεια και θάνατο [76].

#### *Thallium (I) Sulfate*



Το θεικό θάλιο (Thallium(I)Sulfate) αποτελεί το θεικό άλας του θαλίου με χημικό τύπο  $Tl_2SO_4$  και αριθμό οξείδωσης +1. Είναι μια ένωση άοσμη, άγευστη, άχρωμη και εξαιρετικά τοξική [77].

Κατά τη διάρκεια των 2 τελευταίων αιώνων, το θεικό θάλιο χρησιμοποιήθηκε σε ιατρικές θεραπείες, τελικά όμως εγκαταλείφθηκε. Κατά τον 19<sup>ο</sup> αιώνα χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως τρωκτικοκτόνο [78]. Οι παραπάνω εφαρμογές απαγορεύτηκαν το 1975 στις ΗΠΑ, λόγω της μη επιλεκτικής τοξικότητας του συγκεκριμένου φαρμάκου. Επιπλέον, το θεικό θάλιο αναστέλλει την ανάπτυξη των φυτών, παρεμποδίζοντας τη βλάστησή τους.

Σήμερα, το θειικό θάλιο χρησιμοποιείται στην έρευνα κυρίως ως πηγή TI+. Αποτελεί, επίσης, πρόδρομη ένωση του σουλφιδίου του θαλίου (TI<sub>2</sub>S), το οποίο παρουσιάζει υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα μετά από έκθεση σε υπέρυθρη ακτινοβολία.

Το θειικό θάλιο είναι διαλυτό στο νερό και οι τοξικές επιδράσεις του προέρχονται από το κατιόν του θαλίου (I). Η μέση θανατηφόρος δόση του θειικού θαλίου στους ενήλικες είναι 1g περίπου. Λόγω της σύστασής του (απλή σκόνη) καθώς και των ακαθόριστων ιδιοτήτων του, το θειικό θάλιο μπορεί εύκολα να παρεννοηθεί ως πιο αβλαβής χημική ουσία. Μπορεί να εισέλθει στον οργανισμό μέσω κατάποσης, εισπνοής, ακόμα και επαφής με το δέρμα. Το κατιόν του θαλίου (I) προσομοιάζει τα ιόντα Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, που είναι απαραίτητα για τη ζωή. Εφόσον, λοιπόν, το κατιόν θαλίου (I) εισέλθει εντός του κυττάρου, το ισοζύγιο Na/K διαταράσσεται. Λόγω της δηλητηριώδους φύσης του, η χρήση του (οικιακή και εργοστασιακή) έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες του δυτικού κόσμου.

Ως θνησιγενής αναφέρεται μια δόση θειικού θαλίου άνω των 500mg. Μετά την είσοδο στον οργανισμό, το θειικό θάλλιο συσσωρεύεται στους νεφρούς, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και άλλους ιστούς του σώματος.

Κατά τη δεκαετία του 1950, το θειικό θάλιο χρησιμοποιήθηκε στο Ισραήλ, ως τρωκτικοκτόνο, για τον έλεγχο του πληθυσμού των τρωκτικών. Αποτέλεσμα αυτής της χρήσης εικάζεται πως είναι η εξαφάνιση των καφέ κουκουβαγιών (της οικογένειας των τυπικών κουκουβαγιών) στην ευρύτερη περιοχή [79].

## 12. Μέθοδοι απομόνωσης και *in vitro* τοξικότητας και θεωρητικά σημεία των μεθόδων

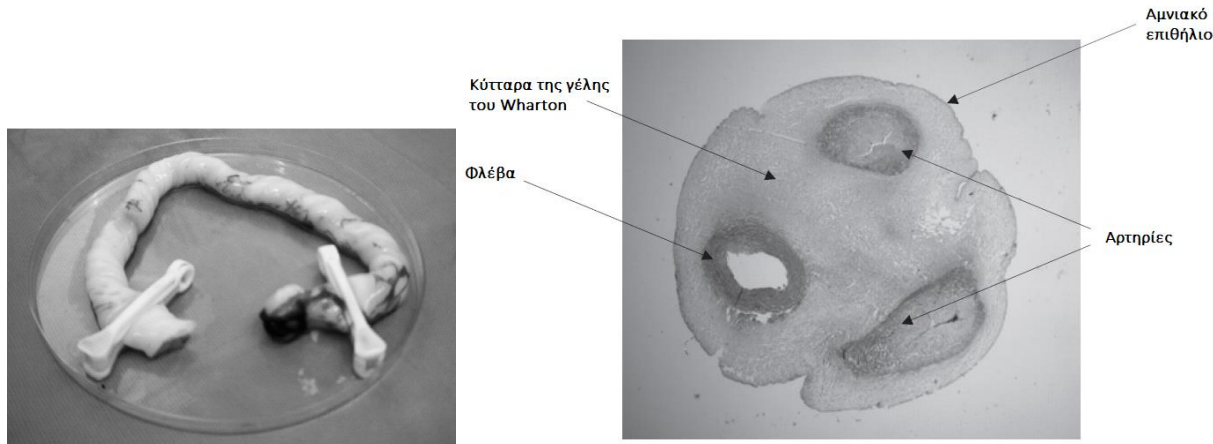
### 12.1. Μέθοδος απομόνωσης μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του ομφαλίου λώρου

#### 12.1.1. Απομόνωση και καλλιέργεια των κυττάρων της γέλης του Wharton του ανθρώπου

Η ανατομία του ομφαλίου λώρου (UC) είναι σχετικά απλή (**Εικ.9**). Υπάρχουν 3 μεγάλα αγγεία, τα οποία διατρέχουν κατά μήκος τον ομφάλιο λώρο (δυο αρτηρίες και μια φλέβα). Τα αγγεία αυτά



περιβάλλονται από έναν ζελατινώδη συνδετικό ιστό, γνωστός ως γέλη του Wharton (Wharton's Jelly), ο οποίος βρίσκεται επί του αμνιακού επιθηλίου (**Εικ.10**). Ωστόσο, ενώ η δομή του ομφαλίου λώρου είναι απλή, πρέπει πάντα να υπενθυμίζεται ότι ο συνδετικός ιστός, που ονομάζεται γέλη του Wharton, είναι εξειδικευμένος για το φυσιολογικό ρόλο της αποφυγής οποιασδήποτε βλάβης των αγγείων κατά τη διάρκεια της κύησης του εμβρύου. Για το λόγο αυτό, η πλειονότητα των κυττάρων της γέλης του Wharton είναι μυοϊνοβλάστες, όπως αποδείχτηκε το 1993 από τον Takechi και τους συνεργάτες του [80], οι οποίοι υπέθεσαν επιπλέον πως τα WJ κύτταρα πιθανόν είναι διαφορετικά από τα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψιν τους αυτά τα δεδομένα, οι ερευνητές προχώρησαν στη λήψη στρωματικών κυττάρων από τα WJ κύτταρα και από τα κύτταρα του ομφαλίου λώρου, χρησιμοποιώντας μια γκάμα τεχνικών συμπεριλαμβανομένης της ενζυμικής πέψης του WJ ιστού [81, 83, 80], αλλά και της καλλιέργειας μοσχευμάτων [84].



**Εικ 9** Ομφάλιος λώρος ανθρώπου

**Εικ 10** Μικροσκοπική απεικόνιση εγκάρσιας τομής του ομφαλίου λώρου του ανθρώπου. Ο λώρος έχει μονιμοποιηθεί με τη χρήση αιμοξυλίνης και ιωσίνης.

Η νεότερη, όμως, από τις παραπάνω τεχνικές στοχεύει ειδικά στην απομόνωση των μεσεγχυματικών αυτών κυττάρων από περιαγγειακές θέσεις του ομφαλίου λώρου.

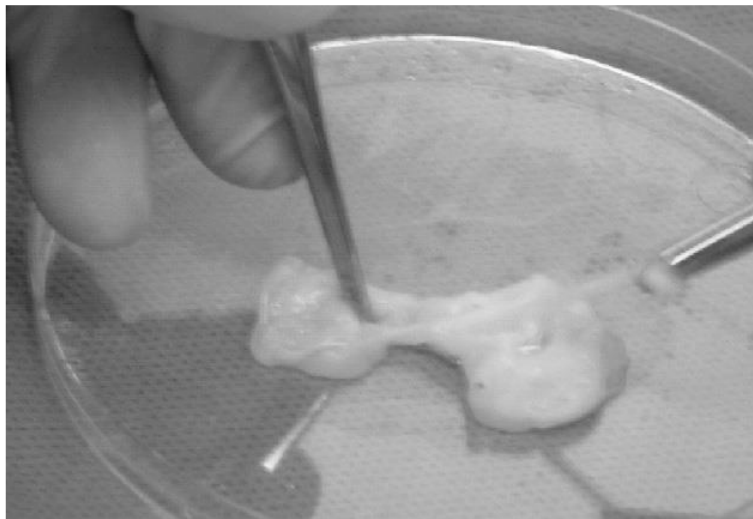
Αρχικά, συλλέγεται ένα τμήμα του ομφαλίου λώρου μήκους 20-30cm σε δοχείο συλλογής 8oz, που περιέχει καλλιεργητικό μέσο α-MEM και αντιβιοτικά. Το τμήμα του ομφαλίου λώρου παρέχεται κατευθείαν από το νοσοκομείο αμέσως μετά τον τοκετό και μεταφέρεται στο εργαστήριο όπου αρχικά φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο λώρος τοποθετείται σε έναν αποστειρωμένο δίσκο ανατομής και κόβεται σε τμήματα των 4-5εκατοστών (προς αποφυγή τυχόν θραυσμάτων κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού της γέλης του Wharton) **(Εικ.11)**. Στη συνέχεια, τα μικρότερα τμήματα του λώρου επεξεργάζονται με τον ακόλουθο τρόπο: 1) απομακρύνεται το επιθήλιο με ειδική λαβίδα **(Εικ.12)**, 2) τα ομφαλικά αγγεία αποσπώνται **(Εικ.13)**, συμπεριλαμβανομένων και των λοιπών περιαγγειακών ιστών **(Εικ.14)** και εν συνεχεία 3) με τη διαδικασία της θηλιάς (loop) δένονται με μεταξωτά ράμματα, ώστε να προληφθεί τυχόν αιμοποιητική ή ενδοθηλιακή μόλυνσή τους. Τα επεξεργασμένα πλέον αγγεία τοποθετούνται σε 20ml κολλαγενάσης Τύπου Ι και επωάζονται για μια νύχτα στους 37° C **(Εικ.15)**. Την επομένη, περισυλλέγεται το υπερκείμενο, μέσα στο οποίο βρίσκονται τα WJκύτταρα **(Εικ.16)** και αφού πραγματοποιηθεί η διαδικασία της πλύσης και της μέτρησης των κυττάρων, στρώνονται σε ιστοκαλλιέργεια σε πυκνότητα 4000 κυττάρων/ cm<sup>2</sup>.



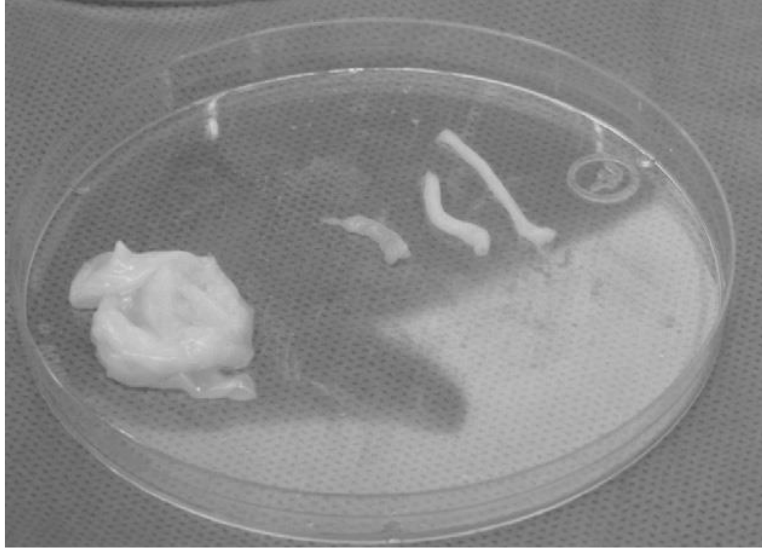
**Εικ 11** Ομφάλιος λώρος τεμαχισμένος σε τμήματα 4-5 εκατοστών



*Εικ 12* Επιμήκης τομή του αμνίου, ώστε να εκτεθούν τα αιμοφόρα αγγεία



*Εικ 13* Διαχωρισμός αγγείου από τον υπόλοιπο ιστό με τη χρήση λαβίδας



*Εικ 14 Διαχωρισμένα αιμοφόρα αγγεία από τον ομφάλιο λώρο*

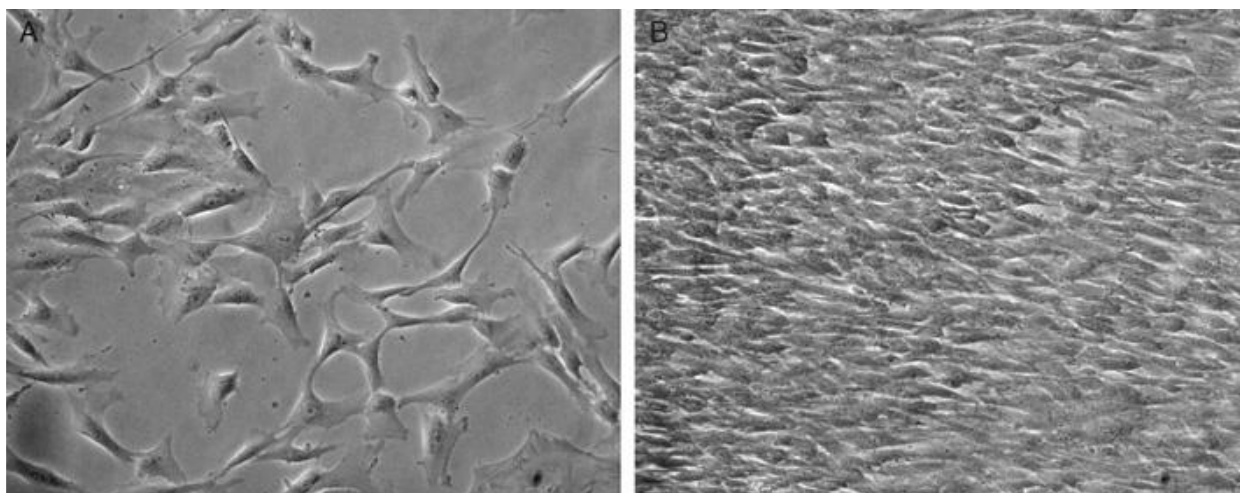


*Εικ 15 Ιστός ομφαλίου λώρου σε διάλυμα ενζυμικής πέψης*



*Εικ 16 Συλλογή υπερκειμένου μέσα στο οποίο περιέχονται τα WJ κύτταρα με τη διαδικασία του «στυσίματος» του ομφαλίου λώρου*

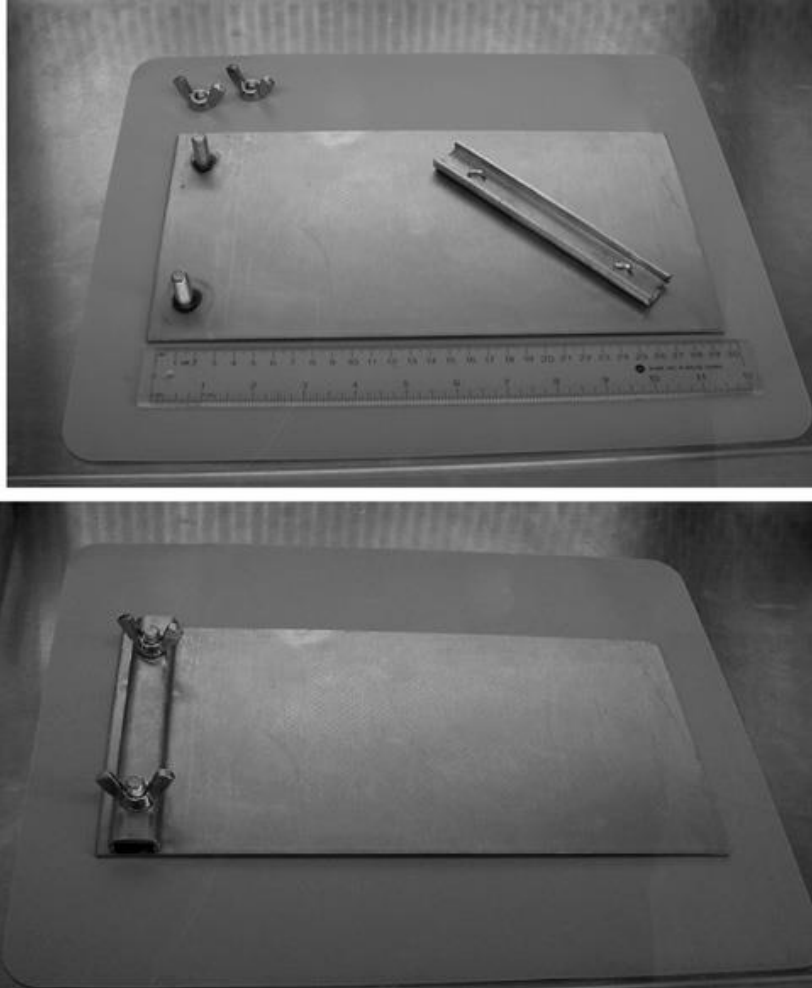
Η παραπάνω διαδικασία απομόνωσης οδηγεί στη συλλογή κυττάρων με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, τα οποία είναι ισχυρά προσκολλημένα στην επιφάνεια της ιστοκαλλιέργειας (**Εικ.17**), αναδεικνύοντας πως η διαδικασία απομόνωσης WJ κυττάρων μπορεί πράγματι, να πραγματοποιηθεί με τη χρήση πολύ μικρών δειγμάτων ιστού του ομφαλίου λώρου (ακόμα και από δείγματα μήκους 3 εκατοστών), και στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσει σε μια ταχύτατη ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού.



*Εικ 17* Αντιπροσωπευτική μικροσκοπική απεικόνιση καλλιέργειας WJ κυττάρων. (A) κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε 3-5 ημερών καλλιέργειας, (B) κυτταρικός πολλαπλασιασμός 12-14 ημερών καλλιέργειας

Οι ερευνητές πραγματοποιώντας την παραπάνω διαδικασία κατ' εξακολούθηση, παρατήρησαν πως τα αγγεία του ομφαλίου λώρου είναι αρκετά ανθεκτικά, ώστε να είναι δυνατή η επεξεργασία του λώρου χωρίς τη διαδικασία τεμαχισμού του σε μικρά τμήματα των 4-5 εκατοστών. Για να μπορέσει όμως να διεκπεραιωθεί ορθά η επεξεργασία ολόκληρου του δείγματος, πρέπει να υπάρχει στο εργαστήριο ειδικός πάγκος εργασίας, όπου θα συγκρατείται ο λώρος. Έτσι, μπορεί να τοποθετηθεί ολόκληρος ο λώρος στο συγκεκριμένο πάγκο, να συσφιχθεί στο ένα άκρο (**Εικ.18**) και στη συνέχεια με τη χρήση νυστεριού να υποστεί τομή περιφερειακά του αμνιακού επιθηλίου, κοντά στο συσφιγμένο άκρο. Με αυτόν τον τρόπο, το επιθήλιο διαχωρίζεται από τον λώρο και απομακρύνεται με ειδική λαβίδα. Εάν επιτύχει η ολοκληρωτική του απομάκρυνση με μιας, τότε το επιθήλιο θα έχει τη μορφή σωλήνα, διαφορετικά η διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί έως ότου απομακρυνθεί το σύνολο των υπολειμμάτων του επιθηλίου από τον ομφάλιο λώρο. Στη συνέχεια, απελευθερώνεται ο λώρος από την θηλιά που τον περιέσφιγγε και πραγματοποιείται ο διαμήκης διαχωρισμός των αγγείων. Μετά το διαχωρισμό ακολουθεί το δέσιμο των αγγείων με ειδικές μεταξωτές ίνες και η τοποθέτησή τους σε κολλαγενάση για επώαση, όπως παραπάνω.

Η παραπάνω διαδικασία μειώνει το χρόνο ανατομής ενός τμήματος ομφαλίου λώρου 30 εκατοστών σε περίπου 15 λεπτά.



**Εικ18** Ειδικός πάγκος ανατομής ομφαλίου λώρου

Για την περαιτέρω μείωση του χρόνου επεξεργασίας, μπορεί να μειωθεί ο χρόνος της ενζυμικής πέψης, όπως επίσης και ο χρόνος παραμονής των αιμοφόρων αγγείων στο διάλυμα ενζυμικής πέψης.

Παραπάνω περιγράφεται η διαδικασία ενζυμικής πέψης των αγγείων σε μικρά σωληνοειδή δοχεία (falcon), τα οποία επάζονται όλη νύχτα τοποθετημένα σε ειδική συσκευή ανάδευσης, ώστε να διατηρείται η ροή του υγρού διαλύματος. Αυτό όμως οδηγεί συνήθως στη δημιουργία ενός θολού, μη διαυγούς διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκονται τα αγγεία. Κατά συνέπεια είναι υποχρεωτική και νέα πλύση, ώστε να απομακρυνθούν στη συνέχεια τα αγγεία και να μειωθεί το ιξώδες του διαλύματος στο βαθμό που θα είναι ικανή η απομόνωση των κυττάρων. Όλη η παραπάνω διαδικασία μπορεί να

παρακαμφθεί με την προσθήκη του ενζύμου υαλουρονιδάσης στο διάλυμα της κολλαγενάσης, και ταυτόχρονα με την προσθήκη μαγνήτη εντός του falkon για την ισχυρότερη ανάδευση του διαλύματος. Τα 2 αυτά βήματα μπορούν να μειώσουν το χρόνο πέψης και κατ' επέκταση της όλης διαδικασίας, κατά περίπου 4 ώρες.

### **12.1.2. Κρυοσυντήρηση των επεξεργασμένων αιμοφόρων αγγείων – απομονωμένων από τον ομφάλιο λώρο**

Στην περίπτωση που τα WJ κύτταρα δεν χρειάζονται άμεσα, δεν είναι αναγκαία η εκτέλεση ολόκληρης της διαδικασίας ανατομής/ πέψης. Πιο συγκεκριμένα, μόλις τα αγγεία έχουν διαχωριστεί επιτυχώς και είναι έτοιμα για τη διαδικασία της πέψης, τότε εισάγονται σε 5-15ml ενός κρυοπροστατευτικού διαλύματος και επωάζονται στους 4° C για 15-60 λεπτά. Μετά την επώαση τα αγγεία μεταφέρονται κρυοφιαλίδια ή ειδικές σακούλες παγώματος και τοποθετούνται σε καταψύκτη ελεγχόμενο στους -80° C. Μόλις τα δείγματα σταθεροποιήσουν τη θερμοκρασία τους στους -80°C, τοποθετούνται κατευθείαν σε υγρό άζωτο στους -200° C, όπου μπορούν να παραμείνουν αποθηκευμένα επ' αόριστον. Όταν υπάρξει ανάγκη απομόνωσης των WJ κυττάρων, τότε αποψύχεται ο ιστός ως εξής: τοποθετείται σε κλίβανο θερμοκρασίας 42° C για 5-15 λεπτά και στη συνέχεια εισάγεται απευθείας στο διάλυμα πέψης, βάσει πρωτοκόλλου, όπως περιγράφεται παραπάνω. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η τάχιστη επεξεργασία των αγγείων του λώρου και μειώνεται έτσι δραματικά ο τεχνικός χρόνος του πειράματος.

### **12.2. Μέθοδοι για δοκιμασίες *in vitro* κυτταροτοξικότητας**

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλά *in vitro* μοντέλα τα οποία βασίζονται σε αντιδράσεις βιοφωταύγειας όπως και χρωματομετρίας. Οι διαθέσιμες πλέον δοκιμασίες είναι ικανές να προσδιορίσουν μία ποικιλία δεικτών, οι οποίοι αφορούν:

1. στον αριθμό των νεκρών κυττάρων (δοκιμασία κυτταροτοξικότητας)
2. στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων (δοκιμασία βιωσιμότητας)

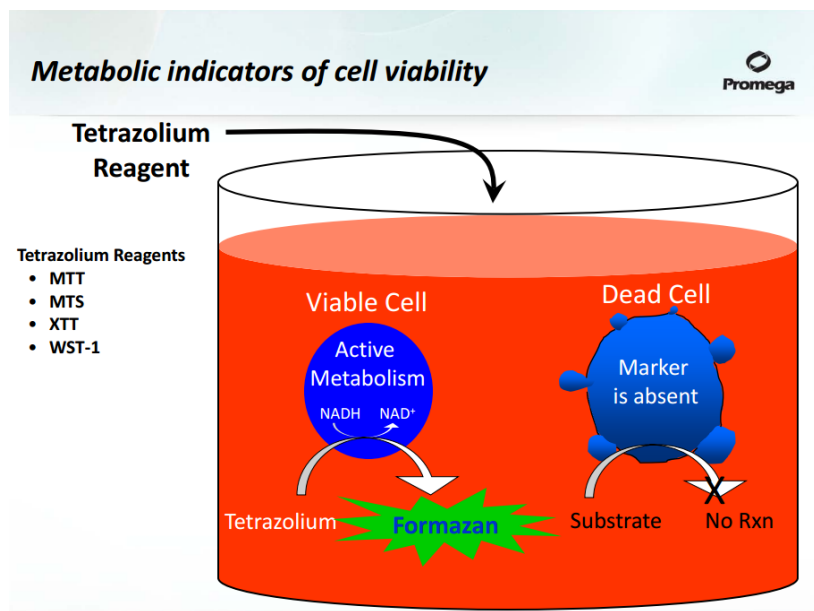


3. στον συνολικό αριθμό των κυττάρων ή/ και στην κατανόηση του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου (π.χ. απόπτωση/ νέκρωση)

### 12.2.1. Η δοκιμασία MTS

Για πρώτη φορά το 1983 περιγράφηκε από τον Mosmann η μέθοδος της ταχείας χρωματομετρικής δοκιμασίας για την κυτταρική ανάπτυξη και την επιβίωση αποτελώντας τομή για τα μέχρι πρωτίνος δεδομένα στις *in vitro* δοκιμασίες τοξικότητας και βιωσιμότητας. Η χρωματομετρική μέθοδος MTS (MTS colorimetric assay) βασίζεται στην μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε παράγωγα φορμαζάνης από το σύστημα κυτοχρώματος των ζωντανών κυττάρων. Το κίτρινο χρώματος άλας τετραζολίου, MTS (3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)- 5-(3-καρβοξυμεθοξυφαινυλ)- 2-(4-σουλφοφαινυλ)- 2H-τετραζολίου) οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και ακολουθεί η παραγωγή ενός έντονα χρωματισμένου διαλυτού υδατικού προϊόντος φορμαζάνης (μωβ-πορφυρό) το οποίο είναι χρωματομετρικά μετρήσιμο στα 490nm.

Η οξείδωση του άλατος τετραζολίου MTS σε φορμαζάνη είναι αποτέλεσμα της δράσης των αφυδρογονασών που παράγουν αναγωγικά ισοδύναμα, όπως το NADH ή NADPH. Στην συνέχεια το NADH [85] μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του σε ένα αντιδραστήριο μεταφοράς ηλεκτρονίων (όπως η μεθοθειική φαιναζίνη PMS) με αποτέλεσμα την αναγωγή αυτών των ενώσεων σε NAD<sup>+</sup> ή NADP<sup>+</sup>. Οι αναχθείσες ETRs, με την σειρά τους, αλληλεπιδρούν άμεσα και οξειδώνουν το άλας τετραζολίου MTS με αποτέλεσμα την παραγωγή του διαλυτού υδατικού προϊόντος φορμαζάνης. Η παραπάνω αντίδραση οξειδο-αναγωγής πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή των προϊόντων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων(**Εικ.19**).



*Εικ 19 Αντίδραση οξειδοαναγωγής κατά τη δοκιμασία MTS. Το NADH μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του σε ένα αντιδραστήριο μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπου ανάγεται σε NAD<sup>+</sup>. Οι αναχθείσες ETRs, με την σειρά τους, αλληλεπιδρούν άμεσα και οξειδώνουν το άλας τετραζολίου MTS με αποτέλεσμα την παραγωγή φορμαζάνης. (Promega)*

Η μέθοδος MTS περιγράφεται συχνά ως «η δοκιμασία MTT σε ένα βήμα», διότι προσφέρει ένα βασικό πλεονέκτημα σε σχέση με την MTT: την ευκολία της προσθήκης του αντιδραστηρίου (MTS) απευθείας στην κυτταρική καλλιέργεια, χωρίς τα ενδιάμεσα βήματα που απαιτούνται στη μέθοδο MTT. Ωστόσο, αυτή η ευκολία καθιστά τη μέθοδο MTS επιρρεπή σε «λάθη» κατά τη διαδικασία της φωτομέτρησης, διότι τα ενδιάμεσα βήματα της δοκιμασίας MTT εξαλείφουν τις πιθανότητες ύπαρξης τυχόν υπολειμμάτων από τις χρωματισμένες χημικές ενώσεις, κάτι που δεν συμβαίνει στη δοκιμασία ενός σταδίου MTS. Συνεπώς χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να διασφαλίζεται η ακρίβεια στην ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής. Πλέον, ολοένα και περισσότεροι ερευνητές υπερασπίζονται την αναγκαιότητα για περαιτέρω ποιοτικές παρατηρήσεις μέσω μικροσκοπίου, ώστε να επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της MTS, κάτι βέβαιο που θα έπρεπε να γίνεται για όλους τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς [86].

Η αποτελεσματικότητα και η ευελιξία της παραπάνω μεθόδου έχει αποδειχθεί από διάφορους ερευνητές [87-89]. Τα πλεονεκτήματα της δοκιμασίας MTS είναι τα εξής:

- Η δυνατότητα μέτρησης του αριθμού των κυττάρων, χωρίς να χρειάζεται να «ενοχληθούν» τα κύτταρα από την αφαίρεση του καλλιεργητικού μέσου, κάτι που αποτελεί και το βασικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου [90].
- Η δυνατότητα εκτέλεσης της δοκιμασίας σε «ένα βήμα» στα πολύ-τροβλία, δίχως πλύσεις και κυτταρική συγκομιδή.
- Η ικανότητα λήψεων πολλαπλών αναγνώσεων σε ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα (εν αντιθέσει με τη δοκιμασία MTT)
- Η χρήση ενός ενιαίου διαλύματος «σε ένα βήμα» και με μεγάλη διαλυτότητα στο καλλιεργητικό μέσο, σε αντίθεση με το προγονικό του στη δοκιμασία MTT.
- Η μη χρήση οργανικών διαλυτών (όπως το DMSO για τη διάλυση των κρυστάλλων φορμαζάνης κατά την εφαρμογή της δοκιμασίας MTT).
- Η παροχή του διαλύματος έτοιμου προς χρήση με την μορφή σταθερού, παγωμένου, στείρου διαλύματος [91]

Από την άλλη πλευρά, τα μειονεκτήματα της μεθόδου εντοπίζονται στην πολύ προσεκτική optimization (η οποία όμως γίνεται άπαξ) και στο χρόνο αναμονής για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, ο οποίος κυμαίνεται από 1 έως 4 ώρες. (promega)

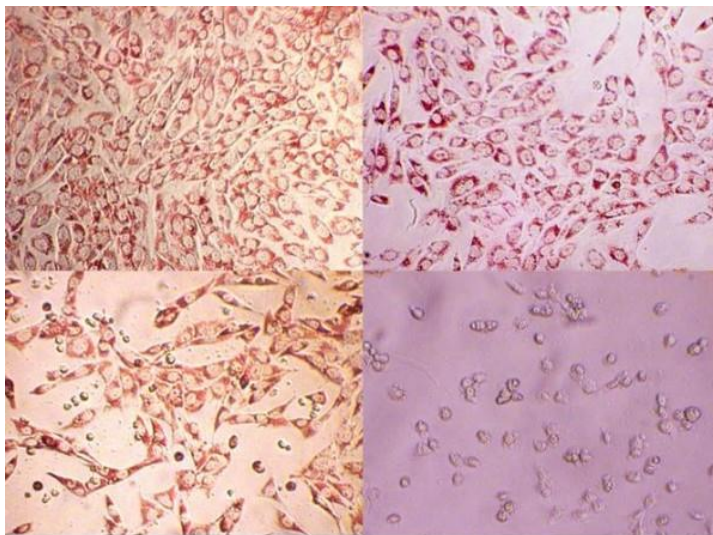
### 12.2.2. Η δοκιμασία NRU

Η δοκιμασία προσδιορισμού κυτταροτοξικότητας με τη χρήση του ουδέτερου ερυθρού (NR) βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να ενσωματώνουν και να δεσμεύουν ουδέτερο ερυθρό, μία έντονη χρωστική (κόκκινο του τολουολίου). Το ουδέτερο ερυθρό (NR) είναι μια ασθενής κατιονική χρωστική, η οποία διαχέεται εύκολα μέσω της πλασματικής μεμβράνης του ζωντανού κυττάρου με μη-ιοντική διάχυση και συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά στα λυσοσώματα (**Εικ.20**). Οι τοξικές ουσίες είναι ικανές να προκαλέσουν αλλαγές στην κυτταρική επιφάνεια ή στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων, με αποτέλεσμα την πρόκληση λυσοσωμικής αστάθειας και άλλων δυσμενών αλλαγών,

οι οποίες σταδιακά γίνονται μη αναστρέψιμες. Έτσι, αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος, κάτι που μειώνει την ποσότητα του ουδέτερου ερυθρού στην κυτταρική καλλιέργεια. Κατά συνέπεια, η κυτταροτοξικότητα εκφράζεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των κυττάρων προς την μείωση πρόσληψης NR, παρέχοντας έτσι μια ολοκληρωμένη εικόνα τόσο της ακεραιότητας των κυττάρων όσο και της αναστολής της ανάπτυξής τους [92].

Αξιοσημείωτο είναι πως οι χημικές ουσίες, οι οποίες έχουν άμεση επίδραση στα λυσοσώματα (π.χ. θειικό χλώριο) είναι πιθανό να εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα μέσω της δοκιμασίας NRU. Ο προσδιορισμός της πρόσληψης ουδέτερου ερυθρού γίνεται μέσω εξωκυττάρωσής του και ακολουθεί φασματοφωτομετρική μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm [93].

Η δοκιμασία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως μία αξιόπιστη, με επαναληψιμότητα και ανέξοδη *in vitro* δοκιμασία για τον προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης [94]. Μέχρι σήμερα έχουν επικυρωθεί δύο *in vitro* δοκιμασίες που κάνουν χρήση του NRU: 1) η δοκιμασία με την χρήση των ινοβλαστών ποντικού (BALB/c) 3T3 και 2) η δοκιμασία με την χρήση των φυσιολογικών κερατινοκυττάρων ανθρώπου (NHK) [93].



**Εικ 20** Μικροσκοπική απεικόνιση κυττάρων μετά από χρώση με τη χρωστική NR

### **12.2.3. NRU- αντιμετώπιση προβλημάτων και προϋποθέσεις για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων**

Παρά την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της μεθόδου NRU, υπάρχει μια σειρά μειονεκτημάτων που πλέον έχει αντιμετωπιστεί σε μεγάλο βαθμό. Τα προβλήματα που συναντώνται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας είναι τα εξής:

1. Η επιτυχία των αποτελεσμάτων κατά την εφαρμογή της τεχνικής NRU εξαρτάται από: 1) την επίτευξη ικανοποιητικής κυτταρικής ανάπτυξης, όπως επίσης και διαβαθμιζόμενης κυτταροτοξικότητας ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η τιμή IC50, 3) την απουσία NR κρυστάλλων και 4) την καλή προσαρμογή των δεδομένων συγκέντρωσης- απόκρισης στην καμπύλη Hill Function.

Κατά την έκθεσή τους στα εκάστοτε φάρμακα ή χημικά, τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι μετρήσεις ελέγχου OD 540 (control OD 540) πρέπει τυπικά να έχουν τιμή τουλάχιστον 0,3. Παρόλα αυτά χαμηλότερο control OD 540 μπορεί να δικαιολογηθεί πειραματικά, όταν τα κύτταρα είναι υγιή και η απάντηση στο SLS<sup>1</sup> (Sodium Lauryl Sulfate) είναι επαρκής. Εάν δεν συναντάται καμία από τις παραπάνω προϋποθέσεις, τότε πιθανότατα είναι είτε αποτέλεσμα μόλυνσης από μυκόπλασμα ή κάποιο άλλον βακτήριο ή μύκητα, ή κυτταρικής ανάπτυξης σε μη ιδανικές συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία, CO<sub>2</sub>), ή παρουσίας κάποιου ανεπιθύμητου συστατικού στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (π.χ. ο ορός για τα 3T3 κύτταρα, οι αυξητικοί παράγοντες για τα NHK κύτταρα). Ενώ για τα 3T3 κύτταρα η επίτευξη του 100% της

**<sup>1</sup>SLS & SLES (Sodium Lauryl Sulfate, Sodium Laureth Sulfate):** Συνθετικός αφριστικός παράγοντας που βρίσκουμε σε απορρυπαντικά, καθαριστικά πατωμάτων, οδοντόκρεμες, σαμπουάν, αφρόλουτρα. Τα SLS και SLES μπορούνε εύκολα να διεισδύσουν στο δέρμα και να προκαλέσουν εξανθήματα και άφθες στο στόμα και ερεθισμούς στα μάτια. Τέλος μπορούν να δημιουργήσουν μολύνσεις στο ουροποιητικό σύστημα και προβλήματα γονιμότητας. Οι πράσινες οργανώσεις υποστηρίζουν ότι μπορεί να προκαλέσει καρκίνο του δέρματος, καταρράκτη και σοβαρά προβλήματα όρασης. Χρησιμοποιείται ακόμα γιατί έχει χαμηλό κόστος.

συγκέντρωσης (confluence) είναι ιδανική στο τέλος της περιόδου έκθεσης, δεν συμβαίνει το ίδιο και για τα NHK κύτταρα. Σε αυτά η ύπαρξη μεγάλων συγκεντρώσεων κυττάρων έχει σαν συνέπεια την συσσώρευση αυξητικών παραγόντων εκκρινόμενων από τα κύτταρα και την αναστολή της διαδικασίας της διαφοροποίησης.

2. Η διαλυτότητα αποτελεί συχνά περιοριστικό παράγοντα στην επίτευξη ικανοποιητικής κυτταροτοξικότητας για τον υπολογισμό της τιμής IC50, ειδικά όταν η υπό εξέταση ουσία είναι σχετικά μη τοξική. Μια αδιάλυτη ουσία μπορεί να δημιουργήσει είτε ίζημα ή ενός είδους «ταινία» (διφασικό διάλυμα) στο αποθεματικό μας διάλυμα (stock) ή ακόμα και στα φρεάτια των τρυβλίων όπου πραγματοποιείται η κυτταρική ανάπτυξη. Διαλύτες εκτός των αναγραφόμενων στο πειραματικό πρωτόκολλο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο αν δεν παράγουν κυτταροτοξικότητα στην συγκέντρωση που χρησιμοποιούνται. Επιπρόσθετες διαδικασίες όπως ανάδευση ή θέρμανση μπορούν επίσης να αυξήσουν την διαλυτότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η ιδιότητα των δοκιμαζόμενων πτητικών ουσιών να «αερομεταφέρονται» από πηγάδι σε πηγάδι στο πολυτρυβλίο και έτσι να μην εμφανίζουν την προβλεπόμενη κυτταροτοξικότητα. Για παράδειγμα, μια μείωση στη βιωσιμότητα του καθοδηγητικού control (VC)<sup>2</sup>, όταν αυτό βρίσκεται δίπλα στο φρεάτιο με την υψηλότερη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας υποδηλώνει μια πιθανή εξάτμιση και εναπόθεση της ουσίας στο VC φρεάτιο. Η αποφυγή του παραπάνω φαινομένου για ορισμένες πτητικές ουσίες μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση στεγανοποιημένων πλαστικών φιλμ, τα οποία ελαχιστοποιούν την ύπαρξη ατμών και την αερομεταφορά τους σε γειτονικά φρεάτια.
3. Αδιάλυτες ή ασταθείς σε υδάτινα περιβάλλοντα ουσίες δεν μπορούν να ελεγχθούν με τη δοκιμασία τοξικότητας NRU. Πτητικές ουσίες μπορούν να δώσουν αποδεκτά αποτελέσματα μόνο

<sup>2</sup>**Vehicle Control (VC):** το καθοδηγητικό φρεάτιο ελέγχου VC, περιέχει μόνο κυτταρικό καλλιεργητικό μέσο, όταν οι δοκιμαζόμενες ουσίες είναι διαλυμένες σε καλλιεργητικό μέσο. Για δοκιμαζόμενες ουσίες που διαλύονται σε DMSO ή EtOH, το VC περιέχει καλλιεργητικό μέσο μέσα στο οποίο υπάρχει η ίδια ποσότητα του διαλύτη (συνήθως 0.5% [v/v]), όπως εφαρμόζεται στο τρυβλίο- 96- φρεατίων.

εάν χρησιμοποιηθούν τα πλαστικά, διαπερατά στο CO<sub>2</sub> φιλμ, ώστε να σφραγιστούν τα φρεάτια του πολυτρυβλίου. Οι δοκιμασίες τοξικότητας για διαβρωτικές ουσίες είναι περιττές, εφόσον δεν αποτελεί κανονιστικό προαπαιτούμενο η δοκιμή γνωστών διαβρωτικών για οξεία από του στόματος τοξικότητα.

Η δοκιμασία 3T3 NRU μπορεί να υποεκτιμήσει την τοξικότητα των ουσιών που δεσμεύονται εκλεκτικά στις πρωτεΐνες του ορού, αφού στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας περιέχεται ορός 5%. Από την άλλη, μπορεί να υπερεκτιμηθεί η τοξικότητα ουσιών που επηρεάζουν τη λειτουργία των λυσοσωμάτων, και πιθανόν έτσι να αυξήσουν τη δέσμευση της χρωστικής NR από τα παραπάνω οργανίδια και άρα να παρατηρηθεί ενδοκυττάρια αύξησή της. Το ουδέτερο κόκκινο NR, όπως επίσης και άλλες χρωστικές που απορροφούν στο εύρος οπτικής απορρόφησης της NRU, είναι δυνατόν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της μέτρησης της απορρόφησης, εφόσον παραμένουν σε μετρήσιμες ποσότητες εντός του κυττάρου μετά την πλύση και ταυτόχρονα είναι διαλυτές στο σταθεροποιητή εκρόφησης NR (NR desorbing fixative).

4. Οι NR κρύσταλλοι που σχηματίζονται ενδοκυττάρια μετά το πέρας της 2<sup>ης</sup> ώρας, ως επί τω πλείστων, από τη χορήγηση της χρωστικής επηρεάζουν τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης OD540. Οι τιμές στα κενά από θρεπτικό μέσο φρεάτια (blank) μπορεί να αυξηθούν από 0,05 έως και 0,10. Η προετοιμασία και η συντήρηση του διαλύματος της NR χρωστικής παίζει καθοριστικό ρόλο στην ελαχιστοποίηση του σχηματισμού κρυστάλλων. Ως εκ τούτου, το διάλυμα της NR χρωστικής πρέπει να είναι φρέσκο, να έχει διηθηθεί και να διατηρείται στους 37° C πριν από τη χορήγησή του στα κύτταρα.
5. Ο υπολογισμός της τιμής IC50 μιας ουσίας εξαρτάται από την προσαρμογή των δεδομένων συγκέντρωσης- απόκρισης στην καμπύλη Hill Function. Τοξικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να επιδρούν σε μια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου, μπορεί να δίνουν τιμές που να κυμαίνονται γύρω από το 50% της βιωσιμότητας ανεξαρτήτως των αυξανόμενων συγκεντρώσεων/ δόσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η δοκιμή πρέπει να επικεντρωθεί στις χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας, όπου συναντάται μείωση της επιβίωσης κατά 50%. Σε τιμές συγκέντρωσης- απόκρισης όπου η επί τοις εκατό κυτταρική επιβίωση δημιουργεί πλατό με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας, τείνουν να μην

προσαρμόζονται στην καμπύλη Hill Function ( $R^2 < 0.9$ ). Η προσαρμοστικότητα των δεδομένων στην καμπύλη μπορεί, ωστόσο, να βελτιωθεί, εάν επιτραπεί στην Hill Function να προσαρμόσει την παράμετρο “Bottom”. Βέβαια με αυτόν τον τρόπο η τιμή EC50 της πρότυπης καμπύλης δεν θα ισοδυναμεί με την τιμή της συγκέντρωσης η οποία μειώνει την βιωσιμότητα κατά 50%. Η εξίσωση της καμπύλης Hill Function θα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί για τον υπολογισμό της τιμής IC50 ως εξής: όπου η τιμή IC50 είναι η συγκέντρωση που παράγει 50% κυτταροτοξικότητα, η τιμή EC50 θα είναι αντίστοιχα η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο μέσο της κορυφαίας (top) και της χαμηλότερης (bottom) απόκρισης (η κορυφαία απόκριση αποτελεί το μέγιστο ποσοστό επιβίωσης, ενώ η χαμηλότερη αποτελεί το ελάχιστο ποσοστό επιβίωσης) [95].

#### ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

Εάν  $Y = 50$  (δηλαδή το 50% της απόκρισης) και ο παράγοντας Hill Slope περιγράφει την κλίση της απόκρισης, τότε ο άγνωστος  $X$  της τυπικής εξίσωσης Hill Function αντικαθίσταται στην επαναπροσδιορισμένη εξίσωση της καμπύλης Hill Function, από την τιμή IC50.

$$\log IC_{50} = \log EC_{50} - \frac{\log\left(\frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{Y - \text{Bottom}} - 1\right)}{\text{HillSlope}}$$

6. Η πρόβλεψη των από του στόματος αρουραίων LD50 τιμών και ο προσδιορισμός των αρχικών δόσεων οξείας από του στόματος τοξικότητας μέσω της δοκιμής NRU αναμένεται να είναι κακή για ουσίες, οι οποίες δεν ενεργοποιούν τους μηχανισμούς τοξικότητας στις κυτταρικές σειρές 3T3 και NHK. Τέτοιου είδους μηχανισμοί τοξικότητας περιλαμβάνουν ειδικούς υποδοχείς που δρουν μέσω του ΚΝΣ ή της καρδιάς (ICCVAM 2006a).
7. Η *in vitro* δοκιμή NRU μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα ουσιών στο βαθμό που αυτές



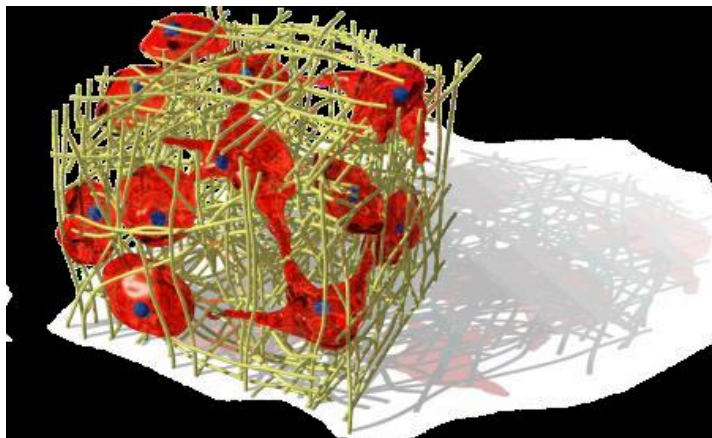
A. είναι διαλυτές στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας ή σε ένα μη τοξικό διαλύτη (στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται) και

B. δεν επιδρούν με το καλλιεργητικό μέσο. Επιπλέον, η τοξικότητα ουσιών που δρουν με μηχανισμούς, οι οποίοι δεν ενεργοποιούνται στις κυτταρικές σειρές 3T3 και NHK (π.χ. νευροτοξικές ή καρδιοτοξικές ουσίες) πιθανά να υποεκτιμηθεί με τη συγκεκριμένη δοκιμασία τοξικότητας. Συνεπώς, τα αποτελέσματα μέσω της μέτρησης της βασικής κυτταροτοξικότητας αυτών των ουσιών δεν είναι ικανά να συσχετισθούν με την πρόβλεψη αντίστοιχων *in vivo* αποτελεσμάτων.

Είναι αναγκαίο, λοιπόν, οι ερευνητές να αναπτύξουν στο μέλλον καταλληλότερες κυτταρικές σειρές, για τη χρήση τους σε μετρήσεις κυτταροτοξικότητας.

Δύο ακόμη αξιόπιστες μέθοδοι για δοκιμασίες *in vitro* τοξικότητας, που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι οι παρακάτω:

#### 12.2.4. Κυτταρικές καλλιέργειες δύο (2D) και τριών διαστάσεων (3D) στην τοξικολογία



*Εικ 21 Αναπαράσταση την δομής των μικροϊνών από τις οποίες κατασκευάζονται τα ικρίωματα (scaffolds) που χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες τριών διαστάσεων (3D)*

Οι *in vitro* δοκιμασίες τοξικότητας έχουν εξελιχθεί από το στάδιο της μελέτης κυττάρων σε καλλιέργεια, στην μελέτη με την χρήση κατασκευών που προσομοιάζουν τους ιστούς, σε μία προσπάθεια να προσομοιαστεί το πραγματικό *in vivo* περιβάλλον. Τα κύτταρα είναι είτε πρωτογενή ή μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές ή βλαστικά κύτταρα. Συνήθως καλλιεργούνται σε τρυβλία μονής στοιβάδας (δύο διαστάσεις-2D) (**Εικ. 21**). Ο τρόπος αυτός όμως αντιπροσωπεύει ένα απλοποιημένο και τεχνητό μοντέλο της πραγματικής κατάστασης *in vivo*.

Για τον λόγο αυτό, η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εντός τρισδιάστατων (3D) δομών γίνεται όλο και πιο δημοφιλής[96]. Η τρίτη διάσταση μπορεί να επιτευχθεί με την ανάπτυξη των κυττάρων σε εναιωρήματα των καλλιεργητικών μέσων, σε τεχνητά υποστρώματα (π.χ. ικρίσματα-scaffolds), ή σε συνθήκες πλέγματος (matrix) (π.χ., άγαρ και πηκτώματα). Μελέτες που συγκρίνουν την απόδοση μεταξύ καλλιεργειών 3D και καλλιεργειών 2D έχουν δείξει μεγάλη υπεροχή των 3D καλλιεργειών [97] τόσο σε επίπεδο συμπεριφοράς των κυττάρων όσο και στο επίπεδο της διακυτταρικής επικοινωνίας, της μεταγωγής σήματος, και της γονιδιακής έκφρασης [98,99].

Για παράδειγμα, ορισμένες 3D καλλιέργειες πρωτογενών ηπατικών κυττάρων έδειξαν αυξημένη λειτουργικότητα σε σχέση με τις καλλιέργειες δύο διαστάσεων αλλά και παρατεταμένο χρόνο επιβίωσης έως και αρκετές εβδομάδες [100, 101]. Λόγω του ότι τα 3D μοντέλα αναπαράγουν και διατηρούν ορισμένες ειδικές λειτουργίες των οργάνων και των ιστών, έχει αυξηθεί κατά τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για την εφαρμογή τους ειδικά για τις δοκιμές τοξικότητας [99].

Ωστόσο, η τρίτη διάσταση φέρνει επίσης και μια σειρά από νέες προκλήσεις στον τομέα της κυτταρικής καλλιέργειας. Τα πολλαπλά στρώματα κυττάρων εγείρουν ανησυχίες σχετικά με την επαρκή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στον πυρήνα των κυτταρικών καλλιεργειών. Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέκρωση των κυττάρων στο κέντρο της καλλιέργειας[102].

Ως εκ τούτου, τα κυτταρικά μοντέλα που θα χρησιμοποιηθούν στο μέλλον, θα πρέπει να είναι επαρκώς χαρακτηρισμένα και να μπορούν να διατηρούν, στον καλύτερο βαθμό, σταθερές συνθήκες καλλιέργειας. Παρά το γεγονός ότι τα 3D μοντέλα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο, η

πλειοψηφία των εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών τοξικότητας εξακολουθούν να εφαρμόζονται σε καλλιέργειες με τρυβλία πολλαπλών φρεατίων μονής στοιβάδας (2D). Έτσι, για να αξιοποιηθεί πλήρως η τρίτη διάσταση κατά την κυτταρική καλλιέργεια, πρέπει να αναπτυχθούν πιο κατάλληλα τελικά σημεία (κατώφλια) π.χ. οι βιοχημικές δοκιμασίες ή απεικονιστικές τεχνολογίες.

#### 12.2.5. Η χρώση διπλού φθορισμού με φαλλοϊδίνη (Phalloidin) και DAPI, ως μέθοδος μέτρησης κυτταροτοξικότητας

Η φαλλοϊδίνη (Phalloidin) είναι μία τοξίνη-δίκυκλο πεπτίδιο που εκκρίνεται από τα θανατηφόραμανιτάρια *Amanita phalloides*. Η φαλλοϊδίνη δεσμεύεται ειδικά στα πολυμερή ακτίνης του κυτταρικού σκελετού. Η χαρακτηριστική ομάδα Alexa Fluor® που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στην φαλλοϊδίνη επιτρέπει την οπτικοποίηση του φθορισμού.

Το DAPI (4,6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη) είναι μία φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται ισχυρά με τις περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε αδενίνη (A) και θυμίνη (T). Συνεπώς, η χρωστική είναι ειδική για τις πυρηνικές περιοχές του κυττάρου, και σε μικρότερο βαθμό για την χρώση του μιτοχονδριακού DNA. αξίζει να σημειωθεί πως η οπτικοποίηση του πυρήνα του κυττάρου μέσω φθορισμού είναι δυνατή μόνο όταν το κύτταρο βρίσκεται στη φάση της μεσόφασης ή τα χρωμοσώματα στη φάση της μίτωσης. Επιπλέον, για να εισέλθει η χρωστική DAPI εντός του κυττάρου και να δεσμευθεί στο πυρηνικό DNA πρέπει τα κύτταρα να είναι διαπερατά και φιξαρισμένα. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι ο φθορισμός και κατ' επέκταση η οπτική απορρόφηση αυξάνει περίπου 20 φορές, όταν η χρωστική DAPI δεσμεύεται σε δίκλωνο μόριο DNA [104].

### 13. Σκοπός της μελέτης

*Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η κατοχύρωση των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton ως ένα πρότυπο σύστημα μελέτης της ηπατοτοξικότητας φαρμάκων και νέων χημικών ουσιών*

Πιο αναλυτικά, κατά τη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας:

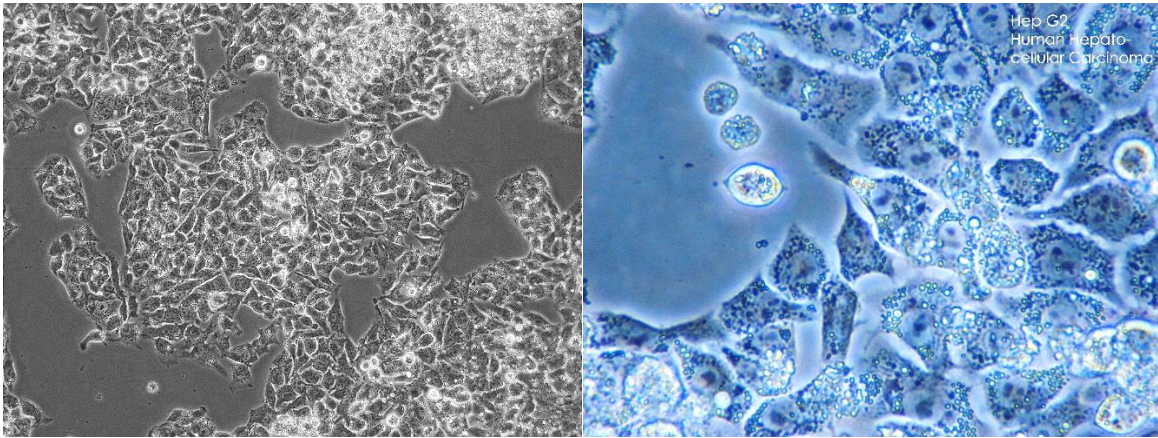
- ✓ Στοχεύσαμε στην περαιτέρω διερεύνηση της χρήσης των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων του ομφαλίου λώρου του ανθρώπου σε δοκιμασίες *in vitro* κυτταροτοξικότητας και πιο συγκεκριμένα, της ηπατοτοξικότητας. Προχωρήσαμε στην εξέταση παράλληλα και συγκριτικά των κυτταρικών σειρών των WJ-MSCs, των HepG2 και των ινοβλαστών ποντικού NIH3T3, με στόχο την επιβεβαίωση των επιπέδων της *in vitro* τοξικότητας 15 φαρμακευτικών ουσιών γενικευμένης και κυρίως ηπατικής τοξικότητας, όπως επίσης και στη σύγκριση των *in vivo* τιμές LD50, όπως προέκυψαν πειραματικά, με τις *in silico* τιμές LD50 της βάσης δεδομένων RC (RC database). Ο προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας έγινε μέσω των δοκιμασιών ενδοκυττάριας μετατροπής άλατος τετραζολίου (MTS assay) και συσσώρευσης ουδέτερου ερυθρού (NRU assay) σε τρυβλία πολλαπλών φρεάτιων,
- ✓ Επιχειρήσαμε την κατευθυνόμενη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε σωματικά κύτταρα με φαινότυπο ώριμου ηπατοκυττάρου στο εργαστήριο, τα οποία θα μπορούν δυνητικά να παρέχουν μια άμεσα διαθέσιμη πηγή μεταβολικά ικανών κυττάρων, συγκρίσιμης λειτουργικότητας με τα HPH κύτταρα. Σκοπός είναι τα παραπάνω κύτταρα να είναι ικανά για χρήση σε εφαρμογές φαρμακολογικής και τοξικολογικής ασφάλειας, κυρίως σε ότι αφορά την μελέτη πιθανών ηπατικών βλαβών.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν

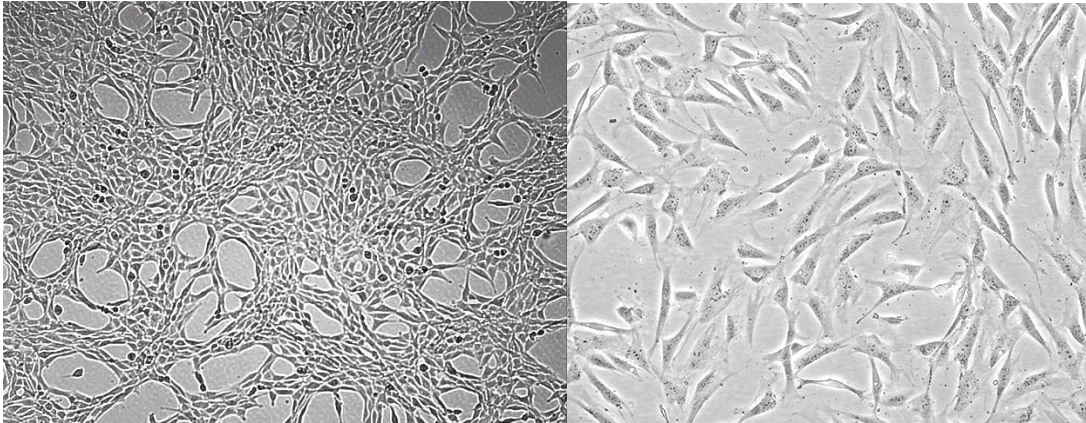
Για τις *in vitro* δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί τύποι κυττάρων:

- Η κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος *HepG2*, που υπήρχε σε απόθεμα κρυοφιαλιδίων στο εργαστήριο μας, κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο στους  $-200^{\circ}\text{C}$  (**Εικ.22**)



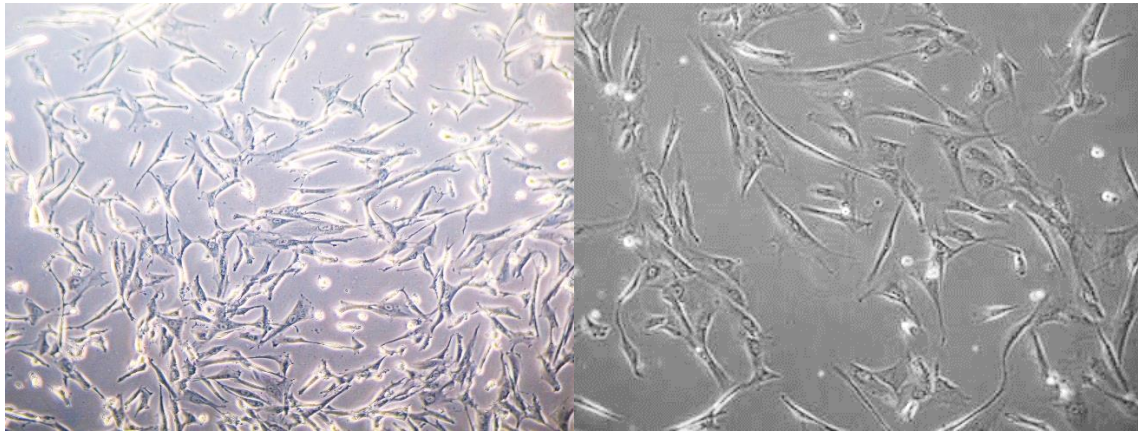
**Εικ 22** Τα κύτταρα *HepG2* κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους στο εργαστήριο, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο

- Η κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού *NIH 3T3*, που υπήρχε σε απόθεμα κρυοφιαλιδίων στο εργαστήριο μας, κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο στους  $-200^{\circ}\text{C}$  (**Εικ.23**).



**Εικ 23** Τα κύτταρα *NIH 3T3* κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους στο εργαστήριο, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο

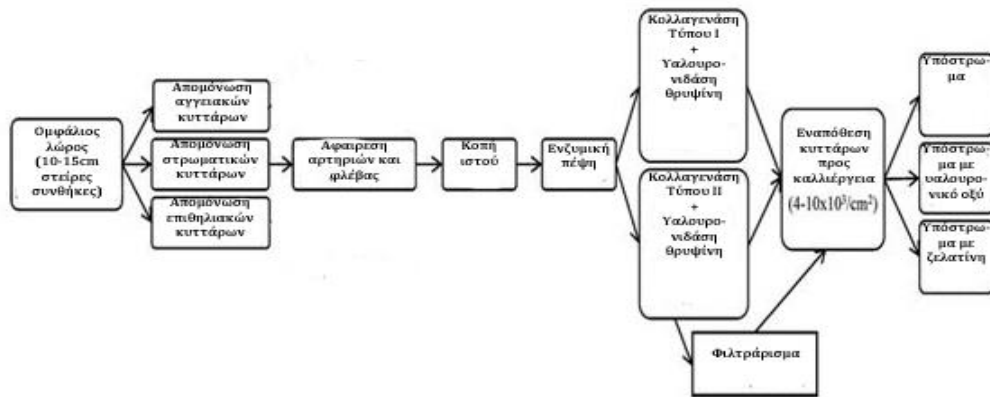
- Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ομφαλίου λώρου (γέλης του Wharton-WJ-hMSCs) ανθρώπου τα οποία μας παραχωρήθηκαν για ερευνητικούς σκοπούς από την εταιρία TAK-EIE (Τράπεζα Αρχηγόνων Κυττάρων- Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών), που δημιουργήθηκε σε μία συνεργασία του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του ΕΙΕ και της εταιρίας βιοτεχνολογίας Biohellenika S.A και υπήρχαν σε απόθεμα κρυοφιαλιδίων στο εργαστήριο μας, κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο στους  $-200^{\circ}\text{C}$  (**Εικ.24**).



**Εικ 24** Τα κύτταρα WJ-MSCs κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους στο εργαστήριο, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο



## 2. Απομόνωση και Χαρακτηρισμός των βλαστικών κυττάρων WJ-MSCs



*Εικ 25 Πρωτόκολλο απομόνωσης των WJ-MSCs. Στο παρόν σχεδιάγραμμα παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία απομόνωσης των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών του ομφαλίου λώρου, όπως αυτή περιγράφεται από διάφορα εργαστηριακά πρωτόκολλα.*

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του ομφαλίου λώρου (γέλης του Wharton-WJ-hMSCs) είχαν ήδη απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τους Christodoulou και τους συνεργάτες του [117], νωρίτερα στο εργαστήριο μας [118]. Στην μελέτη αυτή έγινε η απομόνωση των κυττάρων σύμφωνα με το ήδη εγκεκριμένο πρωτόκολλο των Seshareddy και των συνεργατών του [119] μετά από έγκριση της [78] επιτροπής βιοηθικής δεοντολογίας. Τα κύτταρα ελέχθησαν για την έκφραση των δεικτών επιφανείας βλαστικών κυττάρων και ήταν θετικά για τους δείκτες CD29, CD44, CD73, CD90 και CD105 ενώ ήταν αρνητικά για τους δείκτες CD14, CD34, και CD45. Παράλληλα, στην ίδια μελέτη, για τον χαρακτηρισμό των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σχηματισμού αποικιών (CFU-F-Colony formation assay) για τον έλεγχο της ικανότητας αυτο-ανανέωσης, αλλά και δοκιμές διαφοροποίησης προς κύτταρα οστού. Επίσης παρουσίασαν σταθερό φαινότυπο μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ενώ ο μέσος χρόνος διπλασιασμού ενός πληθυσμού προσδιορίστηκε κοντά στις 32 ώρες [117].



*Εικ. 26 Δείγμα ομφαλίου λώρου (UC)*

### 2.1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση και την επεξεργασία των WJ-MSCs

1. Στείρο (μικροφιλτράρισμα μέσω φίλτρου 0,2μm) ενζυμικό διάλυμα 0,16% (w/w) κολλαγενάσης/ 0.04% (w/w) υαλουρονιδάσης σε PBS 1x
2. 1x ενζυμικό διάλυμα θρυψίνης 0.25% (w/w) σε HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
3. Φυσιολογικός ορός 0.9% NaCl σε WFI (water for injection)
4. Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x.
5. Διάλυμα Trypan Blue 0.4%
6. Μέσο κρυοσυντήρησης I: 20% (w/v) αλβουμίνη ορού ανθρώπου/ 10% (w/v) CPD (citrate phosphate dextrose) σε Hesteril. Διατηρείται στους -20°C.
7. Μέσο κρυοσυντήρησης II: 20% (w/v) αλβουμίνη ορού ανθρώπου/ 10% (w/v) CPD (citrate phosphate dextrose)/20% DMSO (κ.ο.) σε Hesteril. Διατηρείται στους 4°C.

\*DMSO: Dimethylsulfoxide – διμέθυλο σουλφοξείδιο - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO.

\*Hesteril: Hydroxyethylamidon – υδροξυαιθυλαμίδιο

\*Hank's Balanced Salt Solution:

Potassium Phosphate (Φωσφορικό) 0.44 mM

Κάλιο)	
Potassium Chloride (Χλωριούχο Κάλιο)	5.37 mM
Sodium Phosphate, Dibasic (Φωσφορικό Νάτριο, διβασικό)	0.34 mM
Sodium Chloride (Χλωριούχο Νάτριο)	136.89 mM
D-Glucose (D- γλυκόζη)	5.55 mM

## 2.2. Απομόνωση και επεξεργασία των βλαστικών μεσεγχοματικών κυττάρων της γέλης του Wharton (WJ-MSCs) από ομφάλιο λώρο

*Σημείωση: Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες (μέσα σε θάλαμο κάθαρσης νηματικής ροής)*

1. Διαμοιρασμός 30ml ενζυμικού διαλύματος σε δύο σωληνάρια falcon των 50mL (από 15ml)
2. Προσθήκη από 15ml φυσιολογικού ορού σε 2 ακόμα σωληνάρια falcon
3. Τοποθέτηση του ομφαλίου λώρου σε τρυβλίο διαμέτρου 150mm και μέτρηση του μήκους του
4. Ξέπλυμα του ιστού με φαρμακευτικό, αντισηπτικό διάλυμα Betadine και στη συνέχεια με φυσιολογικό ορό, ώστε να καθαριστεί καλά από το αίμα
5. Κόψιμο και απόρριψη των άκρων του ομφαλίου λώρου και τεμαχισμός του υπόλοιπου ιστού σε δύο ίσα κομμάτια. Τοποθέτησή τους στα δυο falcon που περιέχουν φυσιολογικό ορό
6. Απομάκρυνση και απόρριψη της φλέβας και των δυο αρτηριών που διατρέχουν το μήκος του ιστού. Το εναπομείναν, ζελατινώδες μέρος του ιστού (γέλη του Wharton) κόβεται σε πολύ μικρά κομμάτια με νυστέρι και τοποθετείται στα 2 falcons με το ενζυμικό διάλυμα. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37° C με ανάδευση σε orbital shaker.
7. Με το πέρας του χρόνου επώασης, πραγματοποιείται προσθήκη 5ml θρυψίνης στα δύο falcons, οπότε και συνεχίζεται η επώαση για άλλα 30min (συνολική επώαση 2,5 ώρες) .
8. Στο μεσοδιάστημα, πραγματοποιείται προσθήκη 45ml PBS σε κάθε ένα από δύο falcons.
9. Φιλτράρισμα του ενζυμικά κατεργασμένου ιστού με αργό πιπετάρισμα πάνω σε φίλτρο διαχωρισμού 100μm, το οποίο τοποθετείται στο χείλος δύο νέων σωληναρίων falcon των 50ml.
10. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δύο σωληναρίων στα 500g για 15min στους 37° C.

11. Απόψυξη του μέσου κρουοσυντήρησης I και ταυτόχρονη τοποθέτηση 2ml μέσου κρουοσυντήρησης II στους 4°C σε παγωμένο τζελάκι.
12. Απόρριψη του υπερκειμένου και από τα δυο σωληνάκια. Αναδιάλυση του ενός ιζήματος με πιπέτα των 1000μl στο μέσο κρουοσυντήρησης I, μάζεμά του και αναδιάλυση του δεύτερου ιζήματος. Ξέπλυμα του πρώτου σωληναρίου με 1ml μέσου κρουοσυντήρησης I, μεταφορά του 1ml του μείγματος μέσου- υπολειμμάτων κυττάρων του πρώτου στο δεύτερο σωληνάριο, όπου βρίσκονται τα κύτταρα (συνολικός περιεχόμενος όγκος = 2ml).
13. Μεταφορά από το falcon με τα 2ml διαλύματος κυττάρων 10μl διαλύματος σε ένα φιαλίδιο Eppendorf, το οποίο περιέχει 10μl (ίσο όγκο) χρωστικής trypan blue.
14. Μεταφορά 10μl του διαλύματος κυττάρων σε κάθε πλευρά του αιμοκυτομέτρου (πλάκα Neubauer) και μέτρηση των ζωντανών (λευκών) κυττάρων στο μικροσκόπιο με αντικειμενικό φακό 10x.

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων (N) προσδιορίζεται βάσει του τύπου:

$$N = n * V * d * 10^4$$

όπου,

n = ο αριθμός των μετρηθέντων κυττάρων στο αιμοκυτόμετρο

V = ο όγκος δ/τος (ml) από το οποίο λήφθηκε το δείγμα για μέτρηση

d = ο συντελεστής αραίωσης με trypan blue

15. Στη συνέχεια, προσθήκη σταγόνα-σταγόνα ίσης ποσότητας με τον όγκο του παραπάνω διαλύματος, του μέσου κρουοσυντήρησης II (εν τοιαύτη περίπτωση 2ml) και 40μl του διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Pen/ Strep 1%) στο falcon με τα κύτταρα. Αναμιγνύουμε με ορολογική πιπέτα των 5ml και μοιράζουμε σε δύο κρουοφιαλίδια (2ml+2ml).
16. Τέλος, τοποθέτηση των κρουοφιαλιδίων στους -80°C σε δοχείο ελεγχόμενης ψύξης για 24 ώρες πριν τη μεταφορά τους σε υγρό άζωτο.

### 3. Προετοιμασία υλικών καλλιέργειας

### 3.1. DMEM

Σε αποστειρωμένο δοχείο προστίθενται 50ml FBS, 5ml Pen-Str και συμπληρώνεται μέχρι τα 500ml με DMEM. Το DMEM περιέχει γλουταμίνη και γλυκόζη, επομένως δε χρειάζεται να προστεθούν ανεξάρτητα.

Στην έξω πλευρά του δοχείου σημειώνεται 1 x DMEM + 1% Pen-Str + 10% FBS, η ημερομηνία. Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

### 3.2. DMEM/F12

Σε αποστειρωμένο δοχείο προστίθενται 50ml FBS, 5ml Pen-Str, 5ml HEPES, 7,5ml NEAA, 2ml Fungizone και συμπληρώνεται μέχρι τα 500ml με DMEM. Το DMEM περιέχει γλουταμίνη και γλυκόζη, επομένως δε χρειάζεται να προστεθούν ανεξάρτητα.

Στην έξω πλευρά του δοχείου σημειώνεται 1 x DMEM/F12 + 1% Pen-Str + 10% FBS + 1% HEPES + 1,5 % NEAA + 2ml Fungizone και η ημερομηνία.

Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

### 3.3. DMEM/Ham's F12

Σε αποστειρωμένο δοχείο προστίθενται 50ml FBS, 5ml Pen-Str, 5ml HEPES, 7,5ml NEAA, 2ml Fungizone και συμπληρώνεται μέχρι τα 500ml με DMEM. Το DMEM/Ham'sF12 δεν περιέχει γλουταμίνη, επομένως είναι αναγκαία η προσθήκη 1% γλουταμίνης.

Στην έξω πλευρά του δοχείου σημειώνεται 1 x DMEM/Ham's F12 + 1% Pen-Str + 10% FBS + 1% HEPES + 1,5 % NEAA + 2ml Fungizone + 1% L-Glutamine και η ημερομηνία.

Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

### 3.4. PBS

Σε ένα αποστειρωμένο δοχείο προστίθενται 50ml PBS 10X και συμπληρώνεται μέχρι τα 500ml με dH<sub>2</sub>O.

Στην έξω πλευρά του δοχείου σημειώνεται 1X PBS και η ημερομηνία. Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Η σύσταση του PBS (phosphate buffered saline) φαίνεται στον επόμενο πίνακα:

άλας	συγκέντρωση (mmol/L)	συγκέντρωση (g/L)
NaCl	137	8.01
KCl	2.7	0.20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	10	1.78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0	0.27
pH	7.4	7.4

### 3.5. Θρυψίνη

Για τις κυτταρικές σειρές WJ-MSCs και HepG2: Σε ένα σωληνάριο falcon προστίθενται 5ml Θρυψίνη (Trypsin- EDTA 10X της Biosera) και συμπληρώνεται μέχρι τα 50ml με PBS 1X.

Στην έξω πλευρά του falcon σημειώνεται 1X Trypsin και η ημερομηνία. Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Για την κυτταρική σειρά NIH 3T3: Σε ένα σωληνάριο falcon προστίθενται 1.5ml- 2.5ml θρυψίνη (Trypsin- EDTA 10X της Biosera), για τη δημιουργία διαλύματος θρυψίνης 0.25X- 0.5X αντίστοιχα, και συμπληρώνεται μέχρι τα 50ml με PBS 1X.

Στην έξω πλευρά του falcon σημειώνεται 0.25X ή 0.5X Trypsin και ηημερομηνία. Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

### 3.6. Υγρό κατάψυξης κυττάρων

Για την κυτταρική σειρά WJ-MSCs: Σε ένα σωληνάριο falcon προστίθενται FBS και DMSO σε αναλογία 9:1, σε τελικό όγκο 10ml. Στην έξω πλευρά του falcon σημειώνεται «ΥΚ για WJ-MSCs». Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στην κατάψυξη.

Για τις κυτταρικές σειρές NIH 3T3 και HepG2: Σε ένα σωληνάριο falcon προστίθενται FBS, DMEM και DMSO σε αναλογία 5:4:1, σε τελικό όγκο 10ml. Στην έξω πλευρά του falcon σημειώνεται «ΥΚ για NIH 3T3/ HepG2». Το καπάκι κλείνει και προστίθεται εξωτερικά με parafilm. Αποθηκεύεται στην κατάψυξη.

## 4. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

### 4.1. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών NIH 3T3 και HepG2

Για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών NIH 3T3 και HepG2 οι οποίες μελετήθηκαν, χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) που περιέχει:

- 10% ορό (FBS, fetus bovine serum) και
- 1% αντιβιοτικά ευρέως φάσματος (Pen-Str, πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη)

#### 4.2. Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων

Για την καλλιέργεια των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ομφαλίου λώρου (από την γέλη του Wharton-WJ-hMSCs), τα οποία μελετήθηκαν, χρησιμοποιείται:

- Θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12) που περιέχει:
  - 10% ορό (FBS, fetus bovine serum)
  - 1% αντιβιοτικά ευρέως φάσματος (Pen-Str, πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη)
  - 5ml μη απαραίτητα αμινοξέα (Non-Essential Amino Acid -NEAA)
  - 7,5ml HEPES (για την διατήρηση του pH)
  - 2ml Fungizone® (αντιμυκητιασικό σκεύασμα αμφοτερικίνης B)

Εναλλακτικά χρησιμοποιείται

- Θρεπτικό υλικό DMEM/Ham's F-12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture Ham's F-12), w/o L-Glutamine, που περιέχει:
  - 10% ορό (FBS, fetus bovine serum)
  - 1% αντιβιοτικά ευρέως φάσματος (Pen-Str, πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη)
  - 5ml μη απαραίτητα αμινοξέα (Non-Essential Amino Acid -NEAA)
  - 7,5 ml HEPES (για την διατήρηση του pH) και
  - 2ml Fungizone® (αντιμυκητιασικό σκεύασμα αμφοτερικίνης B)
  - 1% L-Glutamine

#### 4.3. Καλλιέργεια κυττάρων σε φλάσκα (ή τρυβλίο Petri)

1. Αφαίρεση των κρυοφιαλιδίων (αμπούλες) που περιέχουν τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν από το υγρό άζωτο (-200° C)
2. Τοποθέτηση των κρυοφιαλιδίων σε στατό και τοποθέτησή του μέσα στο υδατόλουτρο στους 37° C μέχρι να ξεπαγώσουν οι αμπούλες.



3. Καθαρισμός του απαγωγού με χαρτί εμποτισμένο με εργαστηριακή αιθανόλη. Προηγουμένως, έχει για περίπου 1 ώρα η λάμπα υπεριώδους ώστε να αποστειρωθεί ο χώρος και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα κάποιας μόλυνσης.
4. Προετοιμασία μιας φλάσκας (ή ενός τρυβλίου) για κάθε κυτταρική σειρά: αναγραφή του ονόματος της κυτταρικής σειράς και της ημερομηνίας.
5. Προσθήκη 15ml θρεπτικού υλικού σε κάθε φλάσκα (αν πρόκειται για φλάσκα των 75ml) ή 5-8ml θρεπτικού υλικού (αν πρόκειται για φλάσκα των 25ml). Για καλλιέργεια σε τρυβλία των 60mm προστίθεται περίπου 7-10ml θρεπτικού υλικού.
6. Ανάδευση και μεταφορά του περιεχομένου κάθε αμπούλας με πιπέτα τύπου Gilson στη φλάσκα ή το τρυβλίο.
7. Μεταφορά των κυττάρων σε επωαστικό θάλαμο των 37° C και 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.4. Αλλαγή θρεπτικού υλικού

1. Εξαγωγή από τον επωαστικό θάλαμο της φλάσκας/τρυβλίου με τα κύτταρα στα οποία θα γίνει αλλαγή θρεπτικού υλικού.
2. Μηχανική αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού (μέσω αρνητικής πίεσης) με μία πιπέτα Pasteur, από τη φλάσκα (ή το τρυβλίο).
3. Προσθήκη 10ml PBS (Phosphate buffered saline) για το ξέπλυμα των κυττάρων (όταν βρίσκονται σε φλάσκα) ή 4-5ml PBS (όταν βρίσκονται σε τρυβλίο).
4. Αναρρόφηση του PBS και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού.

#### 4.5. Θρυψινοποίηση κυττάρων

1. Αναρρόφηση με μια πιπέτα Pasteur του θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα.
2. Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS.
3. Προσθήκη 2-3ml θρυψίνης, ανάδευση της φλάσκας και τοποθέτησή της στον επωαστικό θάλαμο για 1-5' ώστε να δράσει η θρυψίνη. Η θρυψινοποίηση υποβοηθάται με ελαφρό χτύπημα στα τοιχώματα της φλάσκας.

4. Με την ολοκλήρωση της θρυψινοποίησης (ελέγχεται με παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο), γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού στη διπλάσια ποσότητα της θρυψίνης που προστέθηκε προηγουμένως. Το θρεπτικό υλικό έχει ορό (FBS) ο οποίος περιλαμβάνει αναστολέα της θρυψίνης και εμποδίζει την περαιτέρω δράση της. Διαφορετικά, η περαιτέρω δράση του ενζύμου της θρυψίνης θα επιφέρει κυτταρικό θάνατο.
5. Μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα universal και φυγοκέντρηση για 5' στις 1800rpm.
6. Αναρρόφηση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος [80] σε 1ml θρεπτικού υλικού. Στο σημείο αυτό μπορεί να διαχωριστεί αυτός ο κυτταρικός όγκος σε δύο νέες φλάσκες.

#### 4.6. Πάγωμα των κυττάρων

1. Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση όπως περιγράφηκε πιο πάνω.
2. Προετοιμασία υγρού κατάψυξης:
  - Για τις κυτταρικές σειρές HepG2 και NIH 3T3, το υγρό κατάψυξης αποτελείται από 50% FBS, 10% DMSO και 40% θρεπτικό υλικό (DMEM). Έτσι, για ένα aliquot του 1ml χρειάζονται 500μl FBS, 100μl DMSO και 400μl θρεπτικό υλικό.
  - Για τα βλαστικά κύτταρα WJ-hMSCs, το υγρό κατάψυξης αποτελείται από 90% FBS, και 10% DMSO. Έτσι, για ένα aliquot του 1ml χρειάζονται 900μl FBS και 100μl DMSO.
3. Προετοιμασία του κρυφιαλιδίου: αναγραφή του ονόματος της κυτταρικής σειράς και της ημερομηνίας.
4. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, τα κύτταρα αραιώνονται στο υγρό κατάψυξης και μεταφέρονται στο κρυοφιαλίδιο.
5. Τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε ειδικό δοχείο ψύξης κυττάρων που περιέχει παγωμένη ισοπροπανόλη και μεταφορά του σε ειδικό καταψύκτη ρυθμισμένο στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
6. Έπειτα από 2-3 ημέρες μεταφορά στο υγρό άζωτο ( $-200^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.7. Μονιμοποίηση κυττάρων

1. Ξέπλυμα των κυττάρων εντός των τρυβλίων με PBS.

2. Προσθήκη διαλύματος 4% PFA (paraformaldehyde σε 1 x PBS) σε όλα τα φρεάτια που περιέχουν κύτταρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η κυτταρική μονιμοποίηση (fixation), για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Ξέπλυμα των φρεατίων 2 φορές με παγωμένο PBS.
4. Διατήρηση του τρυβλίου στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , εφόσον καλυφθεί με αλουμινόχαρτο.

## 5. Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας

### 5.1. Δοκιμασία MTS

Η δοκιμασία MTS, αλάτων τετραζολίου, πραγματοποιείται με το αντιδραστήριο Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous Assay (Promega).

1. Αφού πραγματοποιηθεί θρυψινοποίηση, ακολουθεί επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία 96 φρεατίων με πυκνότητα επίστρωσης  $3,2-3,5 \times 10^3$  κύτταρα/100μl/φρεάτιο σε μέσο καλλιέργειας και τοποθέτηση στον επωαστικό θάλαμο.
2. Μετά από 48 ώρες επώασης ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), πραγματοποιείται επεξεργασία των κυττάρων με οκτώ διαφορετικές (διαβαθμισμένες) συγκεντρώσεις για κάθε μία από τις χημικές ουσίες δοκιμής, διαλυμένες σε 100μl μέσου καλλιέργειας.
3. Αραίωση όλων των χημικών ουσιών στο αντίστοιχο για την εκάστοτε κυτταρική σειρά, μέσο καλλιέργειας χωρίς οποιονδήποτε διαλύτη.
4. Επώαση του δείγματος αρνητικού ελέγχου με προσθήκη μόνο καλλιεργητικού μέσου.
5. Επώαση των κυττάρων ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) για 48 ακόμα ώρες.
6. Αφαίρεση των χημικών διαλυμάτων από όλα τα τρυβλία και ξέπλυμα των κυττάρων με 150 μl/φρεάτιο προθερμασμένου PBS.
7. Προσθήκη 100μl/φρεάτιο καλλιεργητικού μέσου, χωρίς ερυθρό φαινόλης, έτσι ώστε να μην επηρεαστεί η μέτρηση από το θρεπτικό μέσο.
8. Προσθήκη 20μl του αντιδραστηρίου Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent (Promega) ανά φρεάτιο.

9. Προσθήκη 150μl PBS στα κενά φρεάτια.
10. Επώαση των κυττάρων για συνολικά 3 ώρες, με διαδοχικές ωριαίες φωτομετρήσεις. Η ανίχνευση της απορρόφησης γίνεται στα 490nm (και στα 650nm παράλληλα για την απαλοιφή του θορύβου) σε μία συσκευή φωτομέτρησης (μονοχρωμάτορα) Monochromator Microplate Reader Safire 2 TECAN AUSTRIAG.M.B.H./ Measurement parameter Editor Magellan (version 6).

## 5.2. Δοκιμασία NRU

Η δοκιμασία NRU (Neutral Red Uptake), απορρόφησης ουδέτερου ερυθρού, διεξάγεται σύμφωνα με το πρότυπο πρωτόκολλο των Borenfreund και Puerner και των συνεργατών τους [87] σε συμφωνία με τις τροποποιήσεις του φορέα ICCVAM.

1. Αφού πραγματοποιηθεί θρυψινοποίηση, ακολουθεί επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία 96 φρεατίων με πυκνότητα επίστρωσης  $3,2-3,5 \times 10^3$  κύτταρα/100μl/φρεάτιο σε μέσο καλλιέργειας και τοποθέτησή τους στον επωαστικό θάλαμο.
2. Μετά από 48 ώρες επώασης (37° C, 5% CO<sub>2</sub>), πραγματοποιείται επεξεργασία των κυττάρων με οκτώ διαφορετικές (διαβαθμισμένες) συγκεντρώσεις για κάθε μία από τις χημικές ουσίες δοκιμής, διαλυμένες σε 100μl μέσου καλλιέργειας.
3. Αραίωση όλων των χημικών ουσιών στο αντίστοιχο για την εκάστοτε κυτταρική σειρά, μέσο καλλιέργειας χωρίς οποιονδήποτε διαλύτη.
4. Επώαση του δείγματος αρνητικού ελέγχου με προσθήκη μόνο καλλιεργητικού μέσου.
5. Επώαση των κυττάρων (37° C, 5% CO<sub>2</sub>) για 48 ακόμα ώρες.
6. Αφαίρεση των χημικών διαλυμάτων από όλα τα τρυβλία και ξέπλυμα των κυττάρων με 150 μl/φρεάτιο προθερμασμένου PBS.
7. Προετοιμασία του διαλύματος NR (NR Stock Solution):
  - Δημιουργία διαλύματος 0,4g χρωστικής NR σε 100ml milliQ H<sub>2</sub>O (διάλυμα NR Stock Solution).
  - Ακολουθεί αραίωση 1ml διαλύματος NR Stock Solution σε 79ml καλλιεργητικού μέσου, ώστε να σχηματιστεί το διάλυμα NR-θρεπτικού υλικού.

8. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 250μl/ φρεάτιο διαλύματος NR-θρεπτικού υλικού.
9. Επώαση (37° C / 5% CO<sub>2</sub>) για 3 ακόμα ώρες.
10. Τακτική παρατήρηση των κυττάρων κατά την διάρκεια της επώασης, κυρίως μεταξύ των 2 και 3 ωρών, προκειμένου να ελεγχθεί ο σχηματισμός κρυστάλλων NR.
11. Μετά την περίοδο επώασης, ακολουθεί αφαίρεση του διαλύματος NR-θρεπτικού υλικού από όλες τις πλάκες και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με 250μl/ φρεάτιο προθερμασμένου PBS.
12. Απομάκρυνση του PBS και προσθήκη, για την απελευθέρωση της χρωστικής, 100μl/ φρεάτιο σταθεροποιητή εκρόφησης (NR desorbing fixative) με σύσταση 1% οξικό οξύ, 50% αιθανόλη και 49% H<sub>2</sub>O.
13. Ανακίνηση των τρυβλίων για 20-40 λεπτά, για την διαμόρφωση ενός ομοιογενούς διαλύματος.
14. Ανίχνευση της απορρόφησης στα 540nm(και στα 650nm παράλληλα για την απαλοιφή του θορύβου) σε μία συσκευή φωτομέτρησης (μονοχρωμάτορα) Monochromator Microplate Reader Safire 2 TECAN AUSTRIA G.M.B.H./ Measurement parameter Editor Magellan (version 6).

## 6. Πρωτόκολλο ηπατικής διαφοροποίησης των WJ-MSCs κυττάρων<sup>3</sup>

1. Επίστρωση  $5,5 \times 10^5$  WJ-MSCs κυττάρων (passage 4) σε 9 τρυβλία των 60mm Petri και  $3 \times 10^4$  WJ-MSCs κυττάρων (passage 4) σε 3 τρυβλία 12 βοθρίων, στον πυθμένα των οποίων είναι τοποθετημένες κυκλικές καλυπτρίδες, καλυμμένες με πολυλυσίνη. Διατήρηση κυττάρων σε συμβατικό θρεπτικό υλικό βλαστικών κυττάρων μέχρι η επιφάνεια των τρυβλίων να επικαλυφθεί κατά 75% (Ημέρα 0).
2. Στην Ημέρα 0, μονιμοποιείται με 4% PFA 1 τρυβλίο 12 βοθρίων, και απομονώνεται ιζήμα από 3 τρυβλία των 60 mm. Τα ιζήματα διατηρούνται ξεχωριστά στους -80°C για απομόνωση DNA, microRNA και πρωτεϊνών. Το τρυβλίο 12 βοθρίων διατηρείται επίσης στους -80°C για μελέτη ανοσοκυτταροχημείας (ICC). Τα διατηρημένα υλικά από την Ημέρα 0 θα χρησιμοποιηθούν σαν controls, για την σύγκριση της μεταβολής της πρωτεϊνικής και γονιδιακής έκφρασης κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης.

3. Επιπλέον στην *Ημέρα 0*, στα κύτταρα χορηγείται θρεπτικό υλικό (D-MEM-F12 with Ultra Glutamine) εμπλουτισμένο με 20 ng/ml EGF και 10 ng/ml bFGF, για 2 ημέρες (παύση κυτταρικού πολλαπλασιασμού).
4. Στην *Ημέρα 2*, στα κύτταρα χορηγείται θρεπτικό υλικό (D-MEM-F12 with Ultra Glutamine) εμπλουτισμένο με 20 ng/ml HGF, 10 ng/ml bFGF, 0,61 g/L nicotinamide, 1 % insulin-transferrin-selenium premix (πρώτο στάδιο διαφοροποίησης). Διατήρηση σε αυτές τις συνθήκες για 10 ημέρες, με αλλαγές θρεπτικού κάθε 3 ημέρες. Μετά το τέλος αυτής της περιόδου, μονιμοποίηση με 4% PFA 1 τρυβλίου 12 βοθρίων για ανοσοκυτταροχημεία (ICC) και διατήρηση ιζημάτων από 3 τρυβλία των 60 mm, για απομόνωση DNA, mRNA και πρωτεϊνών (*Ημέρα 12*).
5. Στην *Ημέρα 12*, στα κύτταρα χορηγείται θρεπτικό υλικό (D-MEM-F12 with Ultra Glutamine) εμπλουτισμένο με 20 ng/ml OMS, 1 μmol/L dexamethasone, 1 % insulin-transferrin-selenium premix (ωρίμανση διαφοροποιημένων κυττάρων). Διατήρηση σε αυτές τις συνθήκες για 10 ημέρες, με αλλαγές θρεπτικού κάθε 3 ημέρες. Μετά το τέλος αυτής της περιόδου, μονιμοποίηση με 4% PFA 1 τρυβλίου 12 βοθρίων για ανοσοκυτταροχημεία (ICC) και διατήρηση ιζήματος από 3 τρυβλία των 60 mm, για απομόνωση DNA, mRNA και πρωτεϊνών (*Ημέρα 22*).
6. Διενέργεια ανοσοκυτταροχημείας στα μονιμοποιημένα με PFA τρυβλία για την ανίχνευση των εξής, χαρακτηριστικών για ηπατοκύτταρα, πρωτεϊνών:
  - A. Anti-Human Albumin antibody produced in rabbit,
  - B. Monoclonal Anti-CK18 antibody produced in rabbit,
  - Γ. Monoclonal Anti-AFP antibody produced in mouse,
  - Δ. Monoclonal Anti-CYP3A4 antibody produced in mouse,και την διακύμανση των επιπέδων τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.
7. Διενέργεια qRT-PCR για την διερεύνηση της έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων των ηπατοκυττάρων (ALB, AFP, CK18, CYP3A4, CYP2B6) και την διακύμανση των επιπέδων τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.
8. Διενέργεια χρώσης periodic acid-Schiff, σαν δοκιμασία λειτουργικότητας, για μέτρηση συσσώρευσης γλυκογόνου στα διαφοροποιημένα κύτταρα.

<sup>3</sup>Βασισμένο στο πρωτόκολλο του παρακάτω paper: Campard D., Lysy P. A., Naiimi M., Sokal E. M. Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology*. 2008, Vol. 134, pp. 833 – 848

## 7. Ανοσοκυτταροχημεία ICC (ανοσοϊστοχημεία σε κυτταρικές σειρές)

Η ανοσοκυτταροχημεία/ ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μια τεχνική για την ανάδειξη συγκεκριμένων αντιγόνων (πρωτεϊνών ως επί τω πλείστον) και την ακριβή εντόπισή τους σε κύτταρα και ιστούς. Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιεί την ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, προκαλώντας την ελάχιστη βλάβη στο κύτταρο και τους ιστούς, με την ελάχιστη δυνατή μη ειδική χρώση και στο συντομότερο χρονικό διάστημα και επιπλέον κάνοντας το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ορατό στο μικροσκόπιο. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Προετοιμασία πλακιδίων για κάθε διαφορετικό δοκιμαζόμενο αντίσωμα: αναγραφή του ονόματος του αντισώματος και της κυτταρικής σειράς σε κάθε πλακάκι.
2. Αφαίρεση των καλυπτρίδων με τα μονιμοποιημένα κύτταρα από το πολυτρυβλίο και εναπόθεσή τους στα πλακίδια.
3. Ενυδάτωση των πλακιδίων με TBS/ PBS για 5 λεπτά. Αφαίρεση.
4. Διαπερατοποίηση (permeabilization) των κυττάρων με προσθήκη διαλύματος 0.25% x Triton-X για 10 λεπτά.
5. Ξέπλυμα των πλακιδίων με TBS/ PBS για 5 λεπτά. Αφαίρεση.
6. Απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης των κυττάρων, επωάζοντας τα κύτταρα σε 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 10 λεπτά στο σκοτάδι.
7. Ξέπλυμα των πλακιδίων με TBS/ PBS για 5 λεπτά. Αφαίρεση.
8. Επώαση με Ultra V Block για 5 λεπτά, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος στους αντιγονικούς επιτόπους των κυττάρων.
9. Ξέπλυμα των πλακιδίων με TBS/ PBS για 5 λεπτά. Αφαίρεση.
10. Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C/ over-night.
11. Ξέπλυμα των πλακιδίων με TBS/ PBS για 5 λεπτά. Αφαίρεση.
12. Επώαση με Primary Antibody Enhancer σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

13. Ξέπλυμα των πλακιδίων με TBS/ PBS για 5 λεπτά. Αφαίρεση.
14. Επώαση με HRP Polymer (υπεροξειδάση του φυτού *Armoracia rusticana*: HorseRadish Peroxidase) για 15 λεπτά στο σκοτάδι.
15. Ξέπλυμα των πλακιδίων με TBS/ PBS για 5 λεπτά. Αφαίρεση.
16. Ανάμιξη DAB Plus Chromogen + DAB Plus Substrate (1:100) και επώαση των κυττάρων έως ότου να εμφανιστεί το σήμα (συχνός έλεγχος στο μικροσκόπιο).
17. Τερματισμός της αντίδρασης με τρεχούμενο νερό.
18. Χρωματισμός των πυρήνων των κυττάρων με αιματοξυλίνη, για τη διαδικασία της μέτρησης (counterstain).
19. Ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό.
20. Αφυδάτωση με διάλυμα 40% γλυκερόλης και κάλυψη με DPX mounting.
21. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων.

## 8. Στατιστική Ανάλυση

Οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD values) της απορρόφησης, για τις δοκιμασίες NRU και MTS, μεταφέρθηκαν σε υπολογιστικά φύλλα του προγράμματος Microsoft Office Excel 2013.

*Το ποσοστό της επιβίωσης των κυττάρων εκφράστηκε θέτοντας ως μέγιστη την επιβίωση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου.*

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι τιμές IC<sub>50</sub> για κάθε μία από τις χημικές ουσίες και για όλες τις διαφορετικές συνθήκες υπό τις οποίες εξετάστηκαν (κύτταρα, κυτταρικές σειρές, τρόπος καλλιέργειας και δοκιμασίες τοξικότητας). Οι τιμές IC<sub>50</sub> υπολογίστηκαν με τη χρήση της αναδιαταχθείσας συνάρτησης:

$$\log IC_{50} = \log EC_{50} - \frac{\log \left( \frac{Top - Bottom}{Y - Bottom} - 1 \right)}{HillSlope}$$



Η συνάρτηση αυτή αποτελεί μία εξίσωση-μαθηματικό μοντέλο τεσσάρων παραμέτρων και προτείνεται από τον φορέα ICCVAM.

Ο υπολογισμός και όλη η περαιτέρω στατιστική επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Graph Pad Prism 5.

Οι τιμές IC<sub>50</sub> χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί μια ανάλυση συσχέτισης γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες τιμές LD<sub>50</sub> που παρέχονται από την αναφορά αξιολόγησης του φορέα ICCVAM.

*Στην συνέχεια έγινε σύγκριση των γραμμικών παλινδρομήσεων τόσο των κυτταρικών σειρών (WJ-MSCs και HepG2) που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή των ουσιών όσο και των διαφορετικών δοκιμασιών μέσω των οποίων ελέχθησαν in vitro οι ουσίες αυτές, με τις γραμμικές παλινδρομήσεις της ήδη εγκεκριμένης και καθιερωμένης κυτταρικής σειράς ινοβλαστών NIH 3T3. Τα δεδομένα για την κυτταρική σειρά NIH 3T3 προήλθαν από την αναφορά αξιολόγησης του φορέα ICCVAM.*

Για την ποσοτική αξιολόγηση της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής r<sup>2</sup>.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη των τιμών LD<sub>50</sub> με βάση της τιμές IC<sub>50</sub> με χρήση των εξισώσεων:

- **RC-rat-onlymillimole** ( $\log LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = 0.439 \log IC_{50} \text{ (mM)} + 0.621$ ) για χημικές ουσίες γνωστού μοριακού βάρους.
- **RC-rat-onlyweight** ( $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$ ) για χημικές ουσίες άγνωστου μοριακού βάρους.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1. Μελέτη ουσιών γενικευμένης και ηπατικής τοξικότητας, σε 8 κλιμακούμενες συγκεντρώσεις

### 1.1. Προετοιμασία των συγκεντρώσεων και υπολογισμός των διαδοχικών αραιώσεων των δοκιμαζόμενων ουσιών για τις δοκιμασίες *in vitro* τοξικότητας

Αρχικά επιλέξαμε τον αριθμό των 8 συγκεντρώσεων συμπεριλαμβανομένης και της μηδενικής συγκέντρωσης ουσίας (δείγματα αρνητικού ελέγχου). Οι τιμές των συγκεντρώσεων υπολογίστηκαν βάση του αριθμού των διαδοχικών αραιώσεων πλην της μηδενικής συγκέντρωσης σε συνδυασμό με την τιμή της διαλυτότητας της κάθε ουσίας. Ο αριθμός των διαδοχικών αραιώσεων είναι 6.

Βάση των οδηγιών του φορέα ICCVAM (2001), στις τοξικολογικές μεθόδους χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις υπολογιζόμενες με βάση συγκεκριμένες δυνάμεις της ρίζας του 10 ( $\sqrt[6]{10}$ ). Πιο συγκεκριμένα, ο τύπος που χρησιμοποιήσαμε για τον υπολογισμό των 8 συγκεντρώσεων (7 διαδοχικές συγκεντρώσεις για κάθε ουσία + 1 συγκέντρωση μηδενικής ουσίας) είναι:

$$C1 = n/\sqrt[6]{10}, C2 = C1/\sqrt[6]{10}, C3 = C2/\sqrt[6]{10} \text{ κ.ο.κ.}$$

Όπου  $n \rightarrow$  η διαλυτότητα της ουσίας και  $\sqrt[6]{10} = 1,47$

$$\text{Άρα } C_v = C_{v-1}/\sqrt[6]{10}$$

Η παραπάνω μέθοδος υπολογισμού των διαδοχικών αραιώσεων έχει το πλεονέκτημα πως μπορεί να εφαρμοστεί σε ανεξάρτητες πειραματικές δοκιμές τοξικότητας ουσιών με στενότερα ή ευρύτερα όρια τοξικότητας, ακριβώς επειδή μοιράζονται όμοια υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακας 1).

Αριθμός διαδοχικών αραιώσεων (παράγοντας αραιώσης)	Διαδοχικές τιμές συγκεντρώσεων
2 (3.16)	10, 31.6, 100
3 (2.15)	10, 21.5, 46.4, 100
4 (1.78)	10, 17.8, 31.7, 56.4, 100
6 (1.47)	10, 14.7, 21.5, 31.6, 46.4, 68.1, 100
12 (1.21)	10, 12.1, 14.7, 17.8, 21.5, 26.1, 31.6, 38.3, 46.4, 56.2, 68.1, 82.5, 100

(Παράδειγμα τιμών διαδοχικών συγκεντρώσεων σε  $\mu\text{g/ml}$ )

**Πίνακας 1** Υπολογισμός συγκεντρώσεων για 2, 3, 4, 6, 12 διαδοχικές συγκεντρώσεις ουσίας με διαλυτότητα  $100\mu\text{g/ml}$

Υποσημείωση: Εάν η τιμή  $IC_{50}$  της ουσίας δεν εντοπιστεί μεταξύ των 8 συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήσαμε, τότε επαναλαμβάνουμε το πείραμα χρησιμοποιώντας ως συγκέντρωση  $C_1$  (πυκνότερο διάλυμα ουσίας) την συγκέντρωση  $C_7$  του προηγούμενου πειράματος και υπολογίζοντας τις διαδοχικές αραιώσεις με βάση τον ίδιο τύπο που χρησιμοποιήσαμε παραπάνω:  $C_n = C_{n-1}/6\sqrt{10}$

### Προετοιμασία διαλυμάτων ουσιών, μη διαλυτών στο νερό

Από το σύνολο των υπό δοκιμή φαρμακευτικών ουσιών, υπήρξαν 9 ουσίες οι οποίες είχαν διαφορετικό διαλύτη από αυτόν του νερού. Συγκεκριμένα, οι ουσίες αυτές ήταν διαλυτές είτε σε DMSO, ή σε EtOH (αιθανόλη) ή σε DMF.

Οι παραπάνω διαλύτες, όταν χορηγηθούν σε κύτταρα στην καλλιέργεια, προκαλούν τοξικότητα και τον θάνατο αυτών των κυττάρων από μια συγκεκριμένη συγκέντρωση και πάνω. Αφού χορηγήσαμε τους παραπάνω διαλύτες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στις κυτταρικές μας σειρές, συμπεράναμε πως η μέγιστη συγκέντρωση του DMSO, της EtOH και του DMF, η οποία δεν επηρεάζει τα κύτταρα στην καλλιέργεια (δεν δημιουργεί τοξικότητα) είναι 1% σε υδατικό διάλυμα θρεπτικού

υλικού. Η τιμή αυτή συμπίπτει με τη συνιστώμενη συγκέντρωση χορήγησης των παραπάνω διαλυτών σε κύτταρα.

### Πίνακας 2

Καταγραφή των δοκιμαζόμενων ουσιών, της τάξης κινδύνου της κάθε ουσίας και του είδους της τοξικότητας που προκαλούν *in vivo*:

<b>ΟΥΣΙΑ</b>	<b>ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ (gr/mol)</b>	<b>ΤΑΞΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ (LD50, mg/kg)</b>	<b>ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ</b>
<i>Flutamide</i>	276,61	4 (>300 – 2000)	ηπατική
<i>Erythromycin</i>	733,94	5 (>2000 - 5000)	ηπατική
<i>Disulfiram</i>	296,54	4 (>300 – 2000)	ηπατική
<i>Lithoholic acid</i>	376,57	4 (>300 – 2000)	ηπατική
<i>Isoniazid</i>	137,14	4 (>300 – 2000)	ηπατική
<i>Potassium Cyanide</i>	65,12	2 (>5 – 50)	ηπατική
<i>Acetaminophen</i>	151,16	4 (>300 – 2000)	ηπατική
<i>Paraquat</i>	257,16	3 (> 50 – 300)	ηπατική
<i>Thalium Sulfate</i>	266,14	2 (>5 – 50)	ηπατική
<i>EtOH</i>	46,07	4 (>300 – 2000)	ηπατική
<i>Acetylsalicylic acid</i>	180,16	3 (> 50 – 300)	γενικευμένη (+ηπατική)
<i>Cisplatin</i>	300	2 (>5 – 50)	γενικευμένη (+ηπατική)
<i>Chloroquine phosphate</i>	515,86	4 (>300 – 2000)	νευρολογική, καρδιακή
<i>Cyclosporine</i>	1202,61	4 (>300 – 2000)	νευρολογική, νεφρική
<i>SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)</i>	288.38	-	δερματική (θετικό control)
<i>Glycerol</i>	92,09	6 (>5000)	- (αρνητικό control)

Οι κυτταρικές σειρές, στις οποίες δοκιμάστηκαν οι παραπάνω ουσίες είναι οι εξής:

- ❖ WJ-MSCs (βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton)
- ❖ HepG2 (ηπατικό καρκίνωμα)
- ❖ NIH 3T3 (ινοβλάστες ποντικού)

Ακολούθησαν μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας σε 48 ώρες μετά τη χορήγηση των ουσίες, μέσω των μεθόδων MTS και NRU.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι τιμές IC50 (η συγκέντρωση της ουσίας που ευθύνεται για το θάνατο του 50% του κυτταρικού πληθυσμού *in vitro*, σε χορήγηση ουσίας σε κύτταρα), όπως επίσης υπολογίστηκαν και οι τιμές LD50 (η συγκέντρωση της ουσίας που ευθύνεται για το θάνατο του 50% του ζωικού πληθυσμού *in vivo*, σε χορήγηση ουσίας σε πειραματόζωα), καθώς και των λογαρίθμων τους.

## 1.2. Οι τιμές IC50

### Πίνακας 3

Παρουσίαση των τιμών IC50 των 17 φαρμακευτικών ουσιών, για τις κυτταρικές σειρές HepG2, NIH 3T3 και WJ-MSCs, με τη μέθοδο MTS

:

Ουσίες	Hep-G2	NIH-3T3	WJ-MSCs
<u>Glycerol (negative control)</u>	95.719,41	70.631,76	49.552,55
<u>Methotraxate</u>	Neg. Cntr (V: 93.3% -> 450µg/ml)	Neg. Cntr (V: 84.6% -> 450µg/ml)	Neg. Cntr (V >100% -> 450µg/ml)
<u>Acetylsalicylic acid</u>	1.268,24	1.034,17	1.138,86
<u>Lithocholic acid</u>	615,18	524,81	179,06
<u>Erythromycin</u>	468,81	314,05	Neg. Cntr (V: 82.8% -> 500µg/ml)
<u>Disulfiram</u>	372,39	59,43	116,41
<u>Cyclosporine</u>	111,43	100,00	47,75
<u>Flutamide</u>	99,77	232,27	103,51
<u>Cis platin</u>	9,18	6,17	2,97
<u>Chloroquine phosphate</u>	24,95	20,75	57,81
<u>SDS (positive control)</u>	Pos. Cntr (V: 11.2% -> 2850µg/ml)	Pos. Cntr (V: 25.1% -> 2850µg/ml)	Pos. Cntr (V: 9.5% -> 2850µg/ml)
<u>Isoniazid</u>	8.800,35	10.471,29	7.040,44
<u>Potassium Cyanide</u>	1.822,64	947,70	2.699,60
<u>Acetaminophen</u>	1.433,51	2.934,95	1.355,81
<u>Paraquat</u>	0,18	0,09	0,17
<u>Thalium Sulfate</u>	360,58	158,82	184,08
<u>EtOH</u>	26,61	49,43	34,75

*Οι τιμές IC50 μετρημένες σε µg/ml*

*Neg. Cntr = Negative Control*

*Pos. Cntr = Positive Control*

*V = Viability*

#### Πίνακας 4

Παρουσίαση των τιμών IC50 των 17 φαρμακευτικών ουσιών, για τις κυτταρικές σειρές HepG2, NIH 3T3 και WJ-MSCs, με τη μέθοδο NRU:

Ουσίες	Hep-G2	NIH-3T3	WJ-MSCs
<u>Glycerol (negative control)</u>	62.373,48	78.162,78	39.810,72
<u>Methotraxate</u>	Neg. Cntr (V: 66.8% -> 450µg/ml)	Neg. Cntr (V: 88.2% -> 450µg/ml)	Neg. Cntr (V: 73.4% -> 450µg/ml)
<u>Acetylsalicylic acid</u>	953,98	555,52	331,44
<u>Lithocholic acid</u>	373,25	451,86	146,89
<u>Erythromycin</u>	396,28	207,01	409,26
<u>Disulfiram</u>	358,92	42,66	100,00
<u>Cyclosporine</u>	38,73	32,28	37,84
<u>Flutamide</u>	101,16	79,07	61,52
<u>Cis platin</u>	4,31	2,62	2,63
<u>Chloroquine phosphate</u>	16,33	9,94	49,66
<u>SDS (positive control)</u>	Pos. Cntr (V: 9.6% -> 2850µg/ml)	Pos. Cntr (V: 1% -> 2850µg/ml)	Pos. Cntr (V: 3.3% -> 2850µg/ml)
<u>Isoniazid</u>	6.469,94	9.817,48	9.837,85
<u>Potassium Cyanide</u>	1.299,27	905,84	2.306,22
<u>Acetaminophen</u>	1.005,32	5.334,58	1.103,57
<u>Paraquat</u>	0,13	0,11	0,64
<u>Thalium Sulfate</u>	163,83	111,71	203,38
<u>EtOH</u>	21,78	37,84	36,22

Οι τιμές IC50 μετρημένες σε µg/ ml

Neg. Cntr = Negative Control

Pos. Cntr = Positive Control

V = Viability



### 1.3. Οι τιμές LD50

Η πρόβλεψη των αρχικών δόσεων για πρόκληση θανάτου που οφείλεται σε οξεία από του στόματος τοξικότητα σε ποσοστό 50% των ζωικών μοντέλων (τιμές LD50) έγινε με βάση τις τιμές IC50 και με τη χρήση των εξισώσεων:

- **RC-rat-only millimole** ( $\log LD50 \text{ (mmol/kg)} = 0.439 \log IC50 \text{ (mM)} + 0.621$ )
- **RC-rat-only weight** ( $\log LD50 \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC50 \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$ )

#### Πίνακας 5

Παρουσίαση των τιμών LD50 υπολογισμένες σε mg/kg, mmol/kg, όπως επίσης και μετά από μετατροπή των τιμών LD50 από mmol/kg σε mg/ml (δύπλη επιβεβαίωση) για τη χορήγηση των ουσιών σε κύτταρα WJ-MSCs για τη δοκιμασία MTS καθώς και την NRU:

MTS Assay			-	NRU Assay			-
<u>Ουσίες σε WJ-MSCs</u>	<u>LD50 (mg/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg -&gt; mg/kg)</u>	<u>LD50 (mg/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg -&gt; mg/kg)</u>	
<b><u>Glycerol (negative control)</u></b>	5896.10	66.05	6082.15	5435.01	59.99	5524.88	
<b><u>Acetylsalicylic acid</u></b>	1448.79	9.39	1691.28	915.35	5.46	983.74	
<b><u>Lithocholic acid</u></b>	727.97	3.01	1135.32	676.28	2.76	1040.79	
<b><u>Erythromycin</u></b>	-	-	-	990.07	3.23	2373.03	
<b><u>Disulfiram</u></b>	620.23	2.77	821.89	586.14	2.59	768.84	
<b><u>Cyclosporine</u></b>	445.23	1.01	1219.08	408.33	0.92	1100.76	
<b><u>Flutamide</u></b>	593.72	2.72	750.12	489.22	2.16	596.92	
<b><u>Cis platin</u></b>	158.41	0.55	165.23	151.34	0.52	156.56	
<b><u>Chloroquine phosphate</u></b>	478.04	1.60	824.61	451.76	1.50	771.39	
<b><u>Isoniazid</u></b>	2853.04	23.54	3228.83	3231.16	27.27	3739.66	
<b><u>Potassium Cyanide</u></b>	1997.30	21.43	1395.84	1883.64	20.00	1302.59	
<b><u>Acetaminophen</u></b>	1545.89	10.95	1654.63	1431.93	10.00	1511.66	
<b><u>Paraquat</u></b>	54.62	0.17	43.14	89.64	0.30	77.40	
<b><u>Thalium Sulfate</u></b>	735.50	3.55	945.85	763.29	3.71	988.58	
<b><u>EtOH</u></b>	395.60	3.69	170.09	401.74	3.76	173.21	

### Πίνακας 6

Παρουσίαση των τιμών LD50 υπολογισμένες σε mg/kg, mmol/kg, όπως επίσης και μετά από μετατροπή των τιμών LD50 από mmol/kg σε mg/ml (διπλή επιβεβαίωση) για τη χορήγηση των ουσιών σε κύτταρα HepG2 για τη δοκιμασία MTS καθώς και την NRU:

MTS Assay		-		NRU Assay		
<u>Ουσίες σε HepG2</u>	<u>LD50 (mg/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg -&gt; mg/kg)</u>	<u>LD50 (mg/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg -&gt; mg/kg)</u>
<b><u>Glycerol (negative control)</u></b>	7532.38	88.18	8120.49	6423.03	73.07	6728.65
<b><u>Acetylsalicylic acid</u></b>	1507.96	9.84	1773.08	1356.40	8.69	1564.74
<b><u>Lithocholic acid</u></b>	1152.15	5.18	1951.73	956.72	4.16	1567.32
<b><u>Erythromycin</u></b>	1041.39	3.43	2518.86	978.26	3.19	2339.69
<b><u>Disulfiram</u></b>	955.90	4.62	1369.33	942.89	4.54	1347.36
<b><u>Cyclosporine</u></b>	610.22	1.47	1768.41	411.85	0.92	1111.94
<b><u>Flutamide</u></b>	585.64	2.67	738.08	588.65	2.69	742.57
<b><u>Cis platin</u></b>	241.06	0.90	271.20	181.91	0.65	194.53
<b><u>Chloroquine phosphate</u></b>	349.69	1.11	570.18	298.70	0.92	473.41
<b><u>Isoniazid</u></b>	3099.95	25.97	3561.10	2764.74	22.69	3111.24
<b><u>Potassium Cyanide</u></b>	1725.76	18.04	1174.74	1521.59	15.55	1012.53
<b><u>Acetaminophen</u></b>	1578.27	11.22	1695.60	1383.11	9.60	1451.03
<b><u>Paraquat</u></b>	55.88	0.17	44.31	48.88	0.15	37.84
<b><u>Thalium Sulfate</u></b>	944.50	4.77	1270.60	704.30	3.38	898.69
<b><u>EtOH</u></b>	358.18	3.28	151.27	332.46	3.01	138.54

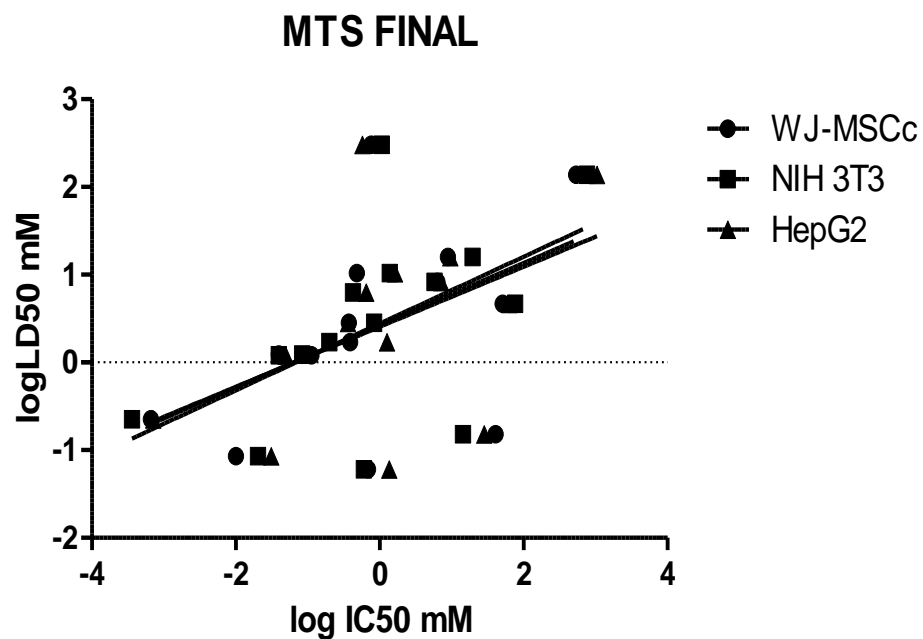
### Πίνακας 7

Παρουσίαση των τιμών LD50 υπολογισμένες σε mg/kg, mmol/kg, όπως επίσης και μετά από μετατροπή των τιμών LD50 από mmol/kg σε mg/ml (διπλή επιβεβαίωση) για τη χορήγηση των ουσιών ήπιας τοξικότητας σε κύτταρα NIH 3T3 για τη δοκιμασία MTS καθώς και την NRU:

<u>MTS Assay</u>		<u>-</u>		<u>NRU Assay</u>		
<u>Ουσίες σε NIH 3T3</u>	<u>LD50 (mg/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg -&gt; mg/kg)</u>	<u>LD50 (mg/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg)</u>	<u>LD50 (mmol/kg -&gt; mg/kg)</u>
<b><u>Glycerol (negative control)</u></b>	6727.10	77.17	7106.15	6985.48	80.67	7429.34
<b><u>Acetylsalicylic acid</u></b>	1397.74	9.00	1621.17	1109.25	6.85	1234.09
<b><u>Lithocholic acid</u></b>	1086.03	4.83	1820.24	1027.21	4.53	1704.49
<b><u>Erythromycin</u></b>	897.19	2.88	2112.61	768.34	2.40	1759.38
<b><u>Disulfiram</u></b>	482.98	2.06	611.82	426.93	1.78	528.94
<b><u>Cyclosporine</u></b>	586.14	1.40	1686.36	384.90	0.85	1026.60
<b><u>Flutamide</u></b>	801.96	3.87	1069.59	537.10	2.41	666.45
<b><u>Cis platin</u></b>	207.93	0.76	227.78	151.22	0.52	156.42
<b><u>Chloroquine phosphate</u></b>	326.53	1.02	525.89	248.35	0.74	380.74
<b><u>Isoniazid</u></b>	3307.04	28.03	3843.52	3228.67	27.24	3736.26
<b><u>Potassium Cyanide</u></b>	1353.07	13.54	881.56	1330.52	13.27	864.25
<b><u>Acetaminophen</u></b>	2060.38	15.36	2322.42	2573.25	19.97	3018.99
<b><u>Paraquat</u></b>	43.59	0.13	33.05	45.98	0.14	35.20
<b><u>Thalium Sulfate</u></b>	696.20	3.33	886.51	610.79	2.85	759.63
<b><u>EtOH</u></b>	450.99	4.31	198.54	408.33	3.83	176.57

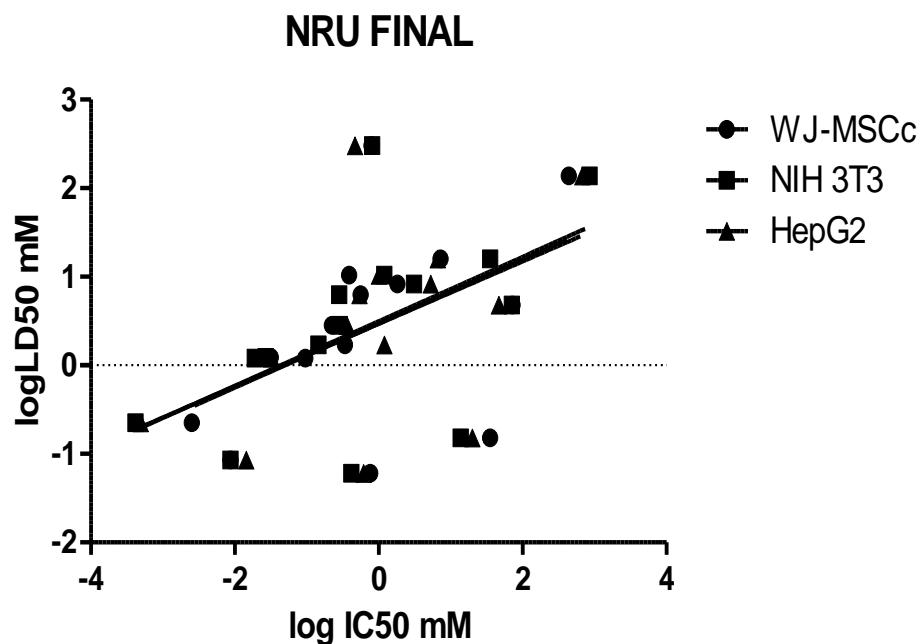
2. Συσχέτιση γραμμικών παλινδρομήσεων WJ-MSCs - NIH 3T3 - HepG2 για το σύνολο των ουσιών

Οι λογαριθμημένες τιμές IC50, που προκύπτουν από την δοκιμασίες τοξικότητας MTS και NRU, αντιστοιχίζονται με τις λογαριθμημένες *in silico* τιμές LD50 όλων των ουσιών (τα δεδομένα αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων RC/ RC database), όπως φαίνεται στα **Διαγράμματα 1 και 2**:



	Εξίσωση Παλινδρόμησης	r <sup>2</sup>	P (value)
WJ-MSCs	$\log LD50 = 0,2553 \log IC50 + 0,2584$	0,067	0,07
HepG2	$\log LD50 = 0,272 \log IC50 + 0,376$	0,113	0,08
NIH3T3	$\log LD50 = 0,3121 \log IC50 + 0,4003$	0,175	0,035

**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1**



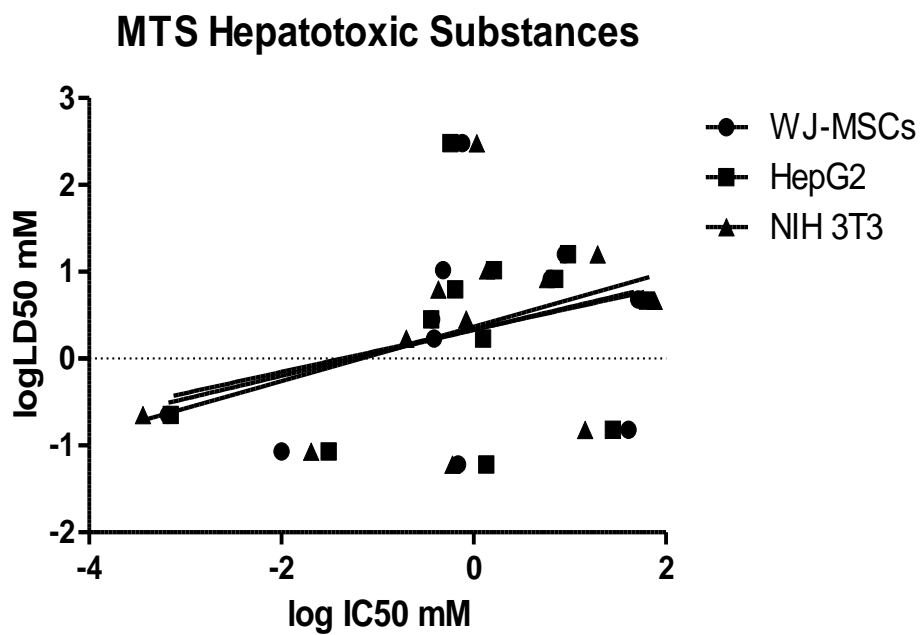
	Εξίσωση Παλινδρόμησης	r <sup>2</sup>	P (value)
WJ-MSCs	$\log LD50 = 0,3613 \log IC50 + 0,4704$	0,23	0,07
HepG2	$\log LD50 = 0,3525 \log IC50 + 0,4683$	0,246	0,06
NIH3T3	$\log LD50 = 0,3638 \log IC50 + 0,497$	0,3	0,03

**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2**

Η συσχέτιση των γραμμικών παλινδρομήσεων των κυτταρικών σειρών για τα αποτελέσματα όλων των ουσιών, δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για τα 3 κυτταρικά μοντέλα, καθώς όπως γίνεται φανερό από τα διαγράμματα οι 3 βέλτιστες ευθείες που προκύπτουν από τις παραπάνω εξισώσεις παλινδρόμησης, έχουν πολύ μεγάλο βαθμό ταύτισης.

### 3. Συσχέτιση γραμμικών παλινδρομήσεων WJ-MSCs - NIH 3T3 - HepG2 για τις ηπατοτοξικές ουσίες

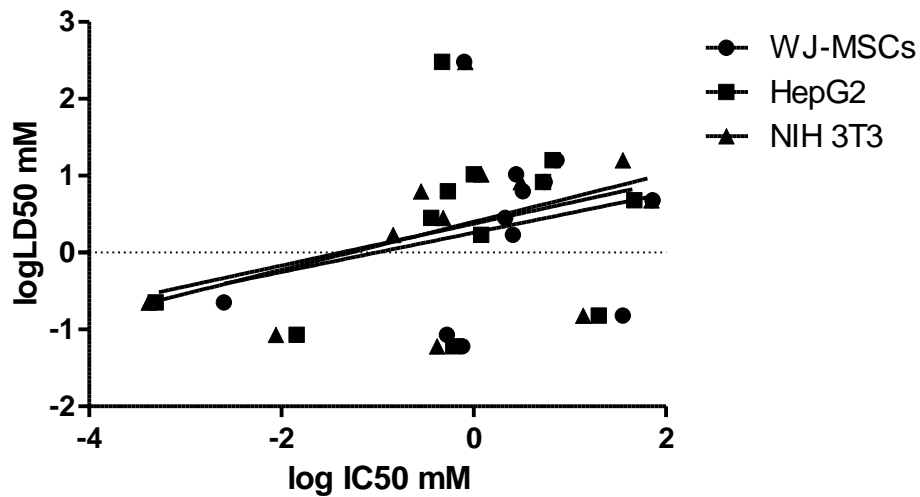
Οι λογαριθμημένες τιμές IC50, που προκύπτουν από την δοκιμασίες τοξικότητας MTS και NRU, αντιστοιχίζονται με τις λογαριθμημένες *in silico* τιμές LD50 των ηπατοτοξικών ουσιών (τα δεδομένα αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων RC/ RC database), όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 3 και 4:



	Εξίσωση Παλινδρόμησης	r <sup>2</sup>	P (value)
WJ-MSCs	$\log LD50 = 0,264 \log IC50 + 0,3299$	0,1152	0,3
HepG2	$\log LD50 = 0,2438 \log IC50 + 0,3344$	0,08812	0,19
NIH3T3	$\log LD50 = 0,313 \log IC50 + 0,3665$	0,1660	0,35

**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3**

### NRU Hepatotoxic Substances



	Εξίσωση Παλινδρόμησης	r <sup>2</sup>	P (value)
WJ-MSCs	$\log\text{LD50}=0,2553\log\text{IC50}+0,2584$	0,067	0,4
HepG2	$\log\text{LD50}=0,272\log\text{IC50}+0,376$	0,113	0,18
NIH3T3	$\log\text{LD50}=0,3121\log\text{IC50}+0,4003$	0,175	0,29

**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4**

Η συσχέτιση των γραμμικών παλινδρομήσεων των κυτταρικών σειρών για τα αποτελέσματα των ηπατοτοξικών ουσιών, δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για τα 3 κυτταρικά μοντέλα, καθώς όπως γίνεται φανερό από τα διαγράμματα οι 3 βέλτιστες ευθείες που προκύπτουν από τις παραπάνω εξισώσεις παλινδρόμησης, έχουν πολύ μεγάλο βαθμό ταύτισης.

#### 4. Αποτελέσματα πρόβλεψης τοξικότητας για το σύνολο των ουσιών

Μετά τον υπολογισμό των *in vivo* τιμών LD<sub>50</sub> από τις *in vitro* τιμές IC<sub>50</sub>, σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

**RC rat only millimole regression:**  $\log LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = 0.439 \log IC_{50} \text{ (mM)} + 0.621$

**RC rat only weight regression:**  $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$

υπολογίσαμε το ποσοστό ορθής πρόβλεψης της τάξης κινδύνου για κάθε ουσία.

Όταν η υπολογισμένη *in vivo* τιμή LD<sub>50</sub> βρίσκεται εντός των ορίων του εύρους των ήδη γνωστών LD<sub>50</sub> τιμών της εκάστοτε τάξης κινδύνου, τότε η πειραματική IC<sub>50</sub> τιμή έχει προβλέψει ορθά την *in vivo* τοξικότητα της συγκεκριμένης ουσίας.

#### Πίνακας 8

Παρουσίαση των ποσοστών ορθής πρόβλεψης για το σύνολο των ουσιών:

Μέθοδος	Κυτταρικός τύπος	% RC prediction rate (rat only weight regression)	% RC prediction rate (rat only millimole regression)	r <sup>2</sup>	P
MTS	WJ-MSCs	<u>64,3</u>	50	0,245	<0,01
	HepG2	<u>60</u>	53,3	0,223	
	NIH 3T3	<u>46,7</u>	46,7	0,298	
NRU	WJ-MSCs	60	60	0,23	<0,01
	HepG2	46,7	53,3	0,25	
	NIH 3T3	40	40	0,3	

Τα υψηλότερα ποσοστά ορθής πρόβλεψης και για τις 3 κυτταρικές σειρές εντοπίζονται με τη χρήση της εξίσωσης **RC-rat-only weight** ( $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$ ), για τα



πειραματικά δεδομένα που εξήχθησαν μέσω της μεθόδου MTS. Επιπλέον, γίνεται φανερό ότι τα WJ-MSCs πλεονεκτούν κατά **27,4%** σε ποσοστό ορθής πρόβλεψης της τοξικότητας συγκριτικά με τα NIH 3T3, και κατά **6,7%** συγκριτικά με τα HepG2.

## 5. Αποτελέσματα πρόβλεψης ηπατοτοξικότητας για τις ηπατοτοξικές ουσίες

*Πίνακας 9*

Παρουσίαση των ποσοτών ορθής πρόβλεψης για τις ηπατοτοξικές ουσίες:

Μέθοδος	Κυτταρικός τύπος	% RC prediction rate (rat only weight regression)	% RC prediction rate (rat only millimole regression)	r <sup>2</sup>	P
MTS	WJ-MSCs	<u>54,5</u>	36,36	0,1152	<0,01
	HepG2	<u>50</u>	41,7	0,0881	
	NIH 3T3	<u>33,3</u>	33,3	0,166	
NRU	WJ-MSCs	50	50	0,067	<0,01
	HepG2	41,7	41,7	0,113	
	NIH 3T3	33,3	25	0,175	

Τα υψηλότερα ποσοστά ορθής πρόβλεψης και για τις 3 κυτταρικές σειρές εντοπίζονται με τη χρήση της εξίσωσης **RC-rat-only weight** ( $\log\text{LD50 (mg/kg)} = 0.372 \log\text{IC50 (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$ ), για τα πειραματικά δεδομένα που εξήχθησαν μέσω της μεθόδου MTS. Επιπλέον, γίνεται φανερό ότι τα WJ-MSCs πλεονεκτούν κατά **38,9%** σε ποσοστό ορθής πρόβλεψης της ηπατοτοξικότητας συγκριτικά με τα NIH 3T3, και κατά **8,25%** συγκριτικά με τα HepG2.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ –**

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 1. Συμπεράσματα πειραματικών αποτελεσμάτων

### 1.1. Συμπέρασμα αποτελεσμάτων γενικευμένης τοξικότητας

Όπως αποδεικνύεται από τα διαγράμματα των γραμμικών παλινδρομήσεων για τις 3 κυτταρικές σειρές, τα WJ-MSCs μπορούν να θεωρηθούν ένα ισάξιο *in vitro* μοντέλο πρόβλεψης της τοξικότητας με τις ήδη επικυρωμένες σειρές των NIH 3T3 και HepG2 κυττάρων.

Η ισάξια ποιότητα των 3 κυτταρικών σειρών, ως μοντέλα τοξικότητας επιβεβαιώνεται και από τα ποσοστά πρόβλεψης των *in vivo* τιμών LD50 από τις *in vitro* τιμές IC50 μέσω των δύο διαφορετικών εξισώσεων των RC rat-only millimole και RC-rat only weight. Και οι 3 σειρές παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά πρόβλεψης της *in vivo* τοξικότητας, παρ' όλα αυτά, τα WJ-MSCs δείχνουν να υπερέχουν ως προς την ικανότητά τους να προβλέπουν σωστά την τοξικότητα μίας ουσίας. Πιο συγκεκριμένα, τα WJ-MSCs υπερέχουν σε μεγάλο ποσοστό (27,4%) των NIH 3T3, ενώ σε μικρότερο, αλλά εξίσου σημαντικό ποσοστό (6,7%) των HepG2.

### 1.2. Συμπέρασμα αποτελεσμάτων ηπατοτοξικών ουσιών

Σε σχέση με τη μελέτη, ειδικότερα, των ηπατοτοξικών ουσιών, η συσχέτιση των γραμμικών παλινδρομήσεων για τις 3 κυτταρικές σειρές, προκρίνει τα WJ-MSCs, ως ένα αξιόπιστο *in vitro* μοντέλο πρόβλεψης της ηπατοτοξικότητας σε σχέση με τα NIH 3T3, αλλά και τα HepG2.

Το παραπάνω συμπέρασμα μπορεί να επιβεβαιωθεί και με βάση τα ποσοστά ορθής πρόβλεψης της *in vivo* ηπατοτοξικότητας, που βασίζονται στις 2 εξισώσεις RC rat-only millimole και RC-rat only weight.

Ο σκοπός του πειράματος επιτυγχάνεται εφόσον, ειδικά για τις ηπατοτοξικές ουσίες, τα ποσοστά ορθής πρόβλεψης δίνουν ξεκάθαρο πλεονέκτημα στα WJ-MSCs σε σχέση με τα NIH 3T3, σε ποσοστό 38,9%. Παράλληλα τα WJ-MSCs διατηρούν το πλεονέκτημα της ορθής πρόβλεψης σε σχέση και με τα

HerG2, αν και σε πολύ μικρότερο ποσοστό, της τάξεως του 8,25%. Βάσει αποτελεσμάτων γίνεται φανερό μια συσχέτιση των κυττάρων WJ-MSCs με τα κύτταρα ηπατικής προέλευσης HerG2, ως προς τη δυνατότητα των 2 αυτών κυτταρικών σειρών να προβλέπουν την ηπατοτοξικότητα φαρμακευτικών και λοιπών ουσιών.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, το πρωτεϊνικό και γενετικό προφίλ των WJ-MSCs τους δίνει χαρακτηριστικά κάποιου ενδιάμεσου προγονικού τύπου μεταξύ ηπατοβλάστης και ώριμου ηπατοκυττάρου. Συνεπώς, ήταν αναμενόμενη η συσχέτισή τους με τα κύτταρα HerG2, τα οποία αποτελούν κύτταρα ηπατικής προέλευσης. Άρα, τα κύτταρα WJ-MSCs, ακόμα και στην αδιαφοροποίητη κατάσταση, θα μπορούσαν να καλύψουν το υπάρχον κενό, με τη δημιουργία ενός αξιόπιστου *in vitro* μοντέλου πρόβλεψης ηπατοτοξικότητας. Αυτό, ενδεχομένως να επιλύσει το πρόβλημα της μελέτης της ενδεχόμενης ηπατικής βλάβης προκαλούμενη από φάρμακα καθώς και την εξέταση νέων χημικών ουσιών για πρόκληση ηπατικών παρενεργειών.

Αντιθέτως, τα κύτταρα NIH 3T3, που αποτελούν ινοβλάστες ποντικού, δείχνουν να έχουν μεγάλη απόκλιση, ως προς την ικανότητα πρόβλεψης της ηπατοτοξικότητας σε σχέση με τα WJ-MSCs, κάτι που είναι επίσης αναμενόμενο, βάσει και της διαφορετικής ιστολογικής προέλευσης των κυττάρων αυτών. Γι' αυτόν το λόγο, τα κύτταρα NIH 3T3 δεν μπορούν να θεωρηθούν ένα αξιόπιστο *in vitro* μοντέλο οργανοειδικής τοξικότητας, πολλώ δε μάλλον ηπατικής τοξικότητας.

### 1.3. Μελλοντικές έρευνες

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη δείξαμε ότι τα βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton μπορούν να αποτελέσουν ένα εν δυνάμει *in vitro* σύστημα μελέτης της ηπατοτοξικότητας νέων φαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών.

Για την τελική όμως επικύρωση της αξιοπιστίας του μοντέλου αυτού, απαιτείται:

- 1) η περαιτέρω στατιστική ανάλυση των ήδη υπάρχοντων αποτελεσμάτων,
- 2) η δοκιμή μιας ευρύτερης γκάμας ηπατοτοξικών ουσιών με μεγαλύτερη αντιπροσωπευτικότητα όσον αφορά τις τάξεις κινδύνου,

- 3) η επαναχορήγηση των δοκιμαζόμενων ουσιών που μελετήσαμε σε διαφορετικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας,
- 4) η περαιτέρω αξιολόγηση της ποιοτικής και ποσοτικής έκφρασης ηπατοκυτταρικών δεικτών, τόσο από τα αδιαφοροποίητα WJ-MSCs, όσο και από τα διάφορα στάδια της διαφοροποίησής τους προς κύτταρα με χαρακτηριστικά ηπατοκυττάρων (hepatocytes-like cells).

Πιο αναλυτικά, βάσει του φορέα ECVAM, η περαιτέρω στατιστική ανάλυση των ήδη υπαρχόντων αποτελεσμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της ετερογένειας και την ακρίβεια των παραπάνω *in vitro* δοκιμασιών τοξικότητας με μεθόδους όπως α) η διακύμανση εντός της δοκιμασίας (%CV εντός κάθε τρυβλίου/για κάθε χημική ουσία - intra assay variation), β) η διακύμανση των τιμών μεταξύ των διαφορετικών πειραμάτων (%CV μεταξύ διαφορετικών τρυβλίων/τιμών IC50 που αντιστοιχούν σε διαφορετικές χημικές ουσίες - inter assay variation) και γ) η διακύμανση των τιμών μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων καλλιέργειας των κυττάρων (inter culture variation).

Στα διαδοχικά στάδια διαφοροποίησης των WJ-MSCs σε ηπατικά κύτταρα, είναι δυνατή η ποιοτική αξιολόγηση μέσω των μεθόδων ανοσοκυτταροχημείας, όπως και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης ενδεχόμενων ηπατοκυτταρικών δεικτών μέσω της τεχνικής qRT-PCR.

Ακολουθώντας τα παραπάνω βήματα, καταφέραμε να εντάξουμε στα πλαίσια της μελέτης μας τη διαδικασία της ηπατικής διαφοροποίησης των WJ-MSCs και στη συνέχεια τη μικροσκοπική απεικόνιση, της αυξανόμενης έντασης του σήματος των τριών βασικών ηπατοκυτταρικών δεικτών α) της Αλβουμίνης/ Alb, β) του ενζύμου CYP3A4 του κυτοχρώματος και γ) της εμβρυϊκής φετοπρωτεΐνης/ AFP, οι οποίοι εκφράζονται στα τρία στάδια της διαφοροποίησης των WJ-MSCs σε ηπατικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά βέβαια, προέρχονται από πειράματα που βρίσκονται ακόμα σε πρωτόλειο στάδιο και επιδέχονται περαιτέρω στοχευμένη μελέτη. Αξίζει πάντως να σημειωθεί πως τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα μέτρησης της τοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών στο *in vitro* μοντέλο των βλαστικών κυττάρων WJ-MSCs συγκριτικά με τα ήδη επικυρωμένα από τον φορέα ICCVAM μοντέλα των HepG2 και NIH 3T3 κυττάρων, είναι ενθαρρυντικά και μπορούν να αποτελέσουν εχέγγυο για τις μελλοντικές έρευνες για την επικύρωση του συγκεκριμένου *in vitro* μοντέλου αξιολόγησης της ηπατοτοξικότητας ενδεχόμενων φαρμάκων και χημικών ουσιών.

# *BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ*

1. Wang Z., Oron E., Nelson B., Razis S., Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012, 10:440-454
2. Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoude G. A., Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008, 456:250-254
3. Korbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003, 349:570-582
4. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2007, 2:481-485
5. Bongso A., Fong C. Y. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2013, 9:226-240
6. Can A., Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 2007, 25:2886-2895
7. Kita K., Gauglitz G. G., Phan T. T., Herndon D. N., Jeschke M.G. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 2010, 19:491-502
8. Fong C. Y., Chak L. L., Biswas A., Tan J. H., Gauthaman K., Chan W. K., Bongso A. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2011, 7:1-16
9. U. S. National Academy Of Sciences. Working with stem cells. Understanding of stem cells. An overview of the science and issues. 2011, 1:8-12
10. Vitale A., Manciooco A., Alleva E. The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: the case of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2009, 33:33-47
11. Castell J. V., Gómez-Lechón M. J., Ponsoda X., Bort R. The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 1997, 13:331-338
12. Barile F. A., Cardona M. Acute cytotoxicity testing with cultured human lung and dermal cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998, 34:631-635
13. Ekwall B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1983, 407:64-77

14. Chensheng L., Hoolbrook C. M., Andres L. M. The implication of Using a Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Model for Pesticide Risk Assessment. *Environ Health Perspect* 2010, 118:125-130
15. Hideki M., Masayuki H. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2013, 116:647-652
16. Cotovio J., Grandidier M. H., Lelièvre D., Bremond C., Amsellem C., Maloug S. et al. In vitro assessment of eye irritancy using the Reconstructed Human Corneal Epithelial SkinEthic (TM) HCE model: application to 435 substances from consumer products industry. *Toxicol In Vitro* 2010, 24:523-537
17. Fernandes M. B., Gonçalves J. E., Scotti M.T., de Oliveira A. A., Tavares L. C., Storpirtis S. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Toxicol In Vitro* 2012, 26:535-540
18. Seiler A. E., Spielmann H. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nat Protoc* 2011, 6:961-978
19. Scanu M., Mancuso L., Cao G. Evaluation of the use of human mesenchymal stem cells for acute toxicity tests. *Toxicol In Vitro* 2011, 25:1989-1995
20. Stummann T. C., Hareng L., Bremer S. Hazard assessment of methylmercury toxicity to neuronal induction in embryogenesis using human embryonic stem cells. *Toxicology* 2009, 257:117-126
21. Gassmann K., Baumann J., Giersiefer S., Schuwald J., Schreiber T., Merk H. F., Fritsche E. Automated neurosphere sorting and plating by the COPAS large particle sorter is a suitable method for high-throughput 3D in vitro applications. *Toxicol In Vitro* 2012, 26:993-1000
22. Theunissen P. T., Robinson J. F., Pennings J. L., van Herwijnen M. H., Kleinjans J. C., Piersma A.H. Compound-specific effects of diverse neurodevelopmental toxicants on global gene expression in the neural embryonic stem cell test (ESTn). *Toxicol Appl Pharmacol* 2012, 262:330-340
23. Baek D. H., Kim T. G., Lim H. K., Kang J. W., Seong S. K., Choi S. E. et al. Embryotoxicity assessment of developmental neurotoxicants using a neuronal endpoint in the embryonic stem cell test. *J Appl Toxicol* 2012, 32:617-626



24. Duan Y., Ma X., Zou W., Wang C., Bahbahan I. S., Ahuja T. P., Tolstikov V., Zern M. A. Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010, 28:674-686
25. Hosberg H. T., Sobanski T., Novellino A., Whelan M., Weiss D. G., Bal-Price A. K. Application of micro-electrode arrays (MEAs) as an emerging technology for developmental neurotoxicity: evaluation of domoic acid-induced effects in primary cultures of rat cortical neurons. *Neurotoxicology* 2011, 32:158-168
26. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007, 131:861–872
27. Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S. et al. Induced pluripotent stem cell lines derive from human somatic cells. *Science* 2007, 318:1917–1920
28. Anokye-Danso F., Trivedi C. M., Juhr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y. et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011, 8:376–388
29. Miyoshi N., Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dewi D. L., Kano Y. et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 2011, 8:633–638
30. Kumar N., Sharma U., Singh C., Singh B. Thalidomide: chemistry, therapeutic potential and oxidative stress induced teratogenicity. *Curr Top Med Chem* 2012, 12:1436–1455
31. Ponce R. A. Safety assessment of immunomodulatory biologics: the promise and challenges of regulatory T-cell modulation. *J Immunotoxicol* 2011, 8:389–397
32. Gong G., Roach M. L., Jiang L., Yang X., Tian X. C. Culture conditions and enzymatic passaging of bovine ESC-like cells. *Cell Reprogram* 2010, 12:151–160
33. Liu W., Deng Y., Liu Y., Gong W., Deng W. Stem Cell Models for Drug Discovery and Toxicology Studies. *J Biochem Molecular Toxicology* 2013, 27:17-27
34. Karim Si-Tayeb K., Lemaigre P.F., Duncan S., Review on Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell* 2010
35. Gerets H. H. J., Tilmant K., Gerin B., Chanteux H., Depelchin B. O. et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity

- in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 2012, 28:69–87
36. Kajsja P. Kanebratt, Tommy B. Andersson, Evaluation of HepaRG Cells as an *in Vitro* Model for Human. *Drug Metabolism Studies* 2008, 36:1444–1452
  37. Greer M.L., Barber J., Eakins J., Kenna G. Cell based approaches for evaluation of drug-induced liver injury. *Toxicology* 2010, 268:125–31
  38. Campard D., Lysy P.A., Najimi M., Sokal E.M., Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology* 2008;, 34:833–848
  39. Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005, 23:220–229
  40. Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T., et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004, 22:1330–1337
  41. Weiss M.L., Medicetty S. Bledsoe A.R., et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006, 24:781–792
  42. Schmelzer E., Wauthier E., Reid L.M., The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 2006, 24:1852–1858
  43. Desmet V.J., Vaneyken P., Sciote R., Cytokeratins for probing cell lineage relationships in developing liver. *Hepatology* 1990, 12:1249–1251.
  44. Haruna Y., Saito K., Spaulding S., et al. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 1996, 23:476–481
  45. Stosiek P., Kasper M., Karsten U., Expression of cytokeratin-19 during human liver organogenesis. *Liver* 1990, 10:59–63
  46. Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A., General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol.* 2010, 640:1-40
  47. Guillouzo A., Corlu A., Aninat C., Glaise D., Morel F., Guguen-Guillouzo C., The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 2007, 168:66-73

48. Madan A., Graham R.A., Carroll K.M., Mudra D.R., Burton L.A., et al. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2003 4:421-31
49. Meyer H., Mally J. On hydrazine derivatives of pyridine carbonic acids. *Monatshefte Chemie verwandte Teile anderer Wissenschaften* 1912, 33: 93–414
50. Roche USA
51. Shinkichi S., Nanao W., Toshiaki K., Takayuki S., Nobuyuki A., et al. Pyridine and Pyridine Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 2007
52. Suarez J., Rangelova K., Jarzecki A., et al. An oxyferrous heme/protein-based radical intermediate is catalytically competent in the catalase reaction of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). *The Journal of Biological Chemistry* 2009 284:7017–29
53. Singh R., Manjunatha U., Boshoff H.I., et al. PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science* 2008 322:1392–5
54. Harvey, *Pharmacology* (4th ed.) 2009
55. [http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs-%20I\)/ISONIAZID.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs-%20I)/ISONIAZID.html)
56. Aghababian R.V. *Essentials of Emergency Medicine*. Jones & Bartlett Publishers 2010, 814.
57. Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). "6.1 and 7.1.1". Guideline 106: Control of pain in adults with cancer. Scotland: National Health Service (NHS) 2008
58. US FDA. January 13, 2011 FDA limits acetaminophen in prescription combination products; requires liver toxicity warnings Page accessed February 23, 2014
59. US FDA. Page updated August 6, 2013 Acetaminophen Toxicity Page accessed February 23, 2014
60. US FDA Page updated November 19, 2013 Using Acetaminophen and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Safely Page accessed February 23, 2014
61. Daly F.F., Fountain J.S., Murray L., Graudins A., Buckley N.A. Guidelines for the management of paracetamol poisoning in Australia and New Zealand—explanation and elaboration. A consensus statement from clinical toxicologists consulting to the Australasian poisons information centres. *Med J* 2008, 188:296–301
62. Hughes J. *Pain Management: From Basics to Clinical Practice*. Elsevier Health Sciences 2008

63. Kamel F. Paths from Pesticides to Parkinson's. *Science* 2013, 341:722–723.
64. Two pesticides -- rotenone and paraquat -- linked to Parkinson's disease, study suggests. *sciencedaily.com* 2011
65. Paraquat. *Pesticides News* 1996, 32:20–21
66. Court of first instance of the European communities, Press Release No° 45/07
67. Paraquat Dichloride. United States Environmental Protection Agency 2007
68. Facts about Paraquat. Centers for Disease Control 2006
69. Stevens G. Poisoned Latrobe. *Valley Express* 2008
70. Online “Mendelian Inheritance in Man” (OMIM)
71. <http://www.smh.com.au/news/world/suicide-note-reveals-taste-of-cyanide/2006/07/08/1152240534587.html>
72. Rubo A., Kellens R., Reddy J., Wooten J., Hasenpusch W. Alkali Metal Cyanides. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 2006
73. 10th Special Report to the U.S. Congress on Alcohol and Health: “Highlights from Current Research”. National Institute of Health. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. 2000. p. 134. Retrieved 21 October 2014.
74. Brust J.C.M. Ethanol and Cognition: Indirect Effects, Neurotoxicity and Neuroprotection: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2010, 1540–1557
75. Becker C.E. The Clinical Pharmacology of Alcohol. *California Medicine* 2013, 113:37–45
76. Safety data for ethyl alcohol. *Msd.chem.ox.ac.uk*. 2008
77. BirdLife International 2012. *Ketupa zeylonensis*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. International Union for Conservation of Nature
78. Grimmett et al. 1999
79. Mourer-Chauviré and Weesie 1986, Olsen et al. 2002, Mlíkovský 2002-2003, BLI 2009
80. Takechi K., Kuwabara Y., Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton’s jelly umbilical cord cells. *Placenta* 1993, 14:235–245
81. Friedman R., Betancur M., Boissel L., Tuncer H., Cetrulo C. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: Adjuvants for human cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2007, 13:1477–1486

82. Lund R. D., Wang S., Lu B., Girman S., Holmes T. et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* 2007, 25:602–611
83. Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang, C. C., Wei H. M. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004 22:1330–1333
84. Mitchell K. E., Weiss M. L., Mitchell B. M., Martin P., Davis D. et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003 21:50–60
85. Xu Q., et al., In vitro and in vivo magnetic resonance tracking of Sinerem-labeled human umbilical mesenchymal stromal cell-derived Schwann cells. *Cell Mol Neurobiol* 2011, 31:365-75
86. Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications* 1991 3:207–212
87. Malich G., Markovic B., Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 1997, 124:179-92
88. Da Costa A.O. et al. Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. *Biocell* 1999. 23:65-72
89. Eirheim H.U., Bundgaard C., Nielsen H.M. Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate. *Toxicol In Vitro* 2004, 18:649-57
90. Kuang T.H., Yen H.C., Ameae M.W. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids, *BioTechniques* 2004, 37:406-412
91. Frazier J.M. Application of the basic toxicological screening process to problems in bound residue toxicity. *Drug Metab Rev* 1990, 22:821-7
92. Repetto G., A. del Peso, Zurita J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008, 3:1125-31
93. ICCVAM Test Method Evaluation Report Appendix C2 November 2006
94. Blaauboer B.J. Toxicodynamic modelling and the interpretation of in vitro toxicity data. *Toxicol Lett* 2001, 120:111-23
95. Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology, Series on Testing and Assessment No. 129.

Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests 2010, 46-47

96. Griffith L.G., Swartz M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7:211-24
97. Blaauboer B.J. The necessity of biokinetic information in the interpretation of in vitro toxicity data. *Altern Lab Anim* 2002,2:85-91
98. Mazzoleni G., Di Lorenzo, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr* 2009, 4:13-22
99. Pampaloni F., Stelzer E.H., Masotti A. Three-dimensional tissue models for drug discovery and toxicology. *Recent Pat Biotechnol* 2009, 3:103-17
100. Brophy C.M. et al. Rat hepatocyte spheroids formed by rocked technique maintain differentiated hepatocyte gene expression and function. *Hepatology* 2009, 49:578-86
101. Tuschl G., et al. Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain liver-like properties long term: a valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies. *Chem Biol Interact* 2009, 181:124-37
102. Breier J.M. et al. Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: state of the science. *Neurotoxicol Teratol* 2010, 32:4-15
103. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7:211-24
104. Brad Chazotte, Labeling Nuclear DNA Using DAPI, Cold Spring Harbor Laboratory Press