

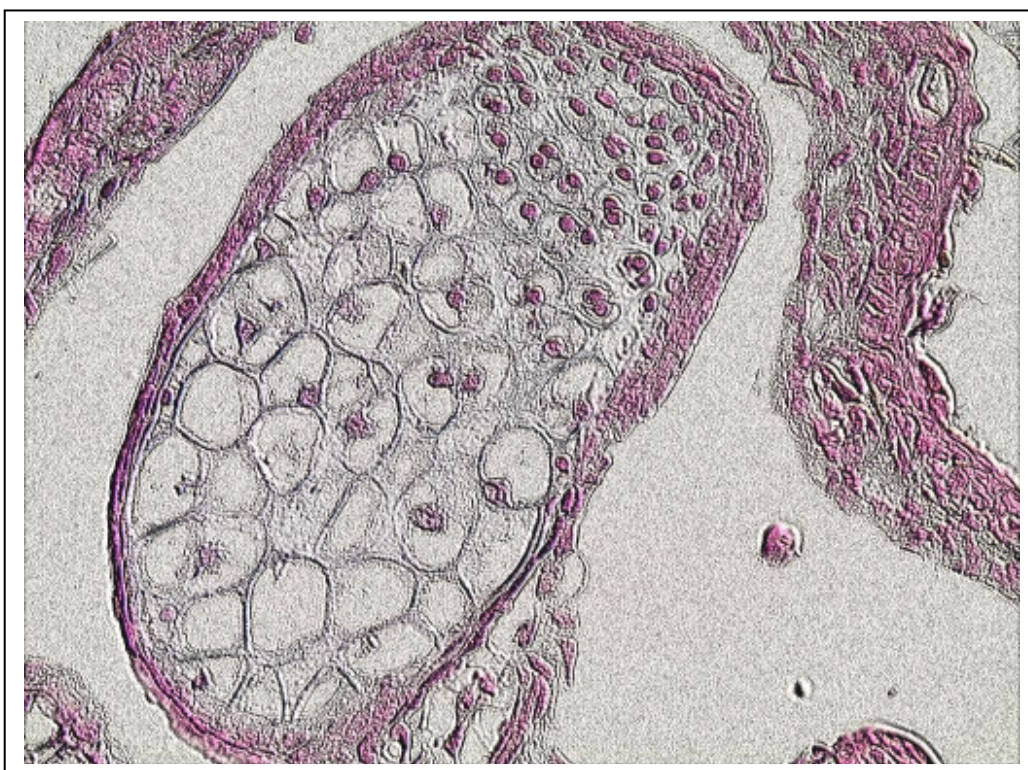


ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Βιολογίας & Ιατρική Σχολή Αθηνών

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»  
Διπλωματική εργασία

***Τοπολογικές ιδιότητες μεσεγχυματικών κυττάρων σε in vivo  
και in vitro σύστημα μελέτης***



**Μπακέλας Β. Ιωάννης Α.Μ. 220112  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**Επιβλέπουσα: Ισιδώρα Παπασιδέρη Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας  
Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2017**



---

## **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

*Ισιδώρα Παπασιδέρη*  
Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,  
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

*Ισιδώρα Παπασιδέρη*  
Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,  
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

*Ουρανία Τσιτσιλώνη*  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου,  
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

*Δημήτριος Στραβοπόδης*  
Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,  
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

---

**ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Στο κείμενο αυτό των ευχαριστιών, σκόπιμα θα παραλείψω πολλούς από τους ανθρώπους που συντέλεσαν είτε στην εγκαινίαση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας είτε στη μετεξέλιξή της, επειδή συμπορεύθηκαν «ετεροχρονισμένα» στις επιμέρους περιόδους που συμπλήρωσαν την τελεσφόρησή της. Αν όφειλα να συγκαταλέξω και να εκθέσω την επώνυμη συμβολή τους στο ίδιο τούτο κείμενο με τους υπόλοιπους συντελεστές της μακρόχρονης εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, πραγματικά θα αδικούσα τους τελευταίους, όσον αφορά στην απόδοση των ευσήμων για την ανεκτίμητη συνδρομή τους στην ηθική υποστήριξη, στην τεχνογνωσία και στον υλικοεργαστηριακό εξοπλισμό που μου παρείχαν για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων και για τη συλλογή των δεδομένων που απαιτήθηκαν για την ευόδωση του γραπτού δοκιμίου. Για το σκοπό αυτό θα περιοριστώ σε μια λιτή παράθεση των ονομάτων τους:

**Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικής [ΣΕΜΦΕ] – Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο [ΕΜΠ]:**

- 1] Ανδριανόπουλος Νικόλαος
- 2] Κυτόπουλος Βίκτωρ
- 3] Δερνίκας Ιωάννης

**Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών:**

- 1] Φασσέας Κωνσταντίνος
- 2] Ψαροκωστόπουλος Ιωάννης

**Ιατρική Σχολή - ΕΚΠΑ:**

- 1] Πατσούρης Ευστάθιος
- 2] Λάζαρης Ανδρέας
- 3] Καβαντζάς Νικόλαος
- 4] Αγρογιάννης Γιώργος
- 5] Παππίας Γιώργος

**Θεραπευτήριο Ογκολογικών Νοσημάτων «Άγιος Σάββας»:**

- 1] Βολουδάκη-Μπαλτατζή Ειρήνη
- 2] Βολουδάκης Γιώργος

**Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών [ΙΙΒΕΑΑ]:**

- 1] Σταυροπούλου-Γκιοκά Αικατερίνη
- 2] Παυλάκη Μαρία

Απευθύνω την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, Καθηγήτρια στον τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. *Παπασιδέρη Ισιδώρα*, για την ανεκτίμητη αρωγή της στην τελεσφόρηση του πονήματος τούτου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω για την αμέριστη υποστήριξή τους στα πρακτικά και θεωρητικά ζητήματα που ανέκυψαν, καθώς και για την υποδειγματική ακαδημαϊκή δεοντολογία με την οποία ενέσκηψαν στις δυσχέρειες που πλαισίωσαν την εκπόνησή του, στην αξιότιμη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, κ. *Τσιτσιλώνη Ουρανία*, καθώς και στον αγαπητό Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, κ. *Στραβοπόδη Δημήτριο*.

Είμαι ευγνώμων στην οικογένειά μου, για την υπομονή με την οποία εγκολπώθηκαν τον πολύμορφο αντίκτυπο του προσωπικού μου μόχθου.

Ιωάννης Μπακέλας  
Αθήνα, 14 Ιουλίου 2017



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο χώρος (*space*), με την έννοια μιας αυτοτελούς φυσικής οντότητας αντιπροσωπεύει έναν ακόμη περιοριστικό παράγοντα για όλα τα επίπεδα οικοσυστημικής οργάνωσης της ζωής στον πλανήτη. Η επιβίωση οποιουδήποτε οργανισμού στο κυτταρικό επίπεδο της βιολογικής του οργάνωσης, υπόκειται στην κοινή αυτή πρόκληση. Η πολιτισμική πρόοδος μέχρι τον 20<sup>ο</sup> αιώνα αποσαφήνισε οριστικά για όλες τις βαθμίδες της εγκύκλιας εκπαίδευσης, ότι ο «οικείος» τριδιάστατος χώρος δεν ταυτίζεται με κάποια εκδοχή «σκηνής» ή «αρένας» στα όρια της οποίας εξαντλείται ολόκληρη η πραγματικότητα. Αντιθέτως, μας μύησε στις καινοτόμους εξερευνήσεις του μικρόκοσμου και του μακρόκοσμου αξιοποιώντας μια ενιαία κλίμακα μεγέθους και εδραιώνοντας το όραμα της ενοποίησης διαφορετικών θεωριών, γνωστικών αντικειμένων ή και επιστημονικών κλάδων. Μας παιδαγώγησε στην προοπτική της κατανόησης ότι η πληρότητα της κλίμακας διαστάσεων του υλικού κόσμου δεν έχει ακόμη συμπληρωθεί, απλώς επειδή αυτοματοποιήθηκε *in silico* ίσως κάθε πιθανή εφαρμογή της γεωμετρίας των τριών διαστάσεων του Ευκλείδειου χώρου ή επειδή εμπεδώθηκε η ενότητα των τεσσάρων διαστάσεων του χωρόχρονου κατά Minkowski ή επειδή εικάζεται η πολλαπλότητα των διαστάσεων του χώρου σε κοσμολογική τάξη μεγέθους. Δεδομένου του αξιώματος ότι οι νόμοι της Φυσικής, της Χημείας και των συναφών κλάδων των θετικών επιστημών λειτουργούν όμοια κι απaráλλακτα σε οποιαδήποτε κλίμακα μεγέθους και σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή από την αρχή του κόσμου, είναι κοινή η γνώση ότι οι αλληλεπιδράσεις ύλης και ενέργειας στην υπομικροσκοπική κλίμακα διαστάσεων διέπονται από την απροσδιοριστία (ή τυχαιότητα), στη μικροσκοπική και υπερμικροσκοπική κλίμακα διαστάσεων πρωτοστατούν οι μοριακές αλληλεπιδράσεις και στο μακρόκοσμο υπεισέρχονται οι κοσμολογικές μεταβλητές. Ωστόσο, περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο γνωστικό πεδίο, η Τοπολογία παρέχει το γνωστικό υπόβαθρο που επιδαψιλεύεται την αυτοτέλεια του χώρου, θεωρούμενη είτε ως προς τη μια από τις διαστάσεις του, είτε θεωρούμενη σε περισσότερες διαστάσεις του, είτε θεωρούμενη σε καμιά διάστασή του (*"singularity"*). Στο πλαίσιο μιας ευοίωνης προοπτικής σύζευξής της με τη Βιολογία, πιθανώς στο προσεχές μέλλον να αναδυθεί μια εκδοχή «Διαστατικής Βιολογίας»...

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο **«Τοπολογικές ιδιότητες μεσεγγχυματικών κυττάρων σε *in vivo* και *in vitro* σύστημα μελέτης»** πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, σε συνεργασία με την Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Ειδικότερα, τα πειράματα σε μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό ολοκληρώθηκαν στον ομώνυμο τομέα, ενώ η συλλογή του φωτογραφικού υλικού συμβατικής μικροσκοπίας διεκπεραιώθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής καθώς και στο εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας της Ανωτάτης Γεωπονικής Σχολής Αθηνών. Τα πειράματα σε ανθρώπινο βιολογικό υλικό ολοκληρώθηκαν στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛ.Τ.ΟΠ.Α.) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Η προετοιμασία των παρασκευασμάτων ανθρώπινου και μη ανθρώπινου βιολογικού υλικού για την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης ολοκληρώθηκαν στο Θεραπευτήριο Ογκολογικών Νοσημάτων «Άγιος Σάββας», στο εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας της Ανωτάτης Γεωπονικής Σχολής Αθηνών και στα εργαστήρια της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικής (ΣΕΜΦΕ) του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (ΕΜΠ).

Από την πλειάδα των φαινομένων που πραγματεύεται η Αναπτυξιακή Βιολογία, αυτό της αναγέννησης του άκρου των προνυμφών αμφιβίων αναδεικνύει θεαματικά τις μορφογενετικές διεργασίες που ευοδώνουν τη διάπλαση μιας πολύπλοκης σωματικής δομής (του άκρου). Αλλά η συνιστώσα της μορφογένεσης που αποτέλεσε το ειδικό αντικείμενο διερεύνησης στην παρούσα εργασία είναι αυτή της χάραξης σχεδίου (*pattern formation*) επειδή επιδέχεται ποικίλες προσεγγίσεις από ετερόκλητα μοντέλα. Κάποια από αυτά αναδεικνύονται επιτυχέστερα άλλων, στο μέτρο που επισημαίνουν και αναλύουν το τοπολογικό υπόβαθρο των βιολογικών αλληλεπιδράσεων που πραγματεύονται. Ο σκοπός του παρόντος πονήματος ήταν να συμβάλει στη γεωμετρική και τοπολογική προσέγγιση της αλληλεπίδρασης των κυτταρικών επιφανειών στη μικρομετρική κλίμακα

διαστάσεων που επισκοπεί η συμβατική φωτονική μικροσκοπία. Το *in vivo* σύστημα μελέτης που επιλέχθηκε αφορά τις συναθροίσεις (*aggregations*) των αδιαφοροποίητων κυττάρων που οργανώνουν τις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) στις καταβολές των άκρων από προνύμφες του άνουρου αμφιβίου *Rana temporaria*, στα πλαίσια της αναγέννησής τους. Το *in vitro* σύστημα μελέτης που επιλέχθηκε αφορά τις συσσωρεύσεις (*accumulations*) των αδιαφοροποίητων κυττάρων που οργανώνουν τις μεσεγχυματικές συναθροίσεις (*MSC aggregates*) στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες ανθρώπινου ομφάλιου λώρου.

Η ιδιαιτερότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) έναντι των υπόλοιπων κατηγοριών βλαστικών κυττάρων, συνοψίζεται στην ιδιότητά τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, καθώς και στην ανοσορρυθμιστική *in vivo* ενεργότητά τους. Κατά συνέπεια, παρέχουν έρεισμα για την προοπτική εφαρμογής τους στην κλινική αναγεννητική Ιατρική και στη γονιδιακή θεραπεία. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα της περιορισμένης πολλαπλασιαστικής ικανότητας και λειτουργικότητας των βλαστικών κυττάρων που απομονώνονται από ιστούς του ενήλικου οργανισμού, καθώς και το ενδεχόμενο διατήρησης της «γονιδιακής μνήμης» του ιστού από τον οποίο προέρχονται, καθοδηγούν επιτακτικά την έρευνα στην αναζήτηση εναλλακτικών πόρων προμήθειας βλαστικών φαινότυπων. Η απόδοση της απομόνωσης των μεσεγχυματικών κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs) ήταν πλήρης (100%), τόσο με τη μέθοδο των ιστοκαλλιεργειών όσο και με της ενζυμικής πέψης. Έτσι, τα απομονωθέντα κύτταρα αφενός διατηρήθηκαν σε καλλιέργειες για χρονικά διάστημα μεγαλύτερα των τριών μηνών όταν χρησιμοποιήθηκε α-MEM με 20% FBS ή 20% CBS και αφετέρου επέδειξαν υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού ( $PDT = 82.48 \pm 14.5$  και  $PDT = 111,4 \pm 26.8$  hr αντίστοιχα), ενώ καταδείχθηκε η ακαταλληλότητα του εμπορικού σκευάσματος “Mesencult”.

**Αλφαβητικός Πίνακας Συντμήσεων**

(ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ, ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ, ΟΡΟΛΟΓΙΑ)

AEC: Apical Ectodermal Cap = Κορυφαίο Εκτοδερμικό Κάλυμμα  
 AER: Apical Ectodermal Ridge = Κορυφαίο Εκτοδερμικό Έπαρμα  
 ADH, Adh = αλκοολική αφυδρογονάση  
 AP-1 = μεταγραφικός παράγοντας κυτταρικής διαίρεσης  
 AP, APo: AnteroPosterior = προσθιοπίσθιος [εμβρυικός] άξονας ασυμμετρίας  
 CAMs: Cell Adhesion Molecules = μόρια κυτταρικής προσκόλλησης  
 CRABP: Cellular Retinoic Acid Binding Protein = κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που συνδέει το ρετινοϊκό οξύ  
 CRBP: Cellular Retinol Binding Protein = κυτταρική πρωτεΐνη που συνδέει τη ρετινόλη  
 DV: DorsoVentral = ραχιαιοκοιλιακός [εμβρυικός] άξονας ασυμμετρίας  
 Forelimb = πρόσθιο άκρο  
 Hindlimb = οπίσθιο άκρο  
 Limb bud = φυτόρο άκρου  
 FGF: Fibroblast Growth Factor = αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών  
 FGFRs: Fibroblast Growth Factor Receptor = υποδοχείς αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών  
 GATA = μεταγραφικός παράγοντας (καλείται έτσι από την αλληλουχία GATA που προσδένει)  
 Hox genes = ομοιωτικά γονίδια  
 HPCM: Hierarchical Polar Coordinate Model = ιεραρχικό μοντέλο πολικών συντεταγμένων  
 I.U.: international units = διεθνείς μονάδες  
 JNKs: Jun N-terminal kinases  
 MAPK: mitogen-activated protein kinase = πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα  
 Nkx 2.5 = Nk ομοιωτικό γονίδιο, NKx είναι το αντίστοιχο για τα θηλαστικά  
 PCM: Polar Coordinate Model = μοντέλο πολικών συντεταγμένων  
 PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor = υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια  
 PD: ProximoDistal = εγγύς-μακράν [εμβρυικός] άξονας ασυμμετρίας  
 RA: Retinoic Acid = ρετινοϊκό οξύ  
 Ral, RAL: Retinaldehyde = ρετινάλη (αλδεϋδική μορφή της Βιταμίνης-A)  
 Raldh: retinaldehyde dehydrogenase = ρετινολική αφυδρογονάση.  
 RARs[-α, -β, -γ]: Retinoic Acid Receptors[-α, -β, -γ] = υποδοχείς [-α, -β, -γ] του ρετινοϊκού οξέος (all-trans-RA, 9-cis-RA)  
 RAREs: Retinoic Acid Responsive Elements = πολυδεοξυριβονουκλεοτιδικές αλληλουχίες αποκρινόμενες στο ρετινοϊκό οξύ  
 RBP: Retinol Binding Protein = πρωτεΐνη του πλάσματος που συνδέει τη ρετινόλη  
 RBPr: Retinol Binding Protein receptor = υποδοχέας που συνδέει τη ρετινόλη  
 RoI, RoL: Retinol = ρετινόλη (αλκοολική μορφή της Βιταμίνης-A)  
 RXRs[-α, -β, -γ]: Retinoid "X" Receptors[-α, -β, -γ] = υποδοχείς "X" [-α, -β, -γ] του ρετινοϊκού οξέος (9-cis-RA)  
**Vit-A:** Vitamin-A = Βιταμίνη-A  
 ZPA: Zone of Polarizing Activity = ζώνη πολωτικής ενεργότητας-ZΠΕ.  
 TH: Thyroid Hormone = θυρεοειδική ορμόνη  
 TR: TH-Receptor = Υποδοχέας θυρεοειδικής ορμόνης  
 WE= Wound Epidermis = Τραυματικό Επιθήλιο  
 ENU μεταλλαγές = μεταλλαγές που προκαλούνται από το μεταλλαξογόνο παράγοντα n-ethyl-N-nitroso-urea  
 EPA: Enviromental Protection Agency  
 lacZ = γονίδιο μεταβολισμού λακτόζης  
 MEF: Myocyte Enhancer Factor = μεταγραφικοί παράγοντες μυοκυττάρων  
 VAD: Vascular Dementia

ΚΝΣ = Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

B cells: B Lymphocytes

BSA: Bovine Serum Albumin

CBS: Cord Blood Serum

CFU-F: Colony-Forming Units Factor

CPD: Citrate Phosphate Dextrose

DCs: Dendritic Cells

pDC: Plasmacytoid Dendritic Cells

DMSO: Dimethylsulfoxide

dH2O: Demineralized Water

DNA: Deoxyribonucleic Acid

DNase: Deoxyribonuclease

EAE: Experimental Allergic Encephalitis

EBSS: Earl's Balanced Salt Solution

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

EGF: Epidermal Growth Factor

FBS: Foetal Bovine Serum

FCS: Foetal Calf Serum

FITC: Fluresceine Isothiocyanate

FGF-2: Basic Fibroblast Growth Factor-2

GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

GvHD: Graft versus Host Disease

HLA: Human Leukocyte Antigen

HSC: Haematopoietic Stem Cells

IFN-γ: Interferon-γ

IGF: Insulin-like Growth Factor

IL: Interleukin

iPSC: Induced Pluripotent Stem Cells

ISCT: International Society of Cell Therapy

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

MCM: Mesencult Complete Medium

α-MEM: Eagle's alpha Modified Minimum Essential Medium

MHC: Major Histocompatibility Complex

MNC: Mononucleated Cells

MSC: Mesenchymal Stem Cells

UC: Umbilical Cord

WJ: Wharton's Jelly MSC

P-I: Primoculture of isolation method-I

P-II: Primoculture of isolation method-II

NK: Natural Killer Cells

NGF: Nerve Growth Factor

PBS: Phosphate Buffered Saline

B – λεμφοκύπαρα

Αλβουμίνη ορού βοός

Ορός ομφαλοπλακουντιακού αίματος

Παράγοντας Σχηματισμού

Μονάδων Αποικίας

Κιτρική φωσφορική δεξτρόζη

Δενδριτικά κύτταρα

Πλασματοκυτταροειδή-Δενδριτικά κύτταρα

Διμεθυλοσουλφοξείδιο

Απιονισμένο νερό

Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

Δεοξυριβονουκλεάση

Αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα

Ρυθμιστικό διάλυμα του Earl

(Αιθυλο-1,2-διάμινο)-τετραοξικό οξύ

Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

Εμβρυϊκός ορός βοός

Εμβρυϊκός ορός μόσχου

Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη

Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός

Παράγοντας-2

Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης

Νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή

Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο

Αιμοποιητικά βλαστικά κύπαρα

Ιντερφερόνη-γ

Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας

Ιντερλευκίνη

Επαγόμενα ποικιλοδύναμα βλαστικά κύτταρα

Διεθνής Οργανισμός Κυτταρικής Θεραπείας

Ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας

Πλήρες μέσο Mesencult

Βασικό Μέσο Ελαχιστοποιημένων Απαιτήσεων του Eagle, τροποποίηση-α

Μείζον Σύμπλεγμα

Ιστοσυμβατότητας

Μονοπύρρηνα κύτταρα

Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

Ομφάλιος Λώρος (Ο.Λ.)

πηκτή του Wharton

Πρωτογενείς καλλιέργειες μεθόδου

Απομόνωσης-I

Πρωτογενείς καλλιέργειες μεθόδου

Απομόνωσης-II

Κύτταρα φυσικοί φονείς

Αυξητικός Παράγοντας Νεύρων

Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα

|                                             |                                                   |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| PC-5: Phycoerythrine Cyanine-5              | Φυκοερυθρίνη/κυανίνη-5                            |
| PDT: Population Doubling Time               | Χρόνος διπλασιασμού των<br>(κυτταρικών) Πληθυσμών |
| PE: Phycoerythrine                          | Φυκοερυθρίνη                                      |
| SDF-1: Stromal Cell-Derived Factor -1       | Παράγοντας-1, κυττάρων στρώματος                  |
| TNF: Tumor Necrosis Factor                  | Παράγοντας νέκρωσης όγκων                         |
| T cells: T Lymphocytes                      | T-λεμφοκύτταρα λεμφοκύτταρα                       |
| CTL: Cytotoxic T Lymphocytes                | Κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα                        |
| TH2: T-Helper 2                             | T2-Βοηθητικά λεμφοκύτταρα                         |
| Treg: T Regulatory Lymphocytes              | T-Ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα                         |
| TGF-β1: Transforming Growth<br>Factor-β1    | Μεταμορφωτικός αυξητικός<br>παράγοντας-β1         |
| TLR: Toll-Like Receptors                    | Toll-Like Υποδοχείς                               |
| VEGF: Vascular Endothelial<br>Growth Factor | Αγγειακός ενδοθηλιακός<br>αυξητικός Παράγοντας    |

**ΕΙΚΟΝΕΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ-I:**

**[Εικόνα “ΧΧ”. “ΖΖ”.]**: αποκωδικοποίηση συμβολισμών αποκλειστικά για τις οκτώ (8) Εικόνες που παρατίθενται στην Ενότητα-I του κειμένου της Διπλωματικής Εργασίας.

“ΧΧ”: υποδηλώνει με κεφαλαίο λατινικό χαρακτήρα τον αύξοντα αριθμό της Ενότητας όπου ανήκει η δεδομένη εικόνα.

“ΖΖ”: υποδηλώνει για την αντίστοιχη εικόνα με λατινικό αλφαριθμητικό συμβολισμό, τον αύξοντα αριθμό της σειράς που καταλαμβάνει στην αλληλουχία εικόνων του συνολικού κειμένου της Ενότητας-I.

**ΕΙΚΟΝΕΣ ΕΝΟΤΗΤΩΝ-II / -III / -IV / -V / -VI / -VII:**

**[Εικόνα “ΧΧ”. “ΥΥ”. “ΖΖ”.]**: αποκωδικοποίηση συμβολισμών για όλες τις Εικόνες που παρατίθενται στις υπόλοιπες Ενότητες (Ενότητες-II / -III / -IV / -V / -VI / -VII) στο σύνολο του κειμένου της Διπλωματικής Εργασίας.

“ΧΧ”: υποδηλώνει με κεφαλαίο λατινικό χαρακτήρα τον αύξοντα αριθμό της Ενότητας όπου ανήκει η δεδομένη εικόνα.

“ΥΥ”: υποδηλώνει με λατινικό αλφαριθμητικό σύμβολο τον αύξοντα αριθμό του Κεφαλαίου όπου υπάγεται η αντίστοιχη εικόνα.

“ΖΖ”: υποδηλώνει με λατινικό αλφαριθμητικό σύμβολο τον αύξοντα αριθμό της Παραγράφου, ή Υποπαραγράφου, ή άλλης τάξης υποδιαίρεσης του συνολικού κειμένου, όπου υπάγεται η αντίστοιχη εικόνα.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ –ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

### A-ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**ΕΝΟΤΗΤΑ-Ι.:** Τοπολογικές ιδιότητες *in vitro* κυτταρικών συστημάτων: Οι διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (UC-MSCs)

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ-1: ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

I-1.1. Βλαστικά Κύτταρα – Ορισμός

I-1.2. Κατηγοριοποίηση των Βλαστικών Κυττάρων

I-1.2.1. Κατηγοριοποίηση βάσει δυναμικότητας διαφοροποίησης

I-1.2.1.a. Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

I-1.2.1.b. Ποικιλοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

I-1.2.1.c. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

I-1.2.1.d. Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

I-1.2.1.e. Μονοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

I-1.2.1.f. Πρόδρομα ή Προγονικά Κύτταρα

I-1.2.2. Κατηγοριοποίηση βάσει προέλευσης

I-1.2.2.a. Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα

I-1.2.2.b. Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα

I-1.2.2.c. Βλαστικά Κύτταρα Ιστών Ενηλίκων

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ-2: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

I-2.1. Από τους «Ινοβλάστες» στα «Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα»

I-2.2. Ορισμός - Μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

I-2.3. Ιδιότητες

I-2.3.1. Αυτοανανέωση - Διαφοροποίηση

I-2.3.2. Διαφοροποίηση των Βλαστικών Κυττάρων

I-2.3.2.a. Υπερδιαφοροποίηση

I-2.3.2.b. Κυτταρική Σύντηξη

I-2.3.2.c. Τροφική δράση των Βλαστικών Κυττάρων

I-2.3.2.d. Αποδιαφοροποίηση - Επαναδιαφοροποίηση – Επαναπρογραμματισμός

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ-3: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

I-3.1. Κλινικές εφαρμογές: από την πρώτη μεταμόσχευση στις προοπτικές του μέλλοντος

I-3.1.1. Βλαστικά Κύτταρα: ιστορική ανασκόπηση πενήντα χρόνων

I-3.1.2. Το παρόν των Βλαστικών Κυττάρων

I-3.1.3. Μελλοντικές εφαρμογές των Βλαστικών Κυττάρων

I-3.2. Περιορισμοί στη χρήση των Βλαστικών Κυττάρων

I-3.3. Αντιμετώπιση των προβλημάτων στην «πηγή» τους

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ-4: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

I-4.1. Σκοπός της μελέτης: Τα Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα του Ομφάλιου Λώρου

I-4.2. Ο ομφάλιος λώρος ως πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων: πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

**A-ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

**ΕΝΟΤΗΤΑ-II.: Τοπολογικές ιδιότητες *in vivo* κυτταρικών συστημάτων: Οι μεσεγχυματικές συμπακνώσεις (*mesenchymal condensations*) στις καταβολές των άκρων από προνύμφες άνιων αμφιβίων**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-1<sup>ο</sup>: Βασικές γνώσεις της οντογένεσης του είδους *Rana temporaria***

II-1.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ: *Rana temporaria*

II-1.2. Εμβρυική ανάπτυξη αμφιβίων

II-1.2.a. Στάδιο βλαστίδιου (*blastula*)

II-1.2.b. Γαστριδίωση (*gastrulation*)

II-1.2.c. Νευριδίωση (*neurulation*)

II-1.2.d. Στάδιο ουραίου φύτρου (*tailbud stage-17*)

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-2<sup>ο</sup>: Ειδικές γνώσεις ανατομίας και οντογένεσης του είδους *Rana temporaria***

II-2.1. Το μυοσκελετικό σύστημα των άκρων στα αμφίβια

II-2.1.a. Το μυϊκό σύστημα των άκρων στα αμφίβια

II-2.1.b. Το σκελετικό σύστημα των άκρων στα αμφίβια

II-2.2. Ο Χόνδρος

II-2.3. Ο υαλώδης χόνδρος

II-2.4. Η οστεογένεση

II-2.4.a. Υμενογενής οστεογένεση

II-2.4.b. Χονδρογενής οστεογένεση

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-3<sup>ο</sup>: Παραλληλισμοί της αναγέννησης με τη φυλογένεση και με την οντογένεση**

II-3.1. Ο ΠΑΡΑΛΛΗΛΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗΣ

II-3.2. Ο ΠΑΡΑΛΛΗΛΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗΣ

II-3.2.1. Οι μορφογενετικές αλληλεπιδράσεις που είναι συσχετισμένες με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

II-3.2.2. Οι μορφογενετικές αλληλεπιδράσεις που είναι συσχετισμένες με τον κυτταρικό φαινότυπο

II-3.2.3. Πορίσματα

II-3.3. Δευτερογενή αναπτυξιακά φαινόμενα - Αναγέννηση

II-3.3.1. Παρατηρήσεις επί της αναγέννησης των άκρων στα αμφίβια

II-3.3.1.a. Η ΑΥΤΟΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΟΛΛΟΥΜΕΝΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΑΚΡΩΤΗΡΙΑΣΜΟΥ

II-3.3.2. Παρατηρήσεις επί της μορφογένεσης που υπεισέρχεται στην αναγέννηση των άκρων στα αμφίβια

II-3.3.2.a. Ο ΑΝΤΙΚΤΥΠΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ ΣΤΗ ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΙΕΥΘΕΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΞΟΝΩΝ ΑΣΥΜΜΕΤΡΙΑΣ

II-3.3.2.b. Ο ΣΤΟΧΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ

II-3.3.2.c. Η ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΜΟΡΦΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΚΑΝΟΝΑ ΤΟΥ ΑΚΡΑΙΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ (“distal transformation rule”, “distalization rule”)

II-3.3.2.d. Η «ΕΤΕΡΟΜΟΡΦΙΚΗ ΙΣΟΔΥΝΑΜΙΑ» ΤΩΝ ΔΥΟ ΤΥΠΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-4<sup>ο</sup>: Μορφογενετικοί μηχανισμοί**

II-4.1. Χάραξη σχεδίου (ή Σχέδιο Ρύθμισης, *pattern formation*)

II-4.2. Η μεταβίβαση της τοπικής πληροφορίας



- II-4.3. Η εισήγηση της έννοιας του μορφογενετικού πεδίου
- II-4.4. Η αποδιαφοροποίηση αντιπροσωπεύει εξελιγμένο μηχανισμό αυτοοργάνωσης του μορφογενετικού πεδίου
- II-4.5. Στην αυτοοργάνωση του μορφογενετικού πεδίου συμβάλλουν τα ομοιωτικά γονίδια
- II-4.5.a. Δράση Ομοιωτικών Γονιδίων
  - II-4.5.b. HOX Γονίδια και Ρετινοειδή
  - II-4.5.c. HOX Γονίδια και Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος
- II-4.6. Τα μοντέλα μορφογένεσης
- II-4.6.1. Αναπαράσταση του μορφογενετικού πεδίου με τα Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων
  - II-4.6.2. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων
    - II-4.6.2.a. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων: Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΚΡΟΥ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ
    - II-4.6.2.b. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων: Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΚΡΟΥ ΤΩΝ ΑΜΦΙΒΙΩΝ
  - II-4.6.3. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων - [Boundary Model, (Πρότυπο Ορίων) και Bootstrap Model]
  - II-4.6.4. Μοντέλα πολικών συντεταγμένων: Polar Coordinate Model (PCM) και Hierarchical Polar Coordinate Model (HPCM)

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ-5<sup>ο</sup>: Θεωρία της πληροφορίας θέσης (ή τοπικής πληροφορίας, *Positional Information*)

- II-5.1. Η *in vivo* εκδοχή της πληροφορίας θέσης.
- II-5.2. Η *in vitro* εκδοχή της πληροφορίας θέσης.
- II-5.2.a. Πληροφορία θέσης και μακροσκοπική εικόνα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου
  - II-5.2.b. Η ECM συμπληρώνει τη μακροσκοπική εικόνα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου, χωρίς να καταργεί το καθεστώς των διακυτταρικών επαφών και κατ'επέκταση δεν αναιρεί την έννοια της πληροφορίας θέσης
- II-5.3. Το πεδίο βαρύτητας διαμορφώνει στις διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες μια *in vitro* εκδοχή τοπικής πληροφορίας, με τη μορφή μιας αλληλουχίας από διακεκριμένα στάδια προσαρμογής του μεσεγχυματικού φαινότυπου.
- II-5.3.a. Η συμβολή της *in vitro* πληροφορίας θέσης με τη μορφή της τοπογραφικής ετερογένειας, στην αναγνώριση των διακριτών σταδίων προσαρμογής του μεσεγχυματικού φαινότυπου.
  - II-5.3.b. Ο ημιποσοτικός χαρακτηρισμός των μεταβατικών σταδίων προσαρμογής του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου
- II-5.4. Η διδιάστατη πόλωση (*planar polarity*) του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου συντίθεται από δυο συνιστώσες.
- II-5.4.1. Η «κατακόρυφη» συνιστώσα αντιστοιχεί στην «κορυφο-βασική μορφολογική πόλωση» (“*apical-basal polarity*”) και η «οριζόντια» συνιστώσα συνοψίζει την «ομοεπίπεδη πόλωση» (“*planar polarity*”) του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου
  - II-5.4.2. Η αλληλεξάρτηση μεταξύ της συνολικής μορφολογικής πόλωσης (“*apical-basal polarity*” και “*planar polarity*”) του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου και της κυτοκίνησης-B (“*oriented cytokinesis*”).
  - II-5.4.3. Η *in vitro* βιογένεση της «μεσεγχυματικής ακμής»
    - II-5.4.3.a. Η μορφογενετική εξειδίκευση της «μεσεγχυματικής ακμής»
    - II-5.4.3.b. Ο μορφογενετικός αντίκτυπος της «μεσεγχυματικής ακμής»
- II-5.5. Η ποικιλότητα του προτύπου συνάθροισης (*MSC aggregation pattern*) των μεσεγχυματικών κυττάρων στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειές τους αντανακλά την τοπολογική ιδιότητα του ανισοτροπισμού (“*anisotropy*”) της κελλωτής διάταξης

II-5.5.1. Οι διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων αποτυπώνουν στα μοτίβα συνάθροισης (*aggregation patterns*) μια τοπογραφική διαβάθμιση για ποικίλους μορφομετρικούς χαρακτήρες, η οποία είναι συνάρτηση της απόστασης από το ιστοτεμάχιο.

II-5.5.2. Ο παραλληλισμός της τοπολογίας μεταξύ των μεσεγχυματικών συμπυκνώσεων στα φύτρα των άκρων από προνύμφες αμφιβίων (*mesenchymal condensations*) και των μεσεγχυματικών συναθροίσεων (*MSC aggregates*).

II-5.5.3. Δυο κλάσεις αντιπαραδειγμάτων που αντιβαίνουν στη θερμοδυναμική έκβαση της κυτταρικής σχηματοποίησης και συνηγορούν υπέρ του τοπολογικού υπόβαθρου της

II-5.5.3.a. Το αντιπαραδείγμα για την «αυθόρμητη» κυτταρική σχηματοποίηση

II-5.5.3.b. Το αντιπαραδείγμα για την «αυθόρμητη» κυτταρική συστοίχιση με τη μορφή της αντιπαραβολής μεταξύ των τοπολογικών και των γεωμετρικών μετασχηματισμών

II-5.6. Οι συνιστώσες του ανισοτροπισμού των κελλωτών διατάξεων συγκλίνουν και αφομοιώνονται από την κυτοκίνηση-B

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ-6<sup>ο</sup>: Θεωρία των «κελλωτών στερεών» (*Cellular Solids Theory*)

II-6.1. Εισαγωγή στην κοινή γεωμετρία του επιθηλιακού και του μεσεγχυματικού φαινότυπου

II-6.1.a. Η μορφογένεση του *in vivo* επιθηλιακού φαινότυπου

II-6.1.b. Η μορφογένεση του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου

II-6.2. Η ημιποσοτική εκδοχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ μονήρους / ατομικής κυτταρικής γεωμετρίας (*polygonal cell-packing pattern*) και ιστικής μορφογένεσης (*planar geometry pattern*).

II-6.2.a. Η διδιάστατη πόλωση (*planar polarity*) του *in vivo* επιθηλιακού φαινότυπου

II-6.2.b. Τα ειδοειδικά και ιστοειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά δεν υποβαθμίζουν τη δυνατότητα της υπολογιστικής αναπαράστασης της διδιάστατης πόλωσης (*planar polarity*) του *in vivo* επιθηλιακού φαινότυπου

II-6.3. Εισαγωγή στην *in vivo* και *in vitro* κυτταρική τοπολογία

II-6.3.1. Η συμβολή της κυτοκίνησης-B στη μορφογένεση του επιθηλιοειδούς χαρακτήρα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου

II-6.3.1.a. Οι κυτταρικές συναθροίσεις επισωρεύουν το μορφογόνο αντίκτυπο της κυτταρικής σχηματοποίησης (*cell shape plasticity*) και τον αποτυπώνουν σε διδιάστατα πρότυπα ή μοτίβα ποικιλότητας (*aggregation patterns*).

II-6.3.1.b. Η εξάρτηση της κυτταροδιαίρεσης από την τοπική κυτταρική γεωμετρία

II-6.3.1.c. Κυτταροδιαίρεση χωρίς εξάρτηση από την τοπική κυτταρική γεωμετρία

II-6.3.2. Η συμβολή του οντογενετικού καθορισμού (*determination*) στη μορφογένεση του επιθηλιοειδούς χαρακτήρα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου

II-6.3.2.a. Ορισμοί.

II-6.3.2.b. Συμπεράσματα.

II-6.4. Οι τέσσερις κλάσεις μοντέλων μέγιστης εντροπίας που αξιοποιούνται για την τοπολογική προσέγγιση των *in vivo* επιθηλίων.

II-6.4.1. Dirichlet Models (DM):

II-6.4.2. Cellular Potts Model (CPM)

II-6.4.3. Subcellular Element Models (SEM)

II-6.4.4. Finite-Element Models (FEM)

II-6.4.5. Σύνοψη συμπερασμάτων από τις μεθόδους μέγιστης εντροπίας (MEM / SIM) (Maximum Entropy Methods / Statistical Inference Methods)

II-6.4.6. Οι εγγενείς περιορισμοί των μοντέλων μέγιστης εντροπίας (MEM / SIM)

II-6.5. Εισαγωγή στην Τοπολογία των «Κελλωτών Στερεών» (*“Cellular Solids” Topology*)

II-6.5.1. Ορισμοί

II-6.5.2. Οι δύο τύποι κελλωτών στερεών

II-6.5.2.a. Η τοπολογική παράμετρος της «διαστατικότητας» (*“dimensionality”*):

- II-6.5.2.b. Η τοπολογική παράμετρος της «συνδεσιμότητας» (“connectivity”)
- II-6.5.2.c. Προοπτικές που εγείρει η γεωμετρική θεώρηση των κυψελωτών στερεών
- II-6.5.3. Διαστατικότητα και ισοτροπισμός / ανισοτροπισμός (“isotropy” / “anisotropy”) των μη γεωμετρικών (των τοπολογικών) ιδιοτήτων του κελλωτού στερεού
- II-6.5.3.a. Η αβιοτική εκδοχή κελλωτού στερεού (“cellular solid”)
- II-6.5.3.b. Η συμμετοχή της διεργασίας σχηματοποίησης στη συσσώρευση των κελλιών του κελλωτού στερεού
- II-6.5.3.c. Η βιοτική εκδοχή του κελλωτού στερεού (“cellular solid”)
- II-6.5.3.d. Η τεχνητή εκδοχή του κελλωτού στερεού (“cellular solid”)
- II-6.5.4. Ανάλυση αντιπροσωπευτικών περιπτώσεων κελλωτών στερεών
- II-6.5.4.a. «Κηρήθρες» (“honeycombs”)
- II-6.5.4.b. «Αφροί» (“foams”) - Η δομή του σπογγώδους οστού
- II-6.5.5. Η αμιγώς γεωμετρική σκοπιά της «κελλωτής διάταξης»
- II-6.5.5.a. «Βέλτιστα αποδοτική συσσώρευση»
- II-6.5.5.b. «Επαρκώς αποδοτική συσσώρευση»
- II-6.5.6. Νόμος Euler (“Euler’s law”) - Η αρχιτεκτονική των κελλωτών στερεών διέπεται από οικονομία
- II-6.5.7. Προέλευση και Επακόλουθα της Διασποράς του Μεγέθους Κελλίου
- II-6.5.8. Νόμος Aboan-Weaire (“Aboan-Weaire’s law”)
- II-6.5.9. Ο «κανόνας του Lewis» (“Lewis’s rule”)
- II-6.5.9.a. Βασικές γνώσεις
- II-6.5.9.b. Ο ανισοτροπισμός των κελλωτών δικτύων αντικατοπτρίζει το μορφογόνο αντίκτυπο των τοπολογικών νόμων
- II-6.5.9.c. Η επιθηλιακή οργάνωση των ζωικών και φυτικών ιστών παρέχει πληροφόρηση για την *in vivo* μορφογένεση του ανισοτροπισμού των κελλωτών δικτύων
- II-6.5.9.d. Οι μεσεγχυματικές συναθροίσεις (“MSC aggregates”) στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες παρέχουν πληροφόρηση για την *in vitro* μορφογένεση του ανισοτροπισμού των κελλωτών δικτύων
- II-6.5.10. Η *in vitro* προσαρμοστική αλληλεπίδραση μεταξύ της «τερματικής» ατρακτοειδούς μορφογένεσης και της μεσεγχυματικής συνάθροισης (“MSC aggregation”), παρέχει ένα υπόδειγμα παραλληλισμού προς την τοπολογική αλληλεξάρτηση μεταξύ της πλαστικότητας των κυτταρικών σχημάτων (*cell shape plasticity*), της διακύμανσης των διαστάσεών τους (*domain size polydispersity*) και της συνδεσιμότητάς τους, με στατιστικούς όρους (*neighbor number statistics*)

## B-ΜΕΡΟΣ: ΣΥΣΚΕΥΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΥΛΙΚΑ

### ΕΝΟΤΗΤΑ-III: Συσκευές - Αντιδραστήρια - Υλικά για ανθρώπινο βιολογικό υλικό

- III.A.1. Έλεγχος των τεχνικών (ή πρωτόκολλων) απομόνωσης και καλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs)
- III.A.2. Συσκευές για τα πειράματα σε ανθρώπινο βιολογικό υλικό
- III.B.1. Συλλογή και μεταφορά ανθρώπινου βιολογικού υλικού
- III.B.1.1. Υλικά
- III.B.1.2. Συλλογή ομφάλιου λώρου για απομόνωση κυττάρων
- III.B.1.2.a. Συλλογή βιολογικού υλικού
  - III.B.1.2.b. Μεταφορά βιολογικού υλικού στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος
- III.B.2. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο
- III.B.2.1. Υλικά
- III.B.2.2. Παρασκευή διαλυμάτων

### III.B.2.3. Προετοιμασία ομφάλιου λώρου για την απομόνωση κυττάρων

#### III.B.2.3.A. Μέθοδος απομόνωσης με ενζυμική πέψη

#### III.B.2.3.B. Μέθοδος απομόνωσης με ιστοκαλλιέργειες

### III.B.3. Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας

#### III.B.3.1. Υλικά

##### III.B.3.2.a. Αυτόματη μέτρηση

##### III.B.3.2.b. Μέτρηση με οπτικό μικροσκόπιο

### III.B.4. Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων ομφάλιου λώρου

#### III.B.4.1. Υλικά

##### III.B.4.2. Παρασκευή διαλυμάτων

##### III.B.4.3. Κυτταροκαλλιέργεια

##### III.B.4.4. Αποκόλληση κυττάρων και ανακαλλιέργεια (Passage)

### III.B.5. Υπολογισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων

## **B-ΜΕΡΟΣ: ΣΥΣΚΕΥΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΥΛΙΚΑ**

### **ΕΝΟΤΗΤΑ-IV: Συσκευές - Αντιδραστήρια - Υλικά για μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό**

#### IV.A. Πειράματα σε μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό

##### IV.A.1. Ομάδες των πειραματοζώων

##### IV.A.2. Συσκευές για τα πειράματα σε μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό

##### IV.A.3. Αντιδραστήρια – Διαλύματα για την ιστοχημεία σε μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό

##### IV.A.4. Κλασσική ιστολογική τεχνική

###### IV.A.4.1. Μονιμοποίηση

###### IV.A.4.2. Αφαλάτωση

###### IV.A.4.3. Πλύσιμο και αφυδάτωση ιστού

###### IV.A.4.4. Διαύγαση ιστού

###### IV.A.4.5. Εγκλεισμός ιστού σε παραφίνη (*embedding*)

###### IV.A.4.6. Τομή του ιστού

###### IV.A.4.7. Διαδικασία ιστοχημικής χρώσης

###### IV.A.4.7.a. Ενυδάτωση των τομών:

###### IV.A.4.7.b. Χρώση των τομών:

## **Γ-ΜΕΡΟΣ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **ΕΝΟΤΗΤΑ-V: Αποτελέσματα για το *in vitro* πειραματικό σύστημα**

#### V.1. Σύγκριση των αποτελεσμάτων απομόνωσης και καλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και από τον ομφάλιο λώρο

##### V.1.1. Σύνοψη αποτελεσμάτων για τα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος

##### V.1.2. Σύνοψη αποτελεσμάτων για τα MSCs του ομφάλιου λώρου

#### V.2. Καλλιέργεια των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

##### V.2.1. Συλλογή ομφάλιου λώρου

##### V.2.2. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

###### V.2.2.a. Απομόνωση MSCs με ενζυμική πέψη του ομφάλιου λώρου

###### V.2.2.b. Απομόνωση MSCs με ιστοκαλλιέργειες του ομφάλιου λώρου

##### V.2.3. Σύγκριση των τεχνικών απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο

###### V.2.3. a. Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΡΙΝ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

###### V.2.3.b. Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

##### V.2.4. Επιλογή θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφάλιου λώρου

###### V.2.4.a. Ο αντίκτυπος της Επιλογής θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφάλιου λώρου, στα κινητικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειάς τους.

V.2.4.b. Ο αντίκτυπος της Επιλογής θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφάλιου λώρου, στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειάς τους.

V.2.4.c Σύνοψη αποτελεσμάτων για τα MSCs του ομφάλιου λώρου

#### **Δ-ΜΕΡΟΣ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

##### **ΕΝΟΤΗΤΑ-VI: Συζήτηση-Συμπεράσματα για το *in vitro* πειραματικό σύστημα**

VI.1. Συνοπτικά συμπεράσματα

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

VI.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφάλιου λώρου

VI.2.2. Σχεδιασμός, υλοποίηση και επικύρωση, πρωτόκολλου καλλιέργειας Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφάλιου λώρου

VI.2.2.a. Σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης με κριτήριο τα κινητικά χαρακτηριστικά της κυτταροκαλλιέργειας.

VI.2.2.b. Σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης με κριτήριο τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της κυτταροκαλλιέργειας.

#### **Δ-ΜΕΡΟΣ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

##### **ΕΝΟΤΗΤΑ-VII: Συζήτηση-Συμπεράσματα για το *in vivo* πειραματικό σύστημα**

VII.1. Η συμβολή της κυτταρικής προσκόλλησης στη χάραξη σχεδίου (*pattern formation*)

VII.2. Η συμβολή της διαβάθμισης του καθορισμού ("*determination gradient*") για τους αδιαφοροποίητους φαινότυπους των βλαστηματικών κυττάρων, στη χάραξη σχεδίου ("*pattern formation*")

VII.3. Η συμβολή του διανυσματικού χαρακτήρα της «καθοδηγούμενης κυτταροδιαίρεσης» ("*oriented cytokinesis*") στην αναπαραγωγή / διασπορά της τοπικής πληροφορίας κατά τη χάραξη σχεδίου ("*pattern formation*") στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία

VII.4. Η συμβολή του διανυσματικού χαρακτήρα της «καθοδηγούμενης κυτταροδιαίρεσης» ("*oriented cytokinesis*") στην επαναδιαφοροποίηση / επανεξειδίκευση της τοπικής πληροφορίας κατά τη χάραξη σχεδίου ("*pattern formation*") στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία

VII.5. Η συμβολή της τοπολογίας στην αναπαραγωγή και επανεξειδίκευση της τοπικής πληροφορίας κατά τη χάραξη σχεδίου ("*pattern formation*") στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία

#### **Ε-ΜΕΡΟΣ: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-I**

Βιβλιογραφία



**A-ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

**ΕΝΟΤΗΤΑ-Ι.: Τοπολογικές ιδιότητες *in vitro* κυτταρικών συστημάτων: Οι διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (UC-MSCs)**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-1: ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ - ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ****1. Βλαστικά Κύτταρα – Ορισμός**

Τα «Βλαστικά Κύτταρα» (**stem cells**) συνιστούν ειδική κατηγορία κυττάρων που έχει προσελκύσει το επισταμένο ενδιαφέρον των σύγχρονων βιολογικών και ιατρικών ερευνών τα τελευταία είκοσι τουλάχιστον χρόνια, επειδή σε αντίθεση με την κατάσταση *τερματικής διαφοροποίησης* που αφορά τα περισσότερα από τα σωματικά κύτταρα του οργανισμού (π.χ. ηπατοκύτταρα), διατηρούν αξιοσημείωτες δυνατότητες πολλαπλασιασμού, καθώς και διαφοροποίησης σε ποικίλους φαινότυπους. Ωστόσο η επακριβής χρήση του όρου «βλαστικός» παραμένει επισφαλής σε πολλές περιπτώσεις, εξαιτίας της συγκεχυμένης εικόνας που έχει μέχρι σήμερα αποκομίσει η διεθνής βιβλιογραφία για την οντογενετική ταυτότητα των κυττάρων αυτών. Πάντως, έχει πλέον αποσαφηνιστεί ότι θα καθορίζονται ως «βλαστικά» εκείνα τα κύτταρα που εκδηλώνουν ικανότητα αυτοανανέωσης, καθώς και δυνατότητα διαφοροποίησης σε κάποιο/-α από τα περίπου 200 διαφορετικά είδη κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού. Ενώ οι παραδοσιακές κλινικές εφαρμογές τους είχαν περιοριστεί στη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και στη χρήση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε ορισμένες αυτοάνοσες παθήσεις, η εντατική έρευνα της βιολογίας τους φιλοδοξεί στην επέκταση των κλινικών μελετών στα πεδία της αποκατάστασης και της αναγέννησης ιστών, καθώς και στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση ποικίλων γενετικών και μεταβολικών νοσημάτων.

**2. Κατηγοριοποίηση των Βλαστικών Κυττάρων**

Η κατηγοριοποίηση των βλαστικών κυττάρων γίνεται με δύο κριτήρια:

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

**2.1.Κατηγοριοποίηση βάσει δυναμικότητας (πλαστικότητας / εύρους) διαφοροποίησης:**

Σήμερα τείνει να επικρατήσει η κατάταξη των βλαστικών κυττάρων με βάση τη **δυναμικότητα (potency)** της διαφοροποίησης. Έτσι, η καθεστική ταξινόμηση των βλαστικών κυττάρων, περιλαμβάνει την εξής ονοματολογία (Smith A., 2006):

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

**2.1.1. Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα**

**Ολοδύναμο Βλαστικό Κύτταρο (totipotent stem cell)** είναι αυτό που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που συνθέτουν τον πολυκύτταρο οργανισμό, καθώς επίσης και σε εκείνους που υποστηρίζουν επιμέρους στάδια της εμβρυικής του ανάπτυξης. Τέτοιο κύτταρο –με την αυστηρότερη δυνατή έννοια του όρου- είναι το ζυγωτό (zygote), αφού μόνο αυτό πληροί όλα τα προαναφερθέντα κριτήρια. Κατά την ευόδωση της οντογένεσης (ontogeny) τα εμβρυικά κύτταρα χάνουν σταδιακά την πλήρη δυναμικότητα διαφοροποίησης (**ολοδυναμικότητα, totipotency**) και δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αναπτυξιακές οδούς που καταλήγουν σε όλο το φάσμα των προορισμών διαφοροποίησης που χαρακτηρίζει το κάθε είδος οργανισμού (species).

### 2.1.2. Ποικιλοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Ο όρος **ποικιλοδύναμα (pluripotent)** αποδίδεται στα βλαστικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν κύτταρα που ανήκουν σε οποιαδήποτε από τις τρεις εμβρυϊκές στοιβάδες : το **μεσόδερμα (mesoderm)**, το **εξώδερμα (ectoderm)**, ή το **ενδόδερμα (endoderm)**, αλλά όχι το **τροφεκτόδερμα (ή τροφοβλάστη, trophoblast)**. Επιπλέον μπορούν να δώσουν γένεση σε σωματικά και γαμετικά κύτταρα, χωρίς όμως να σχηματίζουν από μόνα τους, έμβρυο. Παράδειγμα αποτελούν τα **εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells)**, τα οποία απομονώνονται από την **εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM)** της **βλαστοκύστης (blastocyst)**. Συχνά ο όρος αποδίδεται λανθασμένα, σε κύτταρα που απομονώνονται από εμβρυικούς ή μετεμβρυικούς ιστούς χωρίς να πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις.

Πράγματι για να αποδειχθεί ο ποικιλοδύναμος φαινότυπος μιας κυτταρικής σειράς που μελετάται *in vitro* πρέπει τα κύτταρά της, αφού εμφυτευθούν στη βλαστοκύστη, να μπορούν να συμμετάσχουν στη δημιουργία ιστών και των τριών εμβρυικών στοιβάδων και κατά συνέπεια να εντοπίζονται κυτταρικοί τους απόγονοι σχεδόν σε όλους τους ιστούς του ολοκληρωμένου οργανισμού (Baker M., 2007; Smith K.P. et al., 2009). Ένας άλλος τρόπος για να αποδειχθεί αυτό το επίπεδο δυναμικότητας (**pluripotency**) είναι η υποδόρια χορήγησή τους σε ανοσοκατεσταλμένα πειραματόζωα, οπότε τα ποικιλοδύναμα κύτταρα προκαλούν την ανάπτυξη τερατώματος στο οποίο αντιπροσωπεύονται και οι τρεις εμβρυϊκές στοιβάδες.

### 2.1.3. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Τα **Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (multipotent stem cells)** είναι ίσως η πιο μελετημένη κατηγορία. Ο όρος της **πολυδυναμικότητας (multipotency)** αποδίδεται στο κύτταρο που μπορεί να απομονωθεί τόσο από το έμβρυο όσο και από τον ενήλικο οργανισμό και να διαφοροποιηθεί σε ποικίλους πληθυσμούς που ανήκουν συνήθως στον ίδιο ιστό. Παράδειγμα πολυδύναμου βλαστικού φαινότυπου αποτελούν τα **Αιμοποιητικά Βλαστικά Κύτταρα (Haematopoietic Stem Cells, HSCs)**. Απομονώνονται τόσο από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα, όσο και από το μυελό των οστών του ενήλικα, ενώ μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς του αίματος, δηλαδή τόσο σε κύτταρα της λεμφικής όσο και σε κύτταρα της μυελικής σειράς. Επίσης τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος δίνουν γένεση στην επιδερμίδα καθώς και στους θύλακες των τριχών. Είναι πιθανό κάποια πολυδύναμα κύτταρα να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πληθυσμούς και των τριών εμβρυικών στοιβάδων όμως αυτά, σε αντίθεση με τα ποικιλοδύναμα βλαστικά κύτταρα, δεν έχουν τη δυνατότητα να δώσουν γένεση σε γαμέτες αλλά μόνο σε σωματικά κύτταρα.

### 2.1.4. Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

**Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (oligopotent stem cells)** είναι όρος που δεν χρησιμοποιείται συχνά και αναφέρεται συνήθως σε κύτταρα που απομονώνονται κυρίως από τον ενήλικο οργανισμό, αλλά και από το έμβρυο. Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα εντοπίζονται στους περισσότερους ιστούς και όργανα όπως για παράδειγμα στο μυϊκό ιστό, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο εντερικό επιθήλιο ή στο θύλακα των τριχών. Στις περιοχές αυτές διατηρούνται σε αδιαφοροποίητη κατάσταση μέχρις ότου χρειαστεί ανάπλαση κατεστραμμένου τμήματος του ιστού, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε περίπτωση τραυματισμού. Μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα του ιστού στον οποίο εντοπίζονται και ο κύριος ρόλος τους είναι η διατήρηση μιας κυτταρικής εφεδρείας ικανής για ιστική αναγέννηση. Καθώς όμως πληθαίνουν οι αναφορές που επιβεβαιώνουν τα χαρακτηριστικά του πολυδύναμου φαινότυπου σε κύτταρα που απομονώνονται από ιστούς του ενήλικα, ο όρος της ολιγοδυναμικότητας (**oligopotency**) τείνει να εκλείψει (Fuchs E. et al., 2004; Morrison S.J. and Spradling A.C., 2008).

### 2.1.5. Μονοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

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



### 2.1.6. Πρόδρομα ή Προγονικά Κύτταρα

Αναφέρονται ως **πρόδρομα (precursor)** ή **προγονικά (progenitor)** τα μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα του εμβρύου και του ενήλικου οργανισμού. Είναι **δεσμευμένα (committed)** προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση και παρόλο που κατά τον πολλαπλασιασμό τους δίνουν γένεση σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα του ιστού στον οποίο ανήκουν, δε διαθέτουν την **ικανότητα αυτοανανέωσης** που χαρακτηρίζει το βλαστικό φαινότυπο. Παράδειγμα αποτελεί το **κοινό προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς (common myeloid progenitor)** από το οποίο προέρχονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια τα ουδετερόφιλα, δηλαδή όλα τα κύτταρα (κοκκιοκύτταρα) που αποτελούν τη μυελική σειρά του αίματος. Συχνά ο όρος «προγονικό» χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τα ολιγοδύναμα και / ή τα πολυδύναμα κύτταρα των ιστών, όπως για παράδειγμα τα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα, που εντοπίζονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα του ΚΝΣ (είναι δηλαδή ολιγοδύναμα). Για το λόγο αυτό αναφέρονται συχνά ως Νευρικά Προγονικά Κύτταρα, παρόλο που έχουν δυνατότητα αυτοανανέωσης. Επειδή οι μελέτες σε ανομοιογενείς πληθυσμούς, επιτείνουν τη σύγχυση, κρίνεται σκόπιμη η συνδυαστική χρήση και των δύο όρων, δηλαδή βλαστικό/προγονικό κύτταρο, για τη διασαύρωση των παρατηρήσεων. Το προγονικό κύτταρο είναι μερικώς διαφοροποιημένο και έχει μερικά μόνο κοινά χαρακτηριστικά με τα θυγατρικά του διαφοροποιημένα κύτταρα. Μπορεί μόνο να διαφοροποιηθεί και δεν αυτοανανεώνεται (Terese Winslow, Lydia Kibiuk, 2001).

## 2.2. Κατηγοριοποίηση βάσει προέλευσης

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

### 2.2.1. Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα (embryonic stem cells)

Με τον όρο αυτό περιγράφονται αποκλειστικά τα κύτταρα που απομονώνονται από την εσωτερική μάζα της βλαστοκύστης. Πρόκειται για ποικιλοδύναμα κύτταρα που μπορούν να αυτοανανεώνονται για αόριστο χρονικό διάστημα σε καλλιέργεια, χωρίς να διαφοροποιούνται. Διατηρούν τη διπλοειδία τους και σταθερό αριθμό χρωμοσωμάτων, υπό κατάλληλες προϋποθέσεις μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικούς πληθυσμούς και των τριών εμβρυικών στοιβάδων, δίνοντας τόσο σωματικά κύτταρα όσο και γαμέτες. Ο όρος Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα έχει συχνά χρησιμοποιηθεί λανθασμένα, για να χαρακτηρίσει κύτταρα απομονωμένα από άλλους εμβρυικούς ιστούς όπως για παράδειγμα από το αμνιακό επιθήλιο ή από το εμβρυικό ήπαρ. Ωστόσο παρόλο που κι αυτά προέρχονται από το έμβρυο, ο δόκιμος όρος περιγραφής τους είναι **εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (foetal)**. Παρόλο που εμβρυονικά κύτταρα ποντικού καλλιεργούνται με ευκολία από το 1981 (Evans M.J. and Kaufman M.H., 1981; Martin G.R., 1981), ανθρώπινα εμβρυονικά κύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν επιτυχώς για πρώτη φορά μόλις το 1998 (Thomson J.A. et al., 1998). Η κύρια δυσκολία έγκειται στη διατήρησή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ο μόνος τρόπος για να καλλιεργηθούν επιτυχώς τα εμβρυονικά κύτταρα είναι με τη χρήση **τροφικής στιβάδας (feeder layer)** από ινοβλάστες.

### 2.2.2. Εμβρυικά Βλαστικά Κύτταρα (foetal stem cells)

Εμβρυικά είναι τα βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από ιστούς και όργανα του εμβρύου. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο πλακούντας, το αμνιακό επιθήλιο, το αμνιακό υγρό και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα καθότι είναι όλα τους εμβρυικής προέλευσης. Από όλους αυτούς τους ιστούς έχουν κατά διαστήματα απομονωθεί βλαστικά κύτταρα που ως επί το πλείστον είναι πολυδύναμα. Για παράδειγμα από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα απομονώνονται τόσο αιμοποιητικά (Broxmeyer H.E. et al., 1989) όσο και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Erices A. et al., 2000). Νευρικά βλαστικά κύτταρα έχουν απομονωθεί από εγκεφάλους εμβρύων (Uchida N. et al., 2000) ενώ από το ήπαρ εμβρύων απομονώθηκαν πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα

αλλά και πρόδρομα ηπατοκύτταρα (McCune J.M. et al., 1988; Namikawa R. et al., 1990). Στο αμνιακό επιθήλιο εντοπίστηκαν κύτταρα ικανά να διαφοροποιηθούν σε νευρικά (McLaughlin D. et al., 2006) και στο αμνιακό υγρό περιγράφηκαν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Tsai M.S. et al., 2004).

### **2.2.3. Βλαστικά Κύτταρα Ιστών Ενηλίκων (*stem cells*)**

Τα τελευταία χρόνια εντοπίζονται βλαστικά κύτταρα και στους ιστούς των ενηλίκων. Η ύπαρξη αιμοποιητικών κυττάρων στον μυελό των οστών είναι γνωστή από το 1961 (Becker A.J. et al., 1963; Till J.E. and McCulloch E.A., 1961), ενώ μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν από την ίδια πηγή το 1966 (Friedenstein A.J. et al., 1970; Friedenstein A.J. et al., 1968; Friedenstein A.J. et al., 1966). Ωστόσο, η ύπαρξη βλαστικών κυττάρων στο ήπαρ, στο μυοκάρδιο, στους σκελετικούς μύες, στο κεντρικό νευρικό σύστημα ακόμα και στο περιφερικό αίμα διαπιστώθηκαν προς τα τέλη του 20ου αιώνα (Fuchs E. et al., 2004; Morrison S.J. and Spradling A.C., 2008). Η δυναμικότητα (**potency**) αυτών των βλαστικών κυττάρων διαφέρει ανάλογα με την πηγή από την οποία απομονώνονται. Η άποψη που τείνει να επικρατήσει είναι ότι σε όλους τους ιστούς υπάρχει μια «αποθήκη» βλαστικών κυττάρων η οποία σε περίπτωση τραυματισμού ή καταστροφής του συγκεκριμένου ιστού, κινητοποιείται (ή επάγεται) για την αναγέννησή του (Young H.E. et al., 2004).

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ-2: ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

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

Η ομάδα του Friedenstein πρώτη μελέτησε το αιμοποιητικό στρώμα του μυελού των οστών και περιέγραψε κύτταρα με μορφολογία ινοβλαστών (Friedenstein A.J. et al., 1966; 1968; 1970). Χρειάστηκε ωστόσο να περάσουν πολλά χρόνια μέχρι να ταυτιστεί ο πληθυσμός αυτός με εκείνον που ο Caplan αποκάλεσε για πρώτη φορά Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα (*mesenchymal stem cells, MSCs*) (Caplan A.I., 1991). Έως τότε τα MSCs συναντώνταν σε παλαιότερες βιβλιογραφικές αναφορές με ποικίλες ονομασίες, όπως «συγκρότημα σχηματισμού αποικιών ινοβλαστών» (*Fibroblast Colony-Forming Units, CFU-F*), «μυελικά κύτταρα του στρώματος» (*marrow stromal cells*) ή «προγονικά κύτταρα του (μυελικού) στρώματος (*stromal progenitor cells*).

Οι διάφορες ερευνητικές ομάδες που κατά καιρούς μελετούσαν τα MSCs, τα κατονόμαζαν με βάση την προέλευσή τους, τις ιδιότητές τους ή ακόμα και βάσει των μορφομετρικών παρατηρήσεων. Έγινε όμως αντιληπτό ότι όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί που αντιστοιχούσαν σε αυτές τις ονομασίες είχαν κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Σε αυτά, στηρίχθηκε η επιστημονική κοινότητα για να καταλήξει σε έναν κοινό ορισμό των MSCs (Dominici M. et al., 2006; Horwitz E.M. et al., 2005).

### 2. Ορισμός - Μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

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

Συνεπώς, σήμερα ορίζονται ως μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα:

- 1] εκείνα που υιοθετούν τη μορφολογία των ινοβλαστών και προσκολλώνται στο πλαστικό υπόστρωμα των καλλιεργητικών τρυβλίων, σχηματίζοντας μονοκυτταρικές στοιβάδες (ή στρώσεις, *monolayers*). Η μορφολογία αυτή δεν είναι καθόλου ενδεδειγμένο να περιορίζεται σε μια μοναδική απεικόνιση ή σε μια αποκλειστική αναπαράσταση, διότι αντιπροσωπεύει ένα μεμονωμένο στιγμιότυπο από μια ολόκληρη ακολουθία επιμέρους διακριτών μορφολογιών, οι οποίες προκύπτουν ή μια από την άλλη μέσω μετασχηματισμών του κυτταρικού σχήματος. Οι μορφολογικοί αυτοί μετασχηματισμοί στο *in vitro* περιβάλλον αντικατοπτρίζουν το ευρύ φάσμα των σταδίων προσαρμογής του φαινοτύπου, αφενός σε συνάρτηση με την ποικιλότητα των συνθηκών της κυτταροκαλλιέργειας και αφετέρου σε συνάρτηση με τη διακύμανση της πληθυσμιακής πυκνότητας,
- 2α] κατά τον ανοσοφαινοτυπικό τους έλεγχο, τα MSCs δεν πρέπει να εκφράζουν τους δείκτες προγονικών ή ώριμων αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων CD45, CD34, CD14, CD19 ή το HLA αντιγόνο του τάξης-II Ανθρώπινου Λευκοκυτταρικού Αντιγόνου (*Human Leukocyte Antigen, HLA-DR*),
- 2β] αντιθέτως πρέπει να εκφράζουν σε ποσοστό τουλάχιστον 95% τα αντιγόνα CD105 (ενδογλίνη), CD73 (εξω-5'-νουκλεοτιδάση) και CD90 (*thyl*). Οι διαφορές που πιθανώς παρατηρούνται στα ποσοστά έκφρασης αυτών των δεικτών, φαίνεται να σχετίζονται αφενός με την ταυτότητα της πηγής από την οποία απομονώνονται τα κύτταρα και αφετέρου με τις διαφορετικές συνθήκες της καλλιέργειάς τους,

- 2γ] σε γονιδιακό επίπεδο στα MSCs είναι ενεργά ορισμένα γονίδια, χαρακτηριστικά και των εμβρυονικών κυττάρων. Συγκεκριμένα εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct-4, Rex-1 και Nanog, (Riekstina U. et al., 2009), τον πυρηνικό υποδοχέα PPAR $\gamma$ 2 (Shockley K.R. et al., 2007) και το μεμβρανικό υποδοχέα για τον Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Friedman R. et al., 2007). Όλα αυτά τα μόρια σχετίζονται αφενός με τη δυνατότητα διαφοροποίησης των κυττάρων και αφετέρου με τη διατήρηση του πληθυσμιακού μεγέθους (του αριθμητικού αποθέματος) των σωματικών βλαστικών κυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό,
- 3] επιπλέον, ο MSC φαινότυπος επαληθεύεται περαιτέρω και από τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε τρεις τουλάχιστον κυτταρικούς τύπους: σε οστεοκύτταρα (*osteocytes*), ή σε χονδροκύτταρα (*chondrocytes*), ή σε λιποκύτταρα (*adipocytes*).

### 3. Ιδιότητες

#### 3.1. Αυτοανανέωση – Διαφοροποίηση

Τα MSCs διατηρούν τις βασικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων, δηλαδή:

- α] την ικανότητα αυτοανανέωσης ώστε να διατηρούν αριθμητικά σταθερό τον πληθυσμό τους  
β] ενώ παράλληλα, όντας βλαστικά κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άλλες μεσοδερμικές κυτταρικές σειρές: σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα.

Τα τελευταία χρόνια ωστόσο πληθαίνουν οι αναφορές που διευρύνουν το φάσμα των δυνατοτήτων διαφοροποίησης των MSCs, σε κύτταρα και άλλων εμβρυϊκών στιβάδων. Φαίνεται λοιπόν ότι:

- α] κύτταρα εκτοδερμικής προέλευσης, όπως είναι τα επιθηλιακά (*epithelial*), τα αστροκύτταρα (*astrocytes*) (Schwarz E.J. et al., 1999) ή τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, αλλά και
- β] κύτταρα της ενδοδερμικής στιβάδας, όπως για παράδειγμα τα μυοκύτταρα (*myotubes*) (Lee J.H. et al., 2005), τα τενοντοκύτταρα (*tenocytes*) (Awad H.A. et al., 1999), τα κύτταρα του αναπνευστικού (*lung cells*) ή του εντερικού επιθηλίου του (*gut cells*) (Uccelli A. et al., 2008), μπορούν να προκύψουν μέσω της απευθείας διαφοροποίησης των MSCs. Πρόκειται δηλαδή για πολυδύναμα κύτταρα που διαθέτουν τη δυνατότητα της **υπερδιαφοροποίησης (*transdifferentiation*)**. Αυτή η ελαστικότητα (ή πλαστικότητα) στη διαφοροποίηση θα μπορούσε να ερμηνευθεί με βάση την εμβρυϊκή προέλευση των MSCs. Έτσι, ενώ τα «ενήλικα» MSCs θεωρούνται ότι είναι κατά κανόνα μεσοδερμικής προέλευσης (Dennis J.E. and Charbord P., 2002), τα εμβρυϊκά προέρχονται κυρίως από το νευροεπιθήλιο και τη νευρική ακρολοφία (*neural crest*), δηλαδή από το νευροεκτόδερμα (Takashima Y. et al., 2007). Δεδομένου ότι η **υπερδιαφοροποίηση (*transdifferentiation*)** παρατηρείται σπανίως *in vivo*, η πιο εύλογη ερμηνεία της ποικιλότητας των κατευθύνσεων διαφοροποίησης που παρατηρούνται σποραδικά *in vitro*, είναι η μεταγεννητική μείωση του πληθυσμιακού κλάσματος των μεσεγγυματικών κυττάρων νευροεκτοδερμικής προέλευσης, με συνέπεια το σταδιακό εμπλουτισμό του μεσεγγυματικού πληθυσμού του ενηλικιούμενου οργανισμού, σε κύτταρα σχεδόν αποκλειστικά μεσοδερμικής καταγωγής.

### 3.2. Διαφοροποίηση των Βλαστικών Κυττάρων

Δεν έχει, ακόμα, αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε λειτουργικά κύτταρα ιστών. Ειδικότερα, για τα ποικιλοδύναμα εμβρυονικά κύτταρα της βλαστοκύστης, πιστεύεται ότι η διαφοροποίηση σε ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς αποτελεί ουσιαστικά μονόδρομο, αφού πρόκειται για την αναμενόμενη φυσιολογική εξέλιξή τους. Κάτι τέτοιο όμως δεν φαίνεται να ισχύει για τα βλαστικά κύτταρα του εμβρύου ή των ενηλίκων αφού τα κύτταρα αυτά, στην πλειοψηφία τους, διατηρούνται σε μια λανθάνουσα κατάσταση (*quiescent*) (Arai F. et al., 2004; Cotsarelis G. et al. 1990; Potten C.S. et al., 1997) και η ενεργοποίηση της διαφοροποίησης τους σε κύτταρα ενός συγκεκριμένου ιστού, ελέγχεται από το μικροπεριβάλλον τους και τα μηνύματα που λαμβάνουν από αυτό (Wilson A. et al., 2008).

Σήμερα, είναι πλέον γνωστό ότι οι δυο κατηγορίες βλαστικών κυττάρων, δηλαδή τα *ενεργά* και τα *λανθάνοντα*, συνυπάρχουν στον ίδιο ιστό. Στον αιμοποιητικό ιστό, για παράδειγμα, εντοπίζονται HSCs σε λανθάνουσα κατάσταση (Foudi A. et al., 2009) και παράλληλα, άλλα που πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται και στις κρύπτες του εντέρου (*intestinal crypts*) (Barker N. and Clevers H., 2007; Lee G. et al., 2009) ή στους θύλακες των τριχών (Fuchs E. and Serge J.A., 2000; Niemann C. and Watt F.M., 2002). Σε άλλες πάλι περιπτώσεις η συμπεριφορά κάποιων πληθυσμών βλαστικών κυττάρων όπως για παράδειγμα των μεσεγχυματικών προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι όταν μεταμοσχεύονται σε άλλον οργανισμό εντοπίζονται διαφοροποιημένοι «απόγονοί» τους σε πολλούς ιστούς του λήπτη (Pittenger M.F. et al., 1999).

Η κατανόηση των μηχανισμών που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες είναι σημαντική αφού θα αποτελέσει καθοριστικό παράγοντα για το εύρος των κλινικών-θεραπευτικών εφαρμογών των κυττάρων αυτών. Μέχρι στιγμής προτείνονται τέσσερις κύριες θεωρίες για την *in vivo* διαφοροποίηση των κυττάρων (Allen K.J. et al., 2005), ενώ δεν είναι απίθανο να συνεργάζονται περισσότεροι μηχανισμοί, ο καθένας με διαφορετική βαρύτητα, ή ακόμα σε διαφορετικές περιπτώσεις να επικρατεί και διαφορετικός μηχανισμός.

#### 3.2.a. Υπερδιαφοροποίηση

**Υπερδιαφοροποίηση (*transdifferentiation*)** λαμβάνει χώρα όταν βλαστικά κύτταρα (π.χ. αιμοποιητικά ή μεσεγχυματικά) καθορισμένα, δεσμευμένα (*determined, restricted*) σε συγκεκριμένη κατεύθυνση / φαινότυπο συμβάλλουν στην αναγέννηση ιστών, διαφοροποιούμενα σε μη προβλεπόμενους από το είδος τους, κυτταρικούς πληθυσμούς. Η διαδικασία αυτή καταδεικνύει την εξάρτηση της γονιδιακής έκφρασης από το *in vivo* και / ή το *in vitro* μικροπεριβάλλον (*microenvironment*) στο οποίο εμφωλεύονται τα βλαστικά κύτταρα. Ως παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί η *in vitro* διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών σε ηπατοκύτταρα με τη χρήση κυτταροκινών και απουσία άλλων κυττάρων, αποκλείοντας έτσι την πιθανότητα της **κυτταρικής σύντηξης (*cell fusion*)** (Saji Y. et al., 2004; Tera S. et al., 2003).

Η άποψη αυτή μάλιστα ενισχύεται και από άλλα πειράματα που αφορούσαν διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Σε ένα από αυτά έγινε συγκαλλιέργεια HSC και ηπατοκυττάρων με τη **μέθοδο *transwell*** (που επιτρέπει την ανταλλαγή διαλυτών παραγόντων αλλά όχι την απευθείας κυτταρική επαφή), οπότε παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των HSC σε κύτταρα που παράγουν **CK-18** μια κυττοκερατίνη χαρακτηριστική της ηπατικής σειράς (Jang Y.Y. et al., 2004; Krause D.S. et al., 2001). Η επαγωγή της υπερδιαφοροποίησης από διαλυτούς παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα οι κυτταροκίνες, θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα φαινόμενα που έχουν παρατηρηθεί και περιγραφεί για διάφορους πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων σε *in vivo* μελέτες (Bonner-Weir S. et al., 2008; Dong H.H. et al., 2009). Ωστόσο τα περισσότερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν πριν το 2000 δεν παρέχουν επαρκή δεδομένα που να αποκλείουν το φαινόμενο της κυτταρικής σύντηξης (***cell fusion***) και για το λόγο αυτό θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

### 3.2.b. Κυτταρική Σύντηξη

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

### 3.2.c. Τροφική δράση των Βλαστικών Κυττάρων

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

### 3.2.d. Αποδιαφοροποίηση - Επαναδιαφοροποίηση – Επαναπρογραμματισμός

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

---

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-3: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ****1. Κλινικές εφαρμογές: από την πρώτη μεταμόσχευση στις προοπτικές του μέλλοντος**

Προκειμένου να στοιχειοθετηθεί η σημασία των βλαστικών κυττάρων υπό το πρίσμα της προοπτικής των μελλοντικών χρήσεών τους, κρίθηκε σκόπιμη μια σύντομη ιστορική αναδρομή.

**1.1. Βλαστικά Κύτταρα: ιστορική ανασκόπηση πενήντα χρόνων**

Οι πρώτες δημοσιεύσεις αφορούσαν τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα στο μυελό των οστών (Till J.E. and McCulloch E.A., 1961), ενώ οι ακόλουθες αναφορές αποκάλυψαν προοδευτικά την ποικιλοότητα του βλαστικού φαινότυπου.

Οι κυριότεροι σταθμοί στην έρευνα των βλαστικών κυττάρων είναι οι εξής:

- **1958:** Η πρώτη κλινική εφαρμογή των βλαστικών κυττάρων: Ο E. Donnall Thomas (βραβείο Νόμπελ 1990) πραγματοποιεί την πρώτη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών σε ασθενή που έπασχε από λευχαιμία. Δότης ήταν ο δίδυμος αδερφός του.
- **1961:** Ανακάλυψη ενός κυτταρικού πληθυσμού στον μυελό των οστών από τον οποίο προέρχονταν όλα τα κύτταρα του αίματος - Το αιμοποιητικό βλαστικό κύτταρο (Becker A.J. et al., 1963; Till J.E. and McCulloch E.A., 1961).
- **1965:** Οι Altman και Das εντοπίζουν στον υπόκαμπο και τον οσφρητικό λοβό του εγκεφάλου του αρουραίου τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (Altman J., 1969; Altman J. and Das G.D., 1965).
- **1966:** Χαρακτηρισμός των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών (Friedenstein A.J. et al., 1970; Friedenstein A.J. et al., 1968; Friedenstein A.J. et al., 1966). Αργότερα ο πληθυσμός αυτός ταυτίζεται με τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Pittenger M.F. et al., 1999; Pittenger M.F. and Marshak D.R., 2001).
- **1968:** Οι Edwards και Bavister γονιμοποιούν για πρώτη φορά ωάριο *in vitro*.
- **1969:** Ο E. Donnall Thomas πραγματοποιεί την πρώτη επιτυχημένη αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών από μη-συγγενή δότη.
- **1981:** Οι Evans και Kaufman και παράλληλα ο Martin απομονώνουν για πρώτη φορά από βλαστοκύστες ποντικών εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Evans M.J. and Kaufman M.H., 1981; Martin G.R., 1981).
- **1988:** Πραγματοποιείται η πρώτη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (Gluckman E. et al., 1989).
- **1992:** Ιδρύεται η πρώτη στον κόσμο τράπεζα βλαστικών κυττάρων για κλινική χρήση. Πρόκειται για την Τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος της Νέας Υόρκης (Rubinstein P. et al., 1995; Rubinstein P. et al., 1993).
- **1994:** Δημιουργία ανθρώπινης βλαστοκύστης *in vitro* με σκοπό την υποβοηθούμενη γονιμοποίηση (Bongso T.A. et al., 1994a). Απομόνωση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων από την εσωτερική μάζα αλλά αδυναμία διατήρησής τους σε καλλιέργεια (Bongso T.A. et al., 1994b).
- **1995:** Καλλιέργεια εμβρυονικών κυττάρων από πρωτεύοντα (Thomson J.A. et al., 1995; Thomson J.A. et al., 1996).
- **1998:** Τα πρώτα εμβρυονικά κύτταρα από ανθρώπινη βλαστοκύστη καλλιεργούνται επιτυχώς για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στο Πανεπιστήμιο του Wisconsin-Madison από τον James Thomson (Thomson J.A. et al., 1998).
- **1999:** Απομονώνονται, καλλιεργούνται και διαφοροποιούνται *in vitro* νευρικά βλαστικά κύτταρα (Vescovi A.L. et al., 1999).
- **1999 έως σήμερα:** Τα τελευταία χρόνια εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν από ιστούς πολλοί διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων. Στο ήπαρ, την καρδιά, τους σκελετικούς μύες, τα δόντια ή τον λιπώδη ιστό περιγράφονται κύτταρα με διαφορετικές δυνατότητες διαφοροποίησης καθώς και με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες.

### 1.2. Το παρόν των Βλαστικών Κυττάρων

Σήμερα, 50 χρόνια μετά τα πρώτα της βήματα, η μεταμόσχευση HSCs εξακολουθεί να αποτελεί την πλέον εδραιωμένη μορφή κυτταρικής θεραπείας. Αρχικά, αιμοποιητικά κύτταρα από το μυελό των οστών χορηγήθηκαν για τη θεραπεία της λευχαιμίας. Με την εξέλιξη των τεχνικών και την κατανόηση της βιολογίας τους η χρήση τους επεκτάθηκε στη θεραπεία και άλλων νόσων, όπως είναι τα λεμφώματα, ορισμένες μορφές καρκίνου, αναιμίες, μεταβολικές παθήσεις του αίματος και σε κάποιες περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων και ανοσοανεπαρκειών.

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

### 1.3. Μελλοντικές εφαρμογές των Βλαστικών Κυττάρων

Παρά το γεγονός ότι η μελέτη των βλαστικών κυττάρων βρίσκεται στα αρχικά της στάδια, σκιαγραφούνται ήδη οι προσεχείς τομείς αξιοποίησής τους. Αφενός η πλαστικότητα της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων και αφετέρου η ικανότητά τους να μεταναστεύουν (**homing**) και να εγκαθίστανται σε τραυματισμένους ιστούς, αποτελούν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εκλογής για το σχεδιασμό των σύγχρονων θεραπευτικών σχημάτων, τα οποία επικεντρώνονται στους εξής άξονες εργασίας:

- 1] Ενδελεχής ταυτοποίηση των μεσεγχυματικών πληθυσμών. Τα βλαστικά κύτταρα, ακόμα κι αν προέρχονται από μία συγκεκριμένη πηγή, συχνά αντιπροσωπεύουν ανομοιογενείς πληθυσμούς, με συνέπεια την επιτακτική ανάγκη καθορισμού του είδους βλαστικού κυττάρου που είναι το καταλληλότερο για κάθε περίπτωση.
- 2] Αναγέννηση ιστών έπειτα από τραυματισμό ή βλάβη που οφείλεται σε παθολογικά αίτια (π.χ. ισχαιμικό ή αιμορραγικό εγκεφαλικό επεισόδιο, κίρρωση του ήπατος κ.τ.λ.)
- 3] Επιδιόρθωση ιστών σε περιπτώσεις κληρονομικών ή συγγενών παθήσεων, όπως για παράδειγμα στην αποκατάσταση της οστεοποίησης στην ατελή οστεογένεση (*Osteogenesis imperfecta*) ή των νησίδων του παγκρέατος στο διαβήτη τύπου-I. Σε αυτές τις περιπτώσεις βλαστικά κύτταρα υγιούς δότη θα μπορούσαν να χορηγηθούν ακόμα και κατά την κυοφορία *in utero* ώστε να καλύψουν την ανεπάρκεια των κυττάρων του ασθενούς εμβρύου (Le Blanc K. et al., 2005).
- 4] Γονιδιακή θεραπεία όπου τα βλαστικά κύτταρα θα χρησιμεύουν ως φορείς γονιδίων, αξιοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητα στόχευσής τους (**homing**) στο φυσιολογικό τους μικροπεριβάλλον. Κύτταρα από τον ιστό-στόχο της θεραπείας, θα μετατρέπονται *ex vivo* με το κατάλληλο γονίδιο και θα επαναχορηγούνται στον ασθενή όπου θα κατευθύνονται στο όργανο από το οποίο κατάγονται.

Ο μεταναστευτικός φαινότυπος των κυττάρων αυτών προσφέρεται για αξιοποίηση στις στοχευμένες θεραπείες. Έχει διαπιστωθεί ότι σε ασθενείς με κακοήθεις όγκους τα MSCs εγκαθίστανται κατά προτίμηση στην περιοχή του όγκου. Παρόλο που σε φυσιολογικές συνθήκες τα μεσεγχυματικά καταστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα, κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις μπορούν να το ενισχύσουν. Έτσι σε μια μελέτη επαγωγής της IFN- $\gamma$  από MSCs πριν τη χορήγησή τους σε ασθενείς με νεοπλασίες, παρατηρήθηκε συρρίκνωση του όγκου λόγω ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού κατά των κακοηθών κυττάρων (Studený M. et al., 2002). Το γεγονός αυτό μπορεί να



εξηγηθεί μόνο από την εγκατάσταση των MSCs στην περιοχή του όγκου και διατήρηση της έκκρισης της κυτταροκίνης. Σε άλλες περιπτώσεις έπειτα από κατάλληλη διέγερση, μπορούν να δράσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζοντας μόρια MHC class-II και να ενεργοποιήσουν τα Τ-λεμφοκύτταρα (Chan J.L. et al., 2006; Stagg J. et al., 2006). Συνοψίζοντας, τα MSCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών (Loebinger M.R. et al., 2009) ή ως κύτταρα που υποβοηθούν το ανοσοποιητικό σύστημα, στην αντικαρκινική θεραπεία, στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και σε πολλές άλλες περιπτώσεις.

## 2. Περιορισμοί στη χρήση των Βλαστικών Κυττάρων

Όπως όμως προαναφέρθηκε, τα βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από τους ενήλικες είναι «γηρασμένα», έχουν μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και περιορισμένη δυναμικότητα διαφοροποίησης. Αντίστοιχα αποδείχθηκε ότι και τα MSCs που προέρχονται από το μυελό των οστών ενηλίκων δοτών πολλαπλασιάζονται με βραδύτερους ρυθμούς και έχουν μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης (Mueller S.M. and Glowacki J., 2001; Roobrouck V.D. et al. 2008; Stenderup K. et al., 2003) συγκριτικά με τα εμβρυικά μεσεγχυματικά κύτταρα, καθώς επίσης και ότι ο πληθυσμός τους μειώνεται δραστικά με την ηλικία (Haynesworth S.E. et al., 1994; Nishida S. et al., 1999). Στην κλινική πρακτική αυτό μεταφράζεται συχνά, σε δυσχερή προμήθεια της απαραίτητης θεραπευτικής δόσης κυττάρων. Με τα σύγχρονα δεδομένα θεωρείται ότι απαιτούνται  $1,0 \times 10^6$  κύτταρα ανά χιλιόγραμμο βάρους του ασθενούς (Troyer D.L. and Weiss M.L., 2008). Για να εξασφαλιστεί όμως αυτός ο αριθμός, όταν ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι μικρός, πρέπει να παραμένουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα σε καλλιέργεια, και πιθανόν και να χρειάζονται πολλές ανακαλλιέργειες, με δύο σημαντικές επιπτώσεις:

α] Καταρχάς, σε επείγουσες περιπτώσεις, όπου ακόμα και η μικρότερη καθυστέρηση θα μπορούσε να επιβαρύνει την κατάσταση του ασθενούς, η χρήση MSCs του μυελού των οστών καθίσταται αδύνατη.

β] Το δεύτερο πρόβλημα είναι ότι η παρατεταμένη καλλιέργεια και πολλαπλασιασμός μπορεί να επιφέρει **επιγενετικές αλλαγές (epigenetic modifications)** στα κύτταρα μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας ή ακόμη και να τα καταστήσει ακατάλληλα για κλινική χρήση.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, ταυτοποιούνται με ταχείς ρυθμούς νέοι πληθυσμοί με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων. Παράλληλα αυξάνεται και ο αριθμός των δυνητικών πηγών για δεδομένα είδη. Η χρηστική αξία των βλαστικών κυττάρων όμως καθορίζεται από την εφαρμογή για την οποία προορίζονται. Τα ευρύτερα χρησιμοποιημένα βλαστικά κύτταρα είναι τα HSCs που ήδη απομονώνονται από το μυελό των οστών και τον ομφάλιο λώρο. Τα εμβρυονικά κύτταρα είναι αυτά με τη μεγαλύτερη πλαστικότητα διαφοροποίησης. Ωστόσο ηθικοί λόγοι εμποδίζουν τη χρήση τους καθώς μοναδική πηγή τους είναι η βλαστοκύστη. Βλαστικά κύτταρα ιστών ενηλίκων θα μπορούσαν να συμβάλλουν σε θεραπείες που αφορούν τους ιστούς προέλευσής τους. Ενώ θεωρητικά μια τέτοια προοπτική είναι ελκυστική στην πράξη προκύπτουν δυσκολίες στην απομόνωσή τους. Ο νευρικός ιστός, ο καρδιακός μυς, το ήπαρ, το πάγκρεας και άλλα όργανα δεν είναι εύκολα προσπελάσιμα και η ποσότητα ιστού που λαμβάνεται για βιοψίες δεν θα επαρκούσε για την απομόνωση ικανής ποσότητας βλαστικών κυττάρων. Έτσι η μοναδική πηγή βλαστικών κυττάρων ενηλίκων για κλινικές εφαρμογές παραμένει ο μυελός των οστών. Η λήψη του δεν είναι χωρίς κινδύνους καθώς απαιτεί γενική νάρκωση ενώ παράλληλα πρόκειται για ιστό χρήσιμο για το δότη. Γίνεται λοιπόν μια στροφή προς τους εμβρυϊκούς ιστούς που μετά τον τοκετό απορρίπτονται και δεν έχουν καμία άλλη χρησιμότητα, δηλαδή τον πλακούντα, τον ομφάλιο λώρο και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Από τους ιστούς αυτούς μπορούν να απομονωθούν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα με μεγάλη ευκολία ενώ δεν υπάρχουν ηθικά προβλήματα στη χρήση τους. Αποτελούν τον πληθυσμό βλαστικών κυττάρων με τις περισσότερες δυνητικές εφαρμογές στο προσεχές μέλλον.

### 3. Αντιμετώπιση των προβλημάτων στην «πηγή» τους

Αφού τα κύρια προβλήματα, που περιορίζουν τις κλινικές εφαρμογές των MSCs, φαίνεται ότι σχετίζονται με την πρακτικώς αποκλειστική διαθεσιμότητά τους από το μυελό των οστών του ασθενούς, η αναζήτηση εναλλακτικών πηγών πιθανόν να αποτελέσει τη λύση. Τα εμβρυικά μεσεγχυματικά κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι συγκεντρώνουν όλες τις κύριες ιδιότητες των MSCs αλλά και κάποιες ουσιώδεις διαφορές (Gotherstrom C. et al., 2005):

α] Διαφέρει, για παράδειγμα, το προφίλ της πρωτεϊνικής τους έκφρασης καθώς και οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες (Troyer D.L. and Weiss M.L., 2008).

β] Επιπλέον, ενώ μπορούν να διαφοροποιηθούν στις ίδιες κυτταρικές σειρές με εκείνες που προέρχονται από τα μυελικά MSCs, διαφέρουν ως προς την ευκολία με την οποία αυτό συμβαίνει. Για παράδειγμα τα εμβρυικά MSCs διαφοροποιούνται ευκολότερα σε οστεοκύτταρα παρά σε λιποκύτταρα, ενώ ισχύει ακριβώς το αντίστροφο για τα MSCs των ενηλίκων (Baksh D. et al., 2007). Ωστόσο τα εμβρυικά πολλαπλασιάζονται ταχύτερα και μπορούν να διατηρηθούν σε καλλιέργεια για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους καθότι είναι «νεαρότερα» και έχουν μακρύτερα τελομερή (Campagnoli C. et al., 2001; Guillot P.V. et al., 2007). Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών μπορεί εύκολα να αποκτηθεί μεγάλος αριθμός εμβρυικών MSCs.

Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν ως επί το πλείστον σε κύτταρα που απομονώθηκαν από το εμβρυϊκό ήπαρ. Για να μπορέσουν όμως κάποια στιγμή τα MSCs εμβρυικής προέλευσης να χρησιμοποιηθούν ευρέως σε κλινικές εφαρμογές θα πρέπει να λαμβάνονται εύκολα και χωρίς κίνδυνο για το έμβρυο. Το αμνιακό υγρό είναι μια από τις πηγές απομόνωσης των εμβρυικών MSCs αλλά η λήψη του δεν είναι ακίνδυνη αφού σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί κατά την αμνιοκέντηση να προκληθεί ακόμα και αποβολή.

Επιπλέον ο όγκος του είναι περιορισμένος και όταν γίνεται λήψη του προέχει η χρήση του για διαγνωστικούς σκοπούς. Αντίθετα το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και ο ομφάλιος λώρος αποτελούν ιδανικές περιπτώσεις αφού μετά τον τοκετό θεωρούνται πλέον άχρηστα βιολογικά υλικά και καταστρέφονται. Η συλλογή τους είναι εύκολη, εξίσου ακίνδυνη για τη μητέρα και για το έμβρυο, και μπορεί να γίνει συστηματικά, όπως αποδείχθηκε, τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη των Τραπεζών ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Σε αυτές τις Τράπεζες, ένας μεγάλος αριθμός μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος κρίνεται ακατάλληλος και καταστρέφεται λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε HSCs.

Οι μονάδες αυτές, όπως και ο ιστός του ομφαλίου λώρου που τις συνοδεύει θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια σημαντική πηγή MSCs. Τα MSCs αυτά, θα προέρχονται από υγιή οργανισμό και θα μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν *in vitro* και να καταψυχθούν μέχρι να ζητηθούν για χρήση από κάποιο ασθενή. Προκειμένου όμως να γίνει αυτό εφικτό θα πρέπει πρώτα να διαπιστωθεί αν το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και ο ομφάλιος λώρος μπορούν να επιτελέσουν αυτό το ρόλο, αν δηλαδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές MSCs για κλινικές εφαρμογές. Αυτό προϋποθέτει τη διερεύνηση της δυνατότητας συστηματικής απομόνωσης εμβρυϊκών MSCs καθώς και τη μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων αυτών των κυττάρων.

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ-4: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

### 1. Σκοπός της μελέτης: Τα Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα του Ομφάλιου Λώρου (UC-MSCs)

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

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

### 2. Ο ομφάλιος λώρος ως πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων: πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Ένας από τους σκοπούς της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ήταν η διερεύνηση των δυνατοτήτων αξιοποίησης του ομφάλιου λώρου (*umbilical cord*, **UC**), ως πιθανής πηγής MSCs για κλινικές εφαρμογές (UC-MSCs), σε συνάρτηση με σειρά πλεονεκτημάτων που συνοδεύουν την κλινικοεργαστηριακή διαχείριση του βιολογικού αυτού υλικού και ειδικότερα:

- 1] η άσκοπη αχρήστευση μετά τον τοκετό, τόσο του ομφαλοπλακουντιακού αίματος όσο και του ομφάλιου λώρου, τα οποία εξ'ορισμού αντιπροσωπεύουν βιολογικό υλικό χρήσιμο στην έρευνα,
- 2] η μεγάλη διαθεσιμότητα του βιολογικού υλικού που, ενώ συλλέγεται συστηματικά στις Τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος με σκοπό τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, ωστόσο μεγάλο ποσοστό κρίνεται ακατάλληλο εξαιτίας της χαμηλής του περιεκτικότητας σε HSCs και καταστρέφεται, αντί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά για απομόνωση MSCs,
- 3] η εμβρυική ταυτότητα του βιολογικού υλικού, που εξ'ορισμού διασφαλίζει τη δυνατότητα προμήθειας εμβρυικών MSCs.

Αρχικά διερευνήθηκε εάν ήταν εφικτή η συστηματική απομόνωση και καλλιέργεια των **UC-MSCs** (ή **WJ-MSCs**) που είναι εμφωλευμένα στη **Βαρτόνιο γέλη (Wharton's jelly, WJ)** του ανθρώπινου ομφάλιου λώρου. Στη συνέχεια εξετάστηκε αφενός εάν τα επιμέρους γνωρίσματα των απομονωθέντων κυττάρων επιβεβαίωναν το μεσεγχυματικό φαινότυπο και αφετέρου εάν τα κινητικά χαρακτηριστικά της *in vitro* πληθυσμιακής επέκτασής τους (*expansion*), πληρούσαν την προβλεπόμενη τιμή πληθυσμιακού μεγέθους ικανού για κλινική χρήση σύμφωνα με τις σύγχρονες προδιαγραφές, οι οποίες την ορίζουν στην κατώφλια τιμή των  $1 \times 10^6$  κυττάρων (Troger D.L. and Weiss M.L., 2008). Στο πλαίσιο της διερεύνησης αυτής, αξιολογήθηκε ο βαθμός συσχέτισης των ανοσοφαινοτυπικών και των κινητικών μεταβλητών με ένα συνδυασμό μορφολογικών κριτηρίων εμπειρικού κυρίως χαρακτήρα, που συστηματοποιήθηκαν κατά το μικροσκοπικό έλεγχο, προκειμένου να αξιοποιηθούν τα μορφομετρικά δεδομένα που συλλέχθηκαν για τον *in vitro*

μεσεγχυματικό φαινότυπο, στον περιορισμό της υποκειμενικότητας και κατ'επέκταση στην εξειδίκευση των αλγορίθμων επεξεργασίας εικόνας (*image analysis*) και του αυτοματισμού στην εργαστηριακή πρακτική των Τραπεζών φύλαξης Βλαστικών Κυττάρων.

Ωστόσο, η ασφαλής ταυτοποίηση του μεσεγχυματικού φαινότυπου προϋποθέτει μια συνεκτίμηση των μορφολογικών, ανοσοφαινοτυπικών και λειτουργικών κριτηρίων, συνδυαστικά (Horwitz E.M. et al., 2005; Dominici M. et al., 2006). Για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των MSCs ελέγχθηκε ο ανοσοφαινότυπός τους με κυτταρομετρία ροής. Όσον αφορά τα λειτουργικά κριτήρια, αυτά επικεντρώνονται στον έλεγχο της δυνατότητας επαγόμενης διαφοροποίησης των κυττάρων που απομονώθηκαν από τον ομφάλιο λώρο, προς οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα (Horwitz E.M. et al., 2005; Dominici M. et al., 2006).

Δεδομένου του γεγονότος ότι στο πλαίσιο μιας κυτταρικής θεραπείας, το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την απομόνωση των κυττάρων μέχρι την κλινική φάση της αλληλεπίδρασής τους με το *in vivo* περιβάλλον του πολυκύτταρου οργανισμού, είναι πιθανό να αμβλύνει και / ή να εκμηδενίσει τη βλαστοκυτταρική δυναμική τους, μελετήθηκε περαιτέρω, αφενός η δυνατότητα κρυοσυντήρησης των MSCs του ομφάλιου λώρου και αφετέρου ο αντίκτυπός της στο μεσεγχυματικό φαινότυπο. Έτσι, σε δεύτερη φάση επιχειρήθηκε η κρυοσυντήρηση των MSCs του ομφάλιου λώρου εξετάζοντας την επίδραση της κατάψυξης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, στα χαρακτηριστικά και στις ιδιότητες των κυττάρων που είχαν απομονωθεί από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs).

Τέλος, σε τρίτη φάση επιχειρήθηκε ο εποικισμός ικριωμάτων προκειμένου να διαπιστωθεί η καταλληλότητα των MSCs του ομφάλιου λώρου για κλινικές εφαρμογές ιστικής ανάπλασης. Ένας επιτυχής συνδυασμός κυττάρων με βιοσυμβατά ικριώματα θα επέτρεπε τη στοχευμένη χορήγηση των MSCs στον ανθρώπινο οργανισμό, σε παθολογικούς ή τραυματισμένους ιστούς, επιδιώκοντας την εστιασμένη συνάθροιση και εντοπισμένη διατήρησή τους στην ανατομική θέση κλινικού ενδιαφέροντος, για αποδοτικότερο θεραπευτικό αποτέλεσμα, σε σύγκριση προς το αντίστοιχο της απευθείας έγχυσης κυττάρων που οδηγεί στη σπάταλη-αφειδή διασπορά τους σε όλους τους ιστούς (Pittenger et al., 1999).

**Α-ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

**ΕΝΟΤΗΤΑ-II: Τοπολογικές ιδιότητες *in vivo* κυτταρικών συστημάτων:** Οι μεσεγγυματικές συμπακνώσεις (*mesenchymal condensations*) στις καταβολές των άκρων από προνύμφες άνουρων αμφιβίων

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-1<sup>ο</sup>: Βασικές γνώσεις της οντογένεσης του είδους *Rana temporaria*****1.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ: *Rana temporaria***

Συστηματική κατάταξη

|             |                            |
|-------------|----------------------------|
| Βασίλειο:   | Ζώα (Animalia)             |
| Φύλο:       | Χορδωτά (Chordata)         |
| Υποφύλο:    | Σπονδυλόζωα (Vertebrata)   |
| Ομοταξία:   | Αμφίβια (Amphibia)         |
| Υφομοταξία: | Λισσαμφίβια (Lissamphibia) |
| Τάξη:       | Άνουρα (Anura)             |
| Υπόταξη:    | Νεοβατράχια (Neobatrachia) |
| Οικογένεια: | Ranidae                    |
| Γένος:      | Rana                       |
| Είδος:      | Rana temporaria            |



**Εικόνα II.1.1.:** Το αμφίβιο *Rana temporaria* στο πεδίο.

**Γεωγραφική εξάπλωση**

Η γεωγραφική κατανομή του είδους *Rana temporaria* εκτείνεται από την Ευρώπη και τη Μεγάλη Βρετανία μέχρι τη βορειοδυτική Ασία. Στην ηπειρωτική Ευρώπη είναι γνωστός ως «πράσινος» ή «καστανός» βάτραχος. Εμφανίζει ανθεκτικότητα στα ψυχρά κλίματα, αντιπροσωπεύοντας το μοναδικό είδος αμφιβίου που επιβιώνει ακόμη και στον αρκτικό κύκλο.

**Φυσικά χαρακτηριστικά**

Μάζα: 22,7 gr (κατά μέσο όρο)

Μήκος: 7,5 - 8 cm

Ο κοινός βάτραχος είναι μικρόσωμο ζώο με πεπλατυσμένο κεφάλι συνδεδεμένο χωρίς αυχένα στο κυρίως σώμα και χωρίς να απολήγει σε ουρά (στο ώριμο στάδιο της ανάπτυξης). Τα κατώτερα τμήματα της σπονδυλικής στήλης είναι συγχωνευμένα σε άκαμπτο οστέινο στέλεχος, το ουρόστυλο. Το τελευταίο συναπαρτίζεται με τα οστά της λεκάνης διάταξη μοχλού με επαρκώς στέρεη πρόσφυση του μυικού συστήματος που εξασφαλίζει επαρκή ευκαμψία και ελαστικότητα, ευνοώντας παράλληλα βαδιστικές, αλτικές και κολυμβητικές κινήσεις. Ο χρωματισμός κυμαίνεται σε ποικιλία τόνων του γκρι, φαιού, ωχρού, κίτρινου, καφέ, πράσινου, με κηλίδες και διάχυτες λωρίδες. Στερούνται φωνητικών σάκων και γι' αυτό μπορούν να ακουστούν μόνο μέχρι απόσταση 50 περίπου μέτρων.

**Διατροφικές συνήθειες**

Το ενδιαίτημα μεταβάλλεται σε συνάρτηση με τα οντογενετικά στάδια και με τις εποχιακές μεταβολές, συμπεριλαμβάνοντας έντομα και τις προνύμφες αυτών, αραχνοειδή και σκουλήκια.

### Αναπαραγωγή

Η γενετήσια συνεύρεση επιτελείται μέσα στο νερό όπου το αρσενικό προσελκύει το θηλυκό, κοάζοντας. Στη συνέχεια το αρσενικό συγκρατείται σθεναρά στη ράχη του θηλυκού με το αντανάκλαστικό του εναγκαλισμού. Σε αυτή τη θέση είναι δυνατό να παραμείνει επί 2 - 3 μέρες μέχρι το θηλυκό να ξεκινήσει την ωοαπόθεση, οπότε το αρσενικό εκτελεί την επίβρεξη με το σπερματικό υλικό, εξασφαλίζοντας γονιμοποίηση μέσα στο νερό.



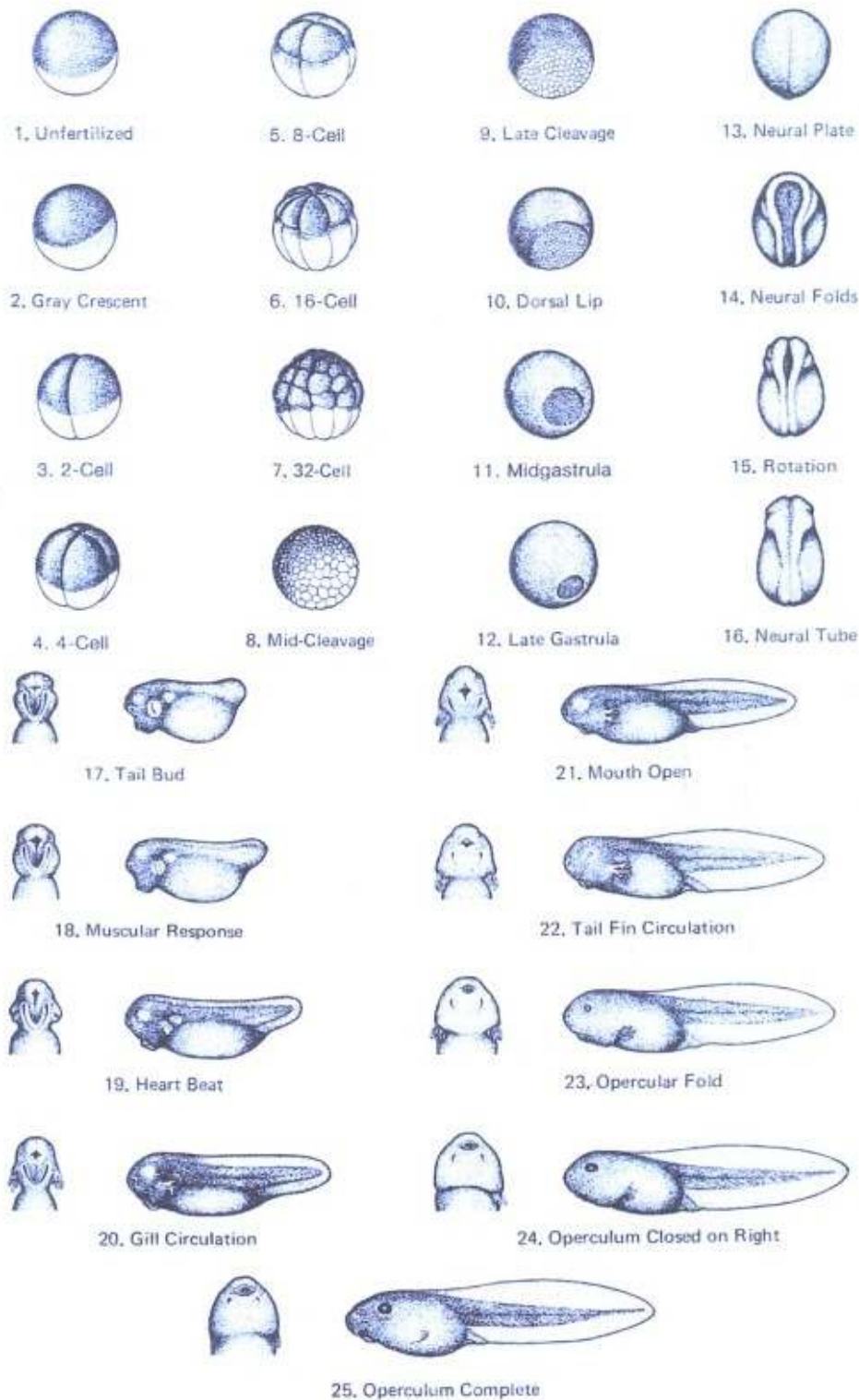
Εικόνα II.1.2.: Τα στάδια μεταμόρφωσης άνουρου αμφιβίου (Young J.Z. (1981).

Το είδος αυτό διατηρεί ιδιαίτερη σημασία για τον άνθρωπο, για τους εξής λόγους:

- Στο πεδίο, είναι δεινοί καταναλωτές εντόμων, ασκώντας σημαντικό έλεγχο στο πληθυσμιακό μέγεθός τους.
- Στο εργαστήριο, είναι πειραματόζωα εκλογής για μελέτες αναπτυξιακές, ανατομίας και φυσιολογίας σπονδυλοζώων.

### 1.2. Εμβρυική ανάπτυξη αμφιβίων

Οι τυπικότεροι αντιπρόσωποι ανήκουν στην τάξη των άνουρων (*Bufo bufo*, *Rana temporaria*, *Rana ridibunda*, *Xenopus laevis*, κ.α.) και στην τάξη των ουροδελών (*Triturus cristatus*, *Triturus alpestris*, *Ambystoma mexicanum*, *Salamandra salamandra*, κ.α.). Τα περισσότερα είδη επιτελούν τη γενετήσια λειτουργία μέσα στο νερό, ενώ ειδικά στα ουροδελή το αρσενικό εναποθέτει σπερματοφόρο, το οποίο εγκλείεται από το θηλυκό στην αμάρα του. Η γονιμοποίηση στα άνουρα πραγματοποιείται με την είσοδο -μέσω της ακροσωμικής του προβολής- του μοναδικού σπερματοζωαρίου στο ωάριο (που το βρίσκει στη μετάφαση-II), την ένωση των δύο προπυρήνων των ανισογαμικών γαμετών και τελικά τη δημιουργία διπλοειδούς ζυγωτού. Στο ασύμμετρο αβγό του βατράχου παρατηρούνται περαιτέρω καθορισμένες μετατοπίσεις των αρχικών αξόνων ασυμμετρίας, συστεγαζόμενες υπό τον όρο **περιστροφές γονιμοποίησης**. Εξαιτίας του ετερολεκιθικού χαρακτήρα του ωαρίου του βατράχου με την πυκνότερη συγκέντρωση λεκίθου στο φυτικό πόλο, το κέντρο βάρους του κατανέμεται σχετικά μετατοπισμένο (αναφορικά προς το γεωμετρικό κέντρο) προς τον φυτικό πόλο, οπότε η είσοδος του σπερματοζωαρίου σε συνδυασμό με την επακόλουθη απομάκρυνση της βιτελλινικής μεμβράνης αναπτύσσει ροπή που συστρέφει στερεότυπα το σκουρόχρωμο ζωικό πόλο προς τα πάνω (**περιστροφή εξισορρόπησης**).



**Εικόνα II.1.3.:** Επιμήκης τομή ενός εμβρύου βατράχου 3 mm (Johnson & Volpe, 1995)

Άλλη εξειδικευμένη μετατόπιση που εξαρτάται στενά από τη θέση εισόδου του σπερματοζωαρίου είναι αυτή της επιφάνειας του αβγού περίπου κατά  $30^{\circ}$  εξαιτίας της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού που αποκαλύπτει σε θέση αντιδιαμετρική της θέσης εισόδου του γαμέτη, τη φαιόχρωμη περιοχή της **φαιάς ημισελήνου (grey crescent)** [Εικ. II.1.3]. Η επονομαζόμενη αυτή **περιστροφή συμμετροποίησης** σταθεροποιεί οριστικά τους άξονες ασυμμετρίας του μελλοντικού οργανισμού, αντιπροσωπεύοντας έναν καθολικό μηχανισμό



καθορισμού του προορισμού (*prospective fate*) των αναπτυσσόμενων κυττάρων. Σύμφωνα με αυτόν τον συνολικό χωροταξικό προκαθορισμό, στο ζωικό πόλο επίκειται να σχηματιστεί η ράχη, στο φυτικό η κοιλιά, προς το μέρος της φαιάς ημισελήνου η έδρα (ουρά), ενώ στο αντιδιαμετρικό της σημείο, η κεφαλή (Κουσουλάκος, 2002). Η πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη των αμφιβίων μεσολαβείται με το είδος κυτταροδιαίρεσης που ονομάζεται **αυλάκωση** (*cleavage*) και η οποία διαφέρει από την τυπική μίτωση, κυρίως στην ελαχιστοποίηση της παρεμβαλλόμενης κυτταρικής αύξεσης που συνοδεύει κανονικά το διπλασιασμό του γενετικού υλικού σε κάθε ξεχωριστό κυτταρικό κύκλο. Το αποτέλεσμα της πυκνής επανάληψης κυτταροδιαιρέσεων χωρίς συνοδό αύξηση βιομάζας, παράγει σύντομα μεγάλο πληθυσμό κυττάρων, καθένα από τα οποία εμπεριέχει μικρό κλάσμα κυτοπλάσματος του αρχικού, πολύ μεγάλου ζυγώτη (Johnson & Volpe, 1995). Οι διαιρέσεις χαρακτηρίζονται ως ακτινωτές, ολικές και άνισες στα αβγά των αμφιβίων, ενώ κάθε διακριτό αναπτυξιακό στάδιο δεν προσδιορίζεται από συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων. Έτσι, ως **μορίδιο** (*morula*) χαρακτηρίζεται το έμβρυο που αποτελείται από **16 - 64** βλαστομερίδια, ενώ ως **βλαστίδιο** (*blastula*), αυτό που προκύπτει μετά τα **128** κύτταρα (Κουσουλάκος, 2002).

### 1.2.α. Στάδιο βλαστιδίου (*blastula*)

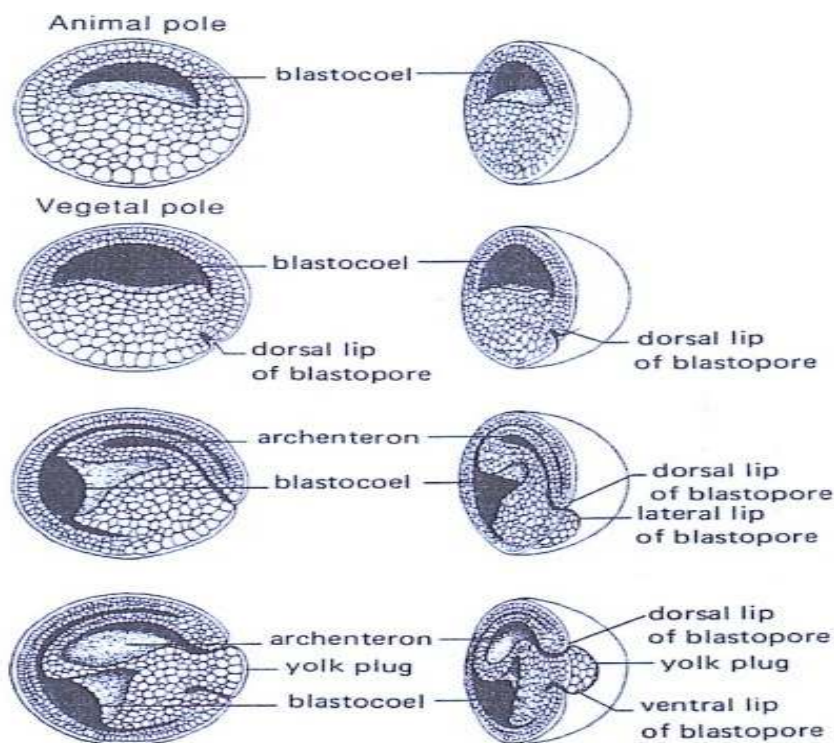
Καθώς η αυλάκωση συνεχίζεται, στο έμβρυο οργανώνεται μεγάλος αριθμός κυττάρων ή **βλαστομεριδίων**, τα οποία καταλήγουν να αφορίζουν μια ημισφαιρική κοιλότητα που κείται εξ' ολοκλήρου στο ζωικό ημισφαίριο, τη **βλαστική κοιλότητα** (ή βλαστόκοιλο, *blastocoel*), που προσδιορίζει το στάδιο του **βλαστιδίου**. Ωστόσο η βλαστική κοιλότητα δεν εμφανίζεται ξαφνικά, αλλά ξεκινά σταδιακά η σχηματοποίησή της περίπου από το στάδιο των **8** κυττάρων (Johnson & Volpe, 1995). Στο φυτικό πόλο υπάρχουν μεγάλα, λεκιθοφόρα βλαστομερίδια, στο ζωικό πόλο μικρά, σκουρόχρωμα βλαστομερίδια, ενώ ανάμεσα σε αυτές τις δύο ομάδες παρεμβάλλονται αυτά της **οριακής ζώνης** (*marginal zone*) (Κουσουλάκος, 2002).

### 1.2.β. Γαστριδίωση (*gastrulation*)

Με τον όρο αυτό νοείται το σύνολο των αναπτυξιακών διεργασιών που απολήγουν στο σχηματισμό των καταβολών του γαστρεντερικού συστήματος, δηλαδή του **αρχέντερου** και που ξεκινούν ως σύνθετες κινήσεις κυτταρικών ομάδων που καταλήγουν στο σχηματισμό των τριών βλαστικών δερμάτων. Στο κατώτερο (φυτικό) όριο της φαιάς ημισελήνου οργανώνεται η **βλαστοπορική σχισμή**, μια τοξωτή πτύχωση παράλληλη στην επιφάνεια που ξεκινά ως ραχιαία εγκόλπωση αλλά καθώς η κοιλότητά της επεκτείνεται, συγκλίνει αμφίπλευρα προς την κοιλιακή μέση γραμμή, ενώ ταυτόχρονα η έκταση του ζωικού πόλου που συνεχώς επεκτείνεται, επιβάλλεται και επικαλύπτει το φυτικό ημισφαίριο. Η μετακίνηση αυτή των επιφανειακών κυττάρων του ζωικού πόλου που ονομάζεται **επιβολή** (*epiboly*) συνεχίζεται έτσι ώστε ύστερα από **10** ώρες ανάπτυξης το έμβρυο να φαίνεται σχεδόν πλήρως καλυμμένο από τα σκουρόχρωμα κύτταρα του ζωικού πόλου, εκθέτοντας μια περιορισμένη κυκλική περιοχή από ανοιχτόχρωμα κύτταρα του φυτικού πόλου, το καλούμενο **λεκιθικό πώμα** (*yolk plug*). Η τοξοειδής αύλακα που αποτελεί την αφετηρία της διεξόδου (*involution*) των επιφανειακών κυττάρων του ζωικού πόλου στο εσωτερικό του εμβρύου ορίζει το **ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου** (*dorsal lip of blastopore*). Κατά την κίνηση της **σύγκλισης** τα επιφανειακά κύτταρα του ζωικού πόλου φαίνεται να κατευθύνονται προς το βλαστοπόρο, με τους ρυθμούς της σύγκλισης και της απόκλισης στη ραχιαίας περιοχής να υπερσκελίζουν αυτές της κοιλιακής και των εκατέρωθεν πλευρικών, με συνέπεια αυτή η διαφορική πληθυσμιακή επέκταση να δικαιολογεί τη βαθμιαία συστολή της κυκλοτερούς βλαστοπορικής σχισμής. Στο φυτικό τόξο της ζώνης αυτής, ορισμένα επιφανειακά κύτταρα (τα επικείμενα «**φιαλοκύτταρα**», *bottle cells*) αλλάζουν παράλληλα με τη μορφολογία των και τη διεύθυνση μετακίνησης, πραγματοποιώντας τη σύνθετη κίνηση της **αναστροφής** (*tilting*) και **εκτόπισης** (*displacement ventrally*), κατά την οποία διασπείρονται προς τις εσωτερικές στοιβάδες κυττάρων του φυτικού πόλου εκτελώντας συνολικά, κίνηση αποκλίνουσα ως προς τα υπερκείμενα επιφανειακότερα, δηλαδή διανύοντας τροχιές αντιπαράλληλες αυτών της σύγκλισης, με



αποτελεσμα την απώθηση, σύμπτυξη και τελικά συρρίνωση της βλαστικής κοιλότητας και την παράλληλη σχηματοποίηση μιας τοπολογικώς διαφορετικής, της γαστρικής ή αρχέντερου. Οι κινήσεις της **απόκλισης (divergence)** συνεχίζονται από την πλευρά του φυτικού πόλου και ενδοδερμικά κύτταρα ανέρχονται προς το ζωικό πόλο, υπαλείφοντας τελικά τη γαστρική κοιλότητα. Στο στάδιο αυτό ο οργανισμός αποτελείται από τρία συγκεκριμένα στρώματα κυττάρων, το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα [Εικ. II.1.4] (Κουσουλάκος, 2002). Το **εξώδερμα** περιέχει κύτταρα που θα δώσουν γένεση στο επιδερμικό κάλυμμα του σώματος, στο νευρικό σύστημα και σε αισθητήρια όργανα, το **ενδόδερμα** θα συγκροτήσει τις καταβολές της πεπτικής οδού με τα διάφορα ανατομικά εξαρτήματά της (πεπτικοί αδένες), της αναπνευστικής και της ουρογεννητικής, ενώ το **μεσόδερμα** που κείται μεταξύ των δύο προηγούμενων, δίνει γένεση σε πληθώρα ιστών, όπως στο μυϊκό, σκελετικό και κυκλοφορικό σύστημα (Johnson & Volpe, 1995).

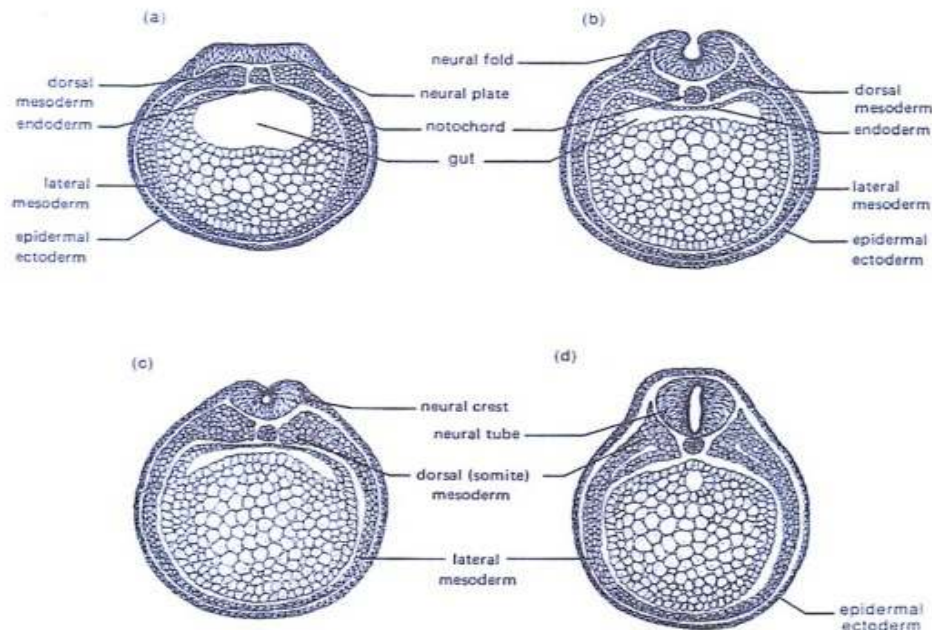


**Εικόνα II.1.4.:** Μορφογενετικές κινήσεις κατά τη γαστριδίωση στο έμβryo βατράχου, διαγράμματα επιμήκων (αριστερά) και πλάγιων τομών (δεξιά) όπου εικονίζονται επιφανειακοί σχηματισμοί. (Johnson & Volpe, 1995)

### 1.2.c. Νευριδίωση (neurulation)

Στο στάδιο αυτό το λεκιθικό πώμα συνεχώς συρρικνώνεται ενώ ταυτόχρονα στο ραχιαίο τμήμα του εμβρύου εμφανίζεται μια πάχυνση και πλάτυνση, η νευρική πλάκα (**neural plate**). Σύντομα αναπτύσσονται πλευρικά και κατά μήκος της νευρικής πλάκας, επάρματα, οι νευρικές πτυχές (**neural folds**). Η νευρική πλάκα αρχίζει να βυθίζεται παράλληλα και κάτω από τις υπερκείμενες στοιβάδες, μετασχηματιζόμενη σε νευρική αύλακα (**neural groove**), ενώ οι νευρικές πτυχές ανυψώνονται περαιτέρω και συστρέφονται αμοιβαία ή μια προς την άλλη, συγκλίνοντας τελικά καθόλου το μήκος τους στην επιμηκυσμένη δομή που θα αποτελέσει την καταβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος, το νευρικό σωλήνα (**neural tube**). Ο σχηματισμός του νευρικού σωλήνα στα περισσότερα σπονδυλόζωα μεσολαβείται με αναδίπλωση του εξωδέρματος. Το έμβryo σε αυτή τη φάση έχει επιμηκυνθεί ελαφρά κατά μήκος του κεφαλουραίου άξονα και καλείται πλέον νευρίδιο (**neurula**). Στο τέλος της νευριδίωσης όλες οι καταβολές των εξωτερικών οργάνων (π.χ. μάτια, πόδια) και των εσωτερικών (π.χ. καρδιά, συκώτι) είτε είναι ορατές είτε αόρατες, είναι οπωσδήποτε καθορισμένες (**determined**). Αμέσως μετά από αυτό το στάδιο η οργανογένεση και η μορφογένεση εξελίσσονται ραγδαία περατώνοντας την εμβρυογένεση, ώστε να μπορέσει ο

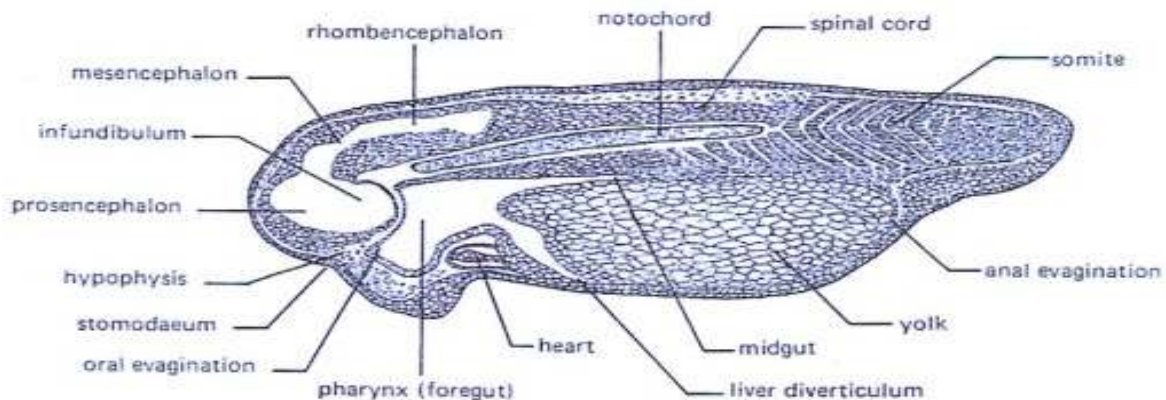
οργανισμός να βγει στο περιβάλλον και να τραφεί ενεργητικά, ευοδώνοντας την εμβρυϊκή του ανάπτυξη ως προνύμφη (γυρίνος, *tadpole*) [Εικ. II.1.2].



Εικόνα II.1.5.: Σχηματισμός νευρικού σωλήνα στο έμβryo του βατράχου (Johnson & Volpe, 1995).

#### 1.2.d. Στάδιο ουραίου φύτρου (*tailbud stage-17*)

Το στάδιο αυτό της όψιμης νευριδίωσης ονομάζεται στάδιο ουραίου φύτρου (*tailbud stage-17*) λόγω της έναρξης σχηματισμού της ουράς του εμβρύου (Kollros et al, 1946, 1952). Περιλαμβάνει τα βασικά χαρακτηριστικά του βασικού σχεδίου σώματος όλων των εμβρύων των σπονδυλοζώων. Το πρόσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα επεκτείνεται σε έκταση και μάζα για να σχηματίσει τον εγκέφαλο. Η κεφαλική περιοχή χαρακτηρίζεται από τρεις πρωταρχικούς σχηματισμούς -τον πρόσθιο εγκέφαλο (*prosencephalon*), το μέσο εγκέφαλο (*mesencephalon*) και το ρομβοειδή εγκέφαλο (*rhombencephalon*). Οι καταβολές του ζεύγους των οφθαλμών (οπτικά κυστίδια) ξεκινούν ως πλευρικές παχύνσεις του προσθίου εγκεφάλου και οι μελλοντικοί φακοί του ματιού προέρχονται από το παρακείμενο επιφανειακό εξώδερμα. Άλλοι χαρακτηριστικοί σχηματισμοί αυτού του σταδίου είναι το στομόδαιο (*stomodaeum*) και η πρωτογενής έδρα (*proctodaeum*), εξωδερμικοί σχηματισμοί που θα εξελιχθούν σε στόμα και έδρα αντίστοιχα. Στο τέλος του σταδίου όλα τα οργανικά συστήματα είναι πλέον παρόντα ως αυτοτελείς ανατομικές καταβολές [Εικ. II.1.6.] (Johnson & Volpe, 1995).



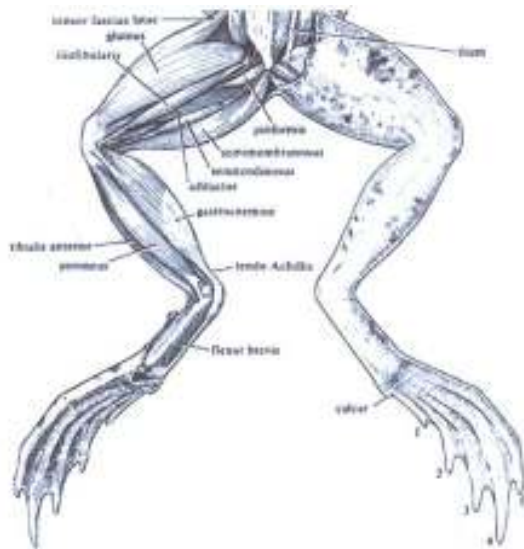
Εικόνα II.1.6.: Επμήκης τομή ενός εμβρύου βατράχου 3 mm (Johnson & Volpe, 1995).

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-2<sup>ο</sup>: Ειδικές γνώσεις ανατομίας και οντογένεσης του είδους *Rana temporaria*****2.1. Το μυοσκελετικό σύστημα των άκρων στα αμφίβια**

Στα αρτίγονα αμφίβια το μυικό σύστημα του άκρου σχηματίζεται μερικώς από τα μυοτόμια, όπως και στα ψάρια. Όλοι οι μύες που διατρέχουν την πλάτη μέχρι το βραχιόνιο μπορούν να σηκώνουν (απάγουν) το πάνω άκρο, με τα πιο πρόσθια μέλη να το έλκουν (προσαγωγή και διαστολή) και τα πιο οπίσθια να το συστέλλουν (απάγουν). Υπάρχει μια κοιλιακή σειρά της οποίας τα πρόσθια μέλη συνεργάζονται με τους οπίσθιους ραχιαίους μύες ως ελκτικοί μύες, παρόλο που ανταγωνίζονται τη δράση της ύψωσης όλου του άκρου. Επιπροσθέτως, πολλοί μύες έχουν μια περιστροφική δράση στο βραχιόνιο και μηριαίο. Ωστόσο, μπορούμε να διακρίνουμε τους μύες του χεριού και του ποδιού σε δυο μεγάλες κατηγορίες:

α) Αρχικώς, σε μια πιο πρόσθια και μια κοιλιακή ομάδα, που εξυπηρετεί την κίνηση του άκρου κυρίως μπροστά και προς τη μέση γραμμή (προσαγωγή και διαστολή), καθώς και την κάμψη των πιο απομακρυσμένων αρθρώσεων.

β) Δευτερευόντως, διακρίνουμε μια πιο οπίσθια, ραχιαία σειρά που κυρίως κινεί το άκρο προς τα πίσω και μακριά από το σώμα (συστολή και απαγωγή) και εκτείνει τις αρθρώσεις (J.Z.Young, 1981).



**Εικόνα II.2.7.:** Ανατομή της *Rana temporaria* από ραχιαία (νωτιαία, *dorsal*) όψη (J.Z.Young, 1981)

Ilium: Λαγόνιο οστό

Tensor fasciae latae: Εκτείνων μυς

Gluteus: Γλουτιαίος

Piriformis: Απιοειδής

Semimembranosus: Ημιμυενώδης

Semitendinosus: Ημιτενοντώδης

Adductor: Προσαγωγός

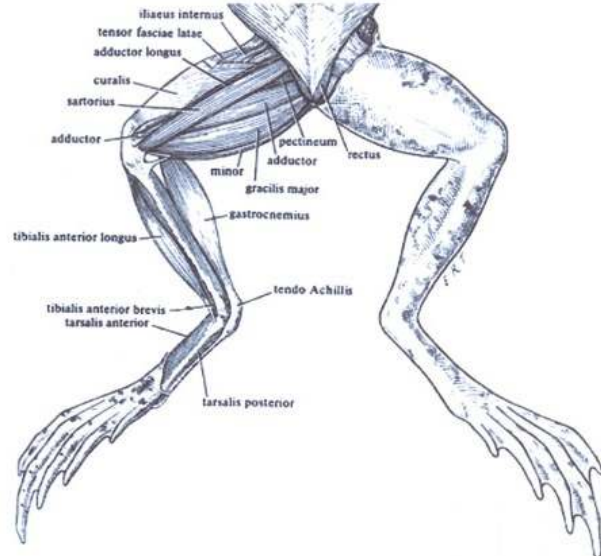
Gastrocnemius: Γαστροκνήμιος

Tibialis anterior: Πρόσθιος κνημιαίος

Peroneus: Περονιαίος

Tendo Achillis: Αχιλλέιος τένοντας

Flexor brevis: Βραχύς καμπτήρας



**Εικόνα II.2.8.:** Ανατομή της *Rana temporaria* από κοιλιακή (*ventral*) όψη (J.Z.Young, 1981)

Adductor longus: Μακρύς προσαγωγός

Cruralis: Μέσος πλατύς μηριαίος

Sartorius: Ραπτικός

Rectus: Ορθός

Pectineum: Κτενίτης

Gracilis major: Μείζων έσω ορθός μηριαίος

Minor: Ελάσσων μυς

Tibialis anterior longus: Μακρύς

πρόσθιος κνημιαίος

Tibialis anterior brevis: Βραχύς

πρόσθιος κνημιαίος

Tarsalis anterior: Πρόσθιος ταρσιαίος

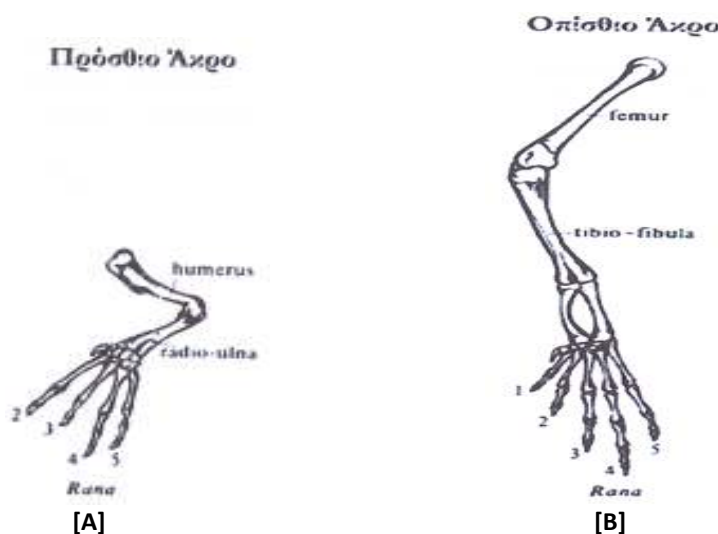
Tarsalis posterior: Οπίσθιος ταρσιαίος



### 2.1.α. Το μυϊκό σύστημα των άκρων στα αμφίβια

Στο πίσω άκρο αναγνωρίζουμε κυρίως πρόσθιους μύες που τραβούν το άκρο εμπρός και κάμπτουν και προσάγουν τις αρθρώσεις, καθώς και οπίσθιους που το τραβούν πίσω, το εκτείνουν και το απάγουν. Στο μηρό οι μύες της πρόσθιας ομάδας είναι ο κτενίτης και οι προσαγωγοί μύες. Ο ραπτικός, ο δικέφαλος, ο ημιμυενώδης και ο ημιτενοντώδης, κυρίως παράγουν κάμψη στο γόνατο και το γοφό. Η πιο οπίσθια και ραχιαία ομάδα μυών περιλαμβάνει το γλουτιαίο, τον εκτείνοντα και τον πολύ μεγάλο μέσο πλατύ μηριαίο (που περιλαμβάνει τον ορθό μηριαίο και τον τρικέφαλο μηριαίο). Αυτός είναι ο κύριος εκτείνων μυς του γόνατου, που υποβοηθείται από τον ισχνό προσαγωγό και τον ημιμυενώδη. Αυτή η έκταση αποτελεί προφανώς σημαντική συνιστώσα της αλτικής ικανότητας του βατράχου.

Οι πιο αξιοσημείωτοι μύες είναι ο πρόσθιος κνημιαίος και ο περονιαίος που εκτείνονται από το μηριαίο οστό στον ταρσό για να κάμψουν την ποδοκνημική άρθρωση. Μακριοί και κοντοί καμπτήρες κινούν τα δάχτυλα του ποδιού, όπως και στο πρόσθιο άκρο. Στο πίσω μέρος της κνημοπερόνης ο γαστροκνήμιος μυς ξεκινά από το μηριαίο οστό για να προσκολληθεί μέσω του Αχίλλειου τένοντα στον ταρσό. Η κύρια δράση του είναι να εκτείνει τον αστράγαλο στις κινήσεις της κολύμβησης και του πηδήματος. Ο οπίσθιος κνημιαίος εκτείνεται από την κνήμη στον ταρσό. Εντός του ποδιού υπάρχει ένα περίπλοκο σύστημα μικρών μυών για κάμψη και λύγισμα των δακτύλων, καθώς και για να απάγει το ένα από το άλλο, ώστε να διευρύνει το δίκτυο αυτό για την κολύμβηση. Το όλο σύστημα είναι σχεδιασμένο για να παράγει τη χαρακτηριστική, ξαφνική, ταυτόχρονη κίνηση έκτασης όλων των αρθρώσεων και των δύο πίσω ποδιών, μέσω της οποίας οι βάτραχοι κολυμπούν στο νερό και πηδούν στην ξηρά. Τα πίσω άκρα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για εναλλακτικές, περιπατητικές κινήσεις, κυρίως σε προνυμφικά στάδια [Εικ. II.1.2.] (J.Z.Young, 1981).



Εικόνα II.2.9.: Πρόσθιο [A] και οπίσθιο [B] άκρο του άνουρου *Rana temporaria*.

Humerus (stylopodium): βραχιόνιο οστό (στυλοπόδιο), ακουμπά στην ωμική ζώνη (girdle),

Radio-ulna (zeugopodium): Radius (κερκίδα) + Ulna (ωλένη), Hand: forelimb autopodium,

Femur (stylopodium): μηριαίο οστό (στυλοπόδιο), ακουμπά στην πυελική ζώνη (pelvis),

Tibio-fibula (zeugopodium): Tibia (κνημιαίο οστό) + Fibula (περόνη) (ζευγοπόδιο), Foot (hindlimb autopodium): tibiale-astragalus (αστράγαλος), fibulare-calcaneum (πτέρνα), phallanges (φάλαγγες), digits (δάκτυλα)

### 2.1.β. Το σκελετικό σύστημα των άκρων στα αμφίβια

Το σχέδιο (pattern) των οστών και των μυών στα πρόσθια (forelimbs) και στα οπίσθια (hindlimbs) άκρα των τετραπόδων διέπεται από εντυπωσιακή εξελικτική σταθερότητα (ή «αδράνεια»), παρά τη διαφορά των μηχανισμών της ανάπτυξής τους, ή την ποικιλοότητα των χρήσεών τους, υποδηλώνοντας τη στερεοτυπία των μορφογενετικών διαδικασιών που εμπλέκονται

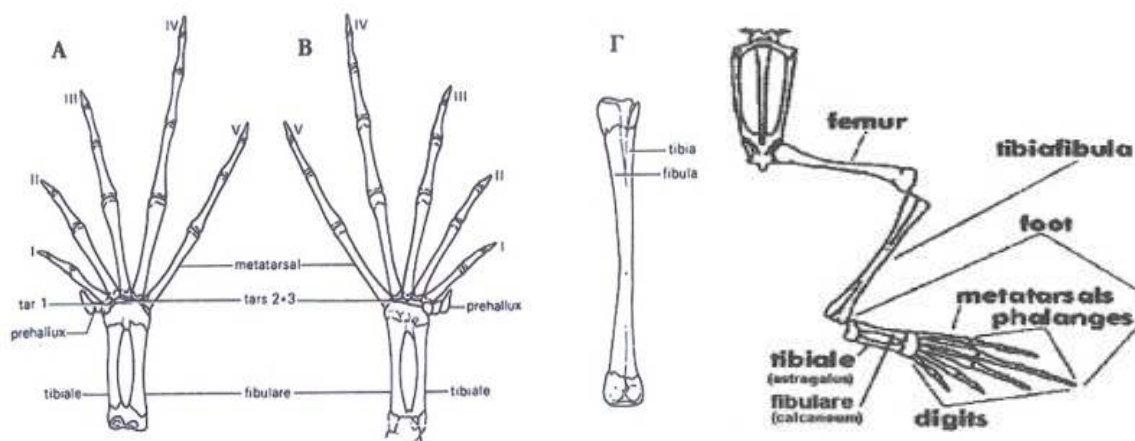
στην οντογένεσή τους. Εικάζεται μάλιστα, ότι στη συνολική οντογενετική διαδικασία που παράγει τα πρόσθια και τα οπίσθια άκρα, υποβόσκει μικρότερη πολυπλοκότητα από όση υπεισέρχεται στην αμφιπλευροσυμμετρική διάπλαση των χειρομορφικών (ή αντιποδικών) ειδώλων τους. Γνωρίζουμε λιγότερα για την καταγωγή (*ontogenetic origin*) του οπίσθιου παρά του μπροστινού ποδιού αλλά είναι και τα δύο τόσο όμοια που για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας μπορούν να εξεταστούν από κοινού. Υπάρχουν σχεδόν πάντα **3** κύριες αρθρώσεις (*joints*) σε κάθε άκρο (*limb*):

A] μια για τη σύνδεσή του στην ωμική (*girdle*) / πυελική ζώνη (*pelvis*) του κορμού,

B] μια για τη σύνδεση του στυλοπόδιου (*stylopodium*), στο ζεύγος οστών του ζευγοπόδιου (*zeugopodium*) μέσω των αρθρώσεων του αγκώνα (*ankle*) και του γόνατου (*knee*) για τα τα πρόσθια και τα οπίσθια άκρα, αντίστοιχα και

Γ] μια για την άρθρωση του ζευγοπόδιου με το αυτοπόδιο (*autopodium*).

Το βασικό οστό του στυλοπόδιου, το βραχιόνιο (*humerus*) / μηριαίο (*femur*), αρθρώνεται με τα δυο οστά του ζευγοπόδιου, τα οποία αντιπροσωπεύονται για το άνω άκρο από την κερκίδα (*radius*) σε πιο πρόσθια (*anterior*) διάταξη και την ωλένη (*ulna*) σε οπίσθια (*posterior*), ενώ για το κάτω άκρο από την κνήμη (*tibio-tibiofibula*, για τα αμφίβια) σε πρόσθιο-κοιλιακή (*anterior-ventral*) θέση και την περόνη (*fibula-tibiofibula*) σε οπίσθιο-νωτιαία (*posterior-dorsal*). Αυτά αρθρώνονται καταληκτικά στα αυτοπόδια του πρόσθιου (καρπός) και του οπίσθιου (ταρσός) άκρου, τα οποία αποτελούνται σε πλήρως ανεπτυγμένη έκπτυξη, από **3** σειρές μικρών οστών, των οποίων η διευθέτηση απαριθμεί **3** στην πλησιέστερη προς τον κορμό (*proximal*) πλευρά, **3** κεντρικά και **5** περιφερικά (*distal*), που συναρμολογούνται μέσω πληθώρας αρθρώσεων με τα δάκτυλα (*digits*), σε παλάμη και πέλμα. Στα αμφίβια με αλτική ικανότητα η κερκίδα και η ωλένη είναι συνενωμένες σε ενιαίο οστό (*radio-ulna*) και τα καρπικά είναι ελαττωμένα σε αριθμό. Υπάρχουν μόνο **4** πραγματικά δάκτυλα, με το πρώτο (αντίχειρας, *digit-I*) να είναι υποπλασμένο. Τα πίσω άκρα είναι επιμηκυσμένα, ευνοϊκά για άλματα. Η κνήμη και η περόνη είναι συνενωμένες (*tibiofibula*) και η πλησιέστερη σειρά ταρσικών έχει μειωθεί σε δύο οστά, ιδιαίτερα επιμηκυσμένα και γνωστά σαν αστράγαλος (*tibiale-astragalus*) και οστό της πτέρνης (*fibulare-calcaneum*). Τα περιφερικά ταρσικά έχουν ελαττωθεί συνολικά σε **3** και φέρουν **5** «αληθινά» δάκτυλα (*digits-I, -II, -III, -IV, -V*), καθώς και ένα επιπλέον (*prehallux*) ([Εικ. II.2.9.], [Εικ. II.2.10.]) (J. Z.Young et al 1981).



**Εικόνα II.2.10.:** Οπίσθια άκρα της *Rana esculenta* (William E. Duellman & Linda Trueb, 1994) [A] Ραχιαία άποψη του δεξιού ποδιού [B] Κοιλιακή άποψη του ίδιου ποδιού [Γ] Δεξιά κνήμη και περόνη (ένα ενιαίο οστό) Autopodium: αυτοπόδιο, Fibulare (calcaneum): οστό της πτέρνης, Tibiale (astragalus): αστράγαλος, Tarsals: οστά ταρσού, Metatarsals: οστά μεταταρσού, Phallanges: φάλαγγες  
Digits: δάκτυλα / -I / -II / -III / -IV / -V  
Prehallux: αντίχειρας (υποπλασμένο δάκτυλο)

## 2.2. Ο Χόνδρος

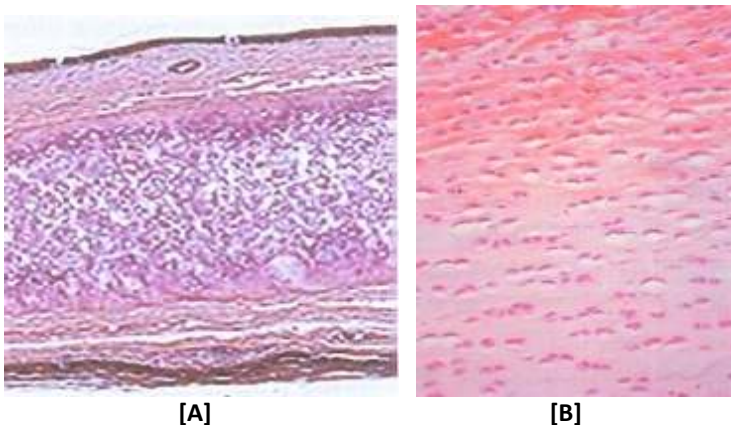
Ο χόνδρος (*cartilage*) είναι μια κατηγορία ερειστικού συνδετικού ιστού που συνιστά το σκελετό του σώματος όλων των σπονδυλόζων κατά τη διάρκεια της εμβρυικής τους ανάπτυξης, ενώ στους χονδριχθύες διατηρείται και στο σκελετό των ενήλικων ατόμων. Κατά την οντογένεση των υπόλοιπων σπονδυλόζων τα χόνδρινα σκελετικά στοιχεία διέρχονται μια αλληλουχία μεταβολών που οδηγούν σε μη αναστρέψιμη οστεοποίηση του χόνδρου, εκτός από ορισμένες ανατομικές θέσεις του σώματος, οι οποίες περιλαμβάνουν το έξω ούς (αυτί), την άκρη της μύτης (ακρορρίνιο), τα ημικρίκια της τραχείας, τους χόνδρους του θωρακικού κλωβού, τους μεσοσπονδύλιους δίσκους. Ο χόνδρινος ιστός περιλαμβάνει τα χονδροκύτταρα και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ, *ECM*). Η θεμέλια ουσία εκκρίνεται από τα χονδροκύτταρα σε τόσο αθρόα ποσότητα ώστε εγκλείονται μέσα στην άφθονη μάζα του μεσοκυτταρικού της υλικού, κατά ένα, δύο ή περισσότερα, σε οριοθετημένες μικρές κοιλότητες που ονομάζονται χόνδρινα έλυτρα (*lacunae*) [Εικ. II.2.12.]. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που τον διακρίνει από άλλους, είναι ότι αποτελεί ιστό μεγάλου βαθμού ομοιογένειας, καθώς δεν εμπεριέχεται στη μάζα του κανένα άλλο είδος ιστού, ούτε νεύρα ούτε αιμοφόρα αγγεία, σε αντίθεση με τον οστίτη ιστό. Όλη η μάζα του χόνδρινου ιστού δεδομένης ανατομικής θέσης, περιβάλλεται από το περιχόνδριο (*perichondrium*), με εξαίρεση τις αρθρικές επιφάνειες ([Εικ. II.2.12.], [Εικ. II.2.13.]). Πρόκειται για τάξη συνδετικού ιστού, εξειδικευμένη για την ιστική ομοιοστασία των χονδροκυττάρων (τροφοδοσία θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου, κλπ), προορισμένη να διασφαλίζει για λογαριασμό τους, την έμμεση πρόσβαση στην απομακρυσμένη τριχοειδική μικροκυκλοφορία. Διακρίνονται τρεις τύποι χόνδρων:

α) ο υαλώδης (*hyaline*) χόνδρος που απαντάται στις αρθρικές επιφάνειες, στη μύτη, στο λάρυγγα, στο φάρυγγα ([Εικ. II.2.12.], [Εικ. II.2.13.]),

β) στον ελαστικό (*elastic*) χόνδρο που απαντάται στο αυτί και στην ευσταγγιανή σάλπιγγα και [Εικ. II.2.11.A.]

γ) στον ινώδη (*fibrocartilage*) χόνδρο που απαντάται στους μεσοσπονδύλιους δίσκους [Εικ. II.2.11.B.].

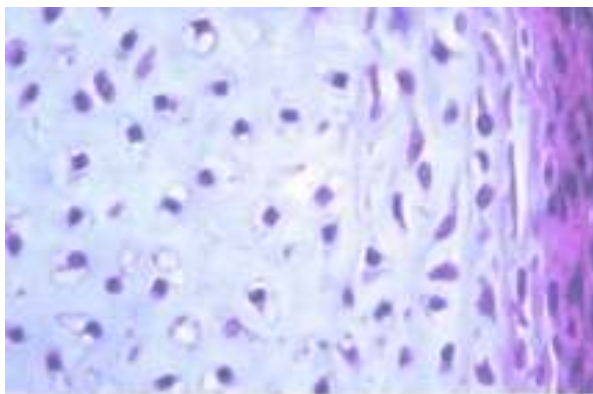
Κύρια λειτουργία του χόνδρου στον ενήλικο οργανισμό, αποτελεί η στήριξη των μαλακών μοριών του σώματος, η απόσβεση κραδασμών και η διευκόλυνση των κινήσεων στις αρθρώσεις, ενώ στον αναπτυσσόμενο οργανισμό συνεισφέρει μορφογενετικά στην αύξηση, μέσω των εξειδικευμένων εμβιομηχανικών ιδιοτήτων του.



**Εικόνα II.2.11.:** Στην αριστερή εικόνα διακρίνεται παρασκεύασμα ελαστικού χόνδρου [A] ενώ στη δεξιά, ο ινώδης χόνδρος από μεσοσπονδύλιο δίσκο (Χρώση *Aniline blue*) [B] (από [www.zoology.ubc.ca/courses/bio](http://www.zoology.ubc.ca/courses/bio)).

Ο χόνδρος κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης ακολουθεί συγκεκριμένη ακολουθία μεταβολών. Αρχικά το παρααξονικό μεσόδερμα (*paraxial mesoderm*) καταμερίζεται σε σφαιροειδείς μάζες, τους σωματίτες. Αυτοί πρωτοεμφανίζονται στο πρόσθιο τμήμα του εμβρύου και σταδιακά συμπληρώνουν την ακολουθία των προσχηματισμένων θέσεων εκατέρωθεν της νωτοχορδής,

προσανατολισμένα προς το ουραίο φύτρο. Στη συνέχεια υφίστανται έναν τύπο «επιθηλιοποίησης» του μεσεγχυματικού φαινότυπου, οπότε τα εξωτερικά κύτταρά τους αποκτούν σφαιρική μορφή, συνδέονται με σφικτοδεσμούς και υπαλείφονται από βασική μεμβράνη (φιμπρινονεκτίνη, λαμίνη, γλυκοζαμινογλυκάνες). Κάποιοι παράγοντες, μεταξύ των οποίων και οι γλυκοζαμινογλυκάνες επάγουν τον πολλαπλασιασμό στα κύτταρα των σωμιτών που είναι κατανεμημένα προς την κοιλιακή πλευρά του εμβρύου, με συνέπεια την απώλεια της επιθηλιακής μορφολογίας και την ανάκτηση των μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών. Αυτή η ομάδα σωμιτών (κοιλιακά) οργανώνει τον σκληροτόμο, τα κύτταρα του οποίου μετακινούνται και περιτυλίζουν το νευρικό σωλήνα και τη νωτιαία χορδή και εκκρίνουν κολλαγόνο τύπου-II και γλυκοζαμινογλυκάνες (θεική χονδροϊτίνη), ξεκινώντας τη δημιουργία του χόνδρου. Η μεσοκυτταρική ουσία που εναποθέτουν διατηρεί τα κύτταρα στο διαφοροποιημένο αυτόν (εκκριτικό) φαινότυπο μέσω μηχανισμών ανάδρασης, που εξασφαλίζουν την προοδευτική αλληλοαπομάκρυνση, μέσω της οποίας κατανέμονται σε δυο –τοπογραφικά ξεχωριστούς- υποπληθυσμούς. Όσα κύτταρα συσσωρεύονται γύρω από το κέντρο της κατανομής, διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα, ενώ αυτά που απωθούνται προς τα εξώτερα όρια της περιμέτρου της, διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες, οι οποίοι εμπλουτίζουν τη μεσοκυτταρική ουσία κυρίως με κολλαγόνο τύπου-I και τύπου-II, με την οποία συναποτελούν το περιχόνδριο [Εικ. II.2.13.]. Ο υποπληθυσμός αυτών που παρεμβάλλονται ανάμεσά τους σε μια περιφερειακή μεταβατική ζώνη, ενέχει φαινότυπο χονδροβλαστών [Εικ. II.2.12.] (Κουσουλάκος, 2002).



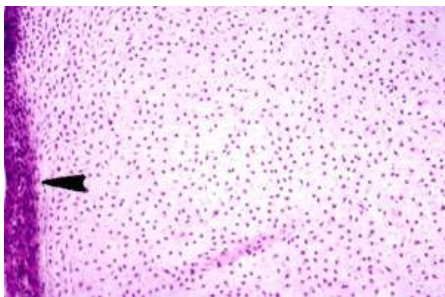
**Εικόνα II.2.12.:** Υαλώδης χόνδρος. Διακρίνεται το σφαιροειδές σχήμα των χονδροκυττάρων (μέσα στα χόνδρινα έλυτρα) προς το εσωτερικό του χόνδρου, και τα ατρακτοειδή χονδροκύτταρα προς την περιφέρεια (Σιάπικα, 2006).

### 2.3. Ο υαλώδης χόνδρος

Στον υαλώδη χόνδρο η μεσοκυτταρική ουσία αποτελείται κατά **40%** από κολλαγόνο τύπου-II, και κατά **60%** από θεική χονδροϊτίνη, θεική κερατάνη, πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες (κυρίως χονδρονεκτίνη) καθώς και νερό δεσμευμένο στα αρνητικά φορτία των γλυκοζαμινογλυκανών. Τα χονδροκύτταρα εκκρίνουν ορισμένες ουσίες όπως είναι το κολλαγόνο τύπου-II και η φιμπρινονεκτίνη, η οποία συνδέει τα χονδροκύτταρα με τα ινίδια κολλαγόνου και μαζί με τη θεμέλια ουσία δημιουργούν ένα ικρίωμα το οποίο παρέχει στον υαλώδη χόνδρο τις ειδικές εμβιομηχανικές ιδιότητές του. Συγκεκριμένα, σε κάθε μόριο υαλουρονικού οξέος προσδένονται **100** περίπου μόρια πρωτεογλυκανών μέσω συνδετικών πρωτεϊνών. Κάθε μόριο πρωτεογλυκάνης αποτελείται από μία κεντρική πρωτεΐνη που φέρει συνδεδεμένα υπό μορφή πλευρικών αλυσίδων, πολυάριθμα μόρια θεικής κερατάνης και θεικής χονδροϊτίνης. Φυσικό επακόλουθο είναι η παρουσία στο μοριακό αυτό σύμπλεγμα σημαντικού αριθμού αρνητικών φορτίων, που συνεπάγονται τη μεγαλύτερη δυνατή «ανοιχτή» (ή χωροπληρωτική) στερεοδιάταξη εξαιτίας των ομόσημων ηλεκτροστατικών αλληλοαπωθήσεων και τη συνεπακόλουθη συμπλήρωση του διαθέσιμου χώρου, με άφθονα μόρια νερού. Η αυξημένη σχετική εφυδάτωση προσδίδει στο



μοριακό και κυτταρικό ικρίωμα του ιστού ιδεώδεις μηχανοελαστικές ιδιότητες. Ειδικότερης σημασίας πρωτεΐνη είναι η χονδροασβεστίνη, με συμβολή στην εφάλατωση του υαλώδους χόνδρου. Είναι σύνηθες «τεχνητέυμα» (*artefact*) κατά την προετοιμασία ιστολογικών παρασκευασμάτων χόνδρου, τα χονδροκύτταρα και η μεσοκυττάρια ουσία να συρρικνώνονται, αφήνοντας ευμεγέθεις κενούς χώρους στα χόνδρινα έλυτρα, μορφολογία που δεν επιβεβαιώνεται στο ζωντανό ιστό. Ωστόσο είναι επίσης παρατηρημένο ότι ορισμένα χόνδρινα έλυτρα είναι άδεια λόγω απομάκρυνσης των χονδροκυττάρων ([Εικ. II.2.12.], [Εικ. II.2.13.]) (Κουσουλάκος, 2002). Ο υαλώδης χόνδρος, εκτός από αυτόν στις αρθρικές περιοχές, περιβάλλεται όπως έχει ήδη αναφερθεί από το περιχόνδριο, το οποίο διελαύνεται από αιμοφόρα αγγεία και νεύρα, ενώ άφθονοι εμφωλευμένοι ινοβλάστες παράγουν τα κολλαγόνα τύπου-I και τύπου-II. Ο υαλώδης χόνδρος αναπτύσσεται και με ενδιάμεση (*interstitial growth*) και με αποθετική αύξηση (*appositional growth*). Κατά την ενδιάμεση αύξηση τα κύτταρα στις κεντρικότερες θέσεις της μάζας του χόνδρου πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν το μεσοκυτταρικό υλικό. Κατά την αποθετική αύξηση, οι ινοβλάστες του περιχονδρίου μετατρέπονται σε χονδροβλάστες. Οι χονδροβλάστες αυτοί, αφού συνθέσουν τη μεσοκυτταρική ουσία που τους περιβάλλει, διαφοροποιούνται περαιτέρω σε χονδροκύτταρα. Η ανάπτυξη και η λειτουργία του χόνδρου επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από ορμόνες. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση των γλυκοζαμινογλυκανών επιταχύνεται από την αυξητική ορμόνη, τη θυροξίνη και την τεστοστερόνη. Αντίθετα, η κορτιζόλη και η οιστραδιόλη επιβραδύνουν τη σύνθεσή τους (Κουσουλάκος, 2002).



**Εικόνα II.2.13.:** Εμβρυικός υαλώδης χόνδρος. Ελαφρώς βαμμένη διακρίνεται η μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία και μεγάλος αριθμός νεαρών χονδροκυττάρων που εγκλείονται μέσα στα χόνδρινα έλυτρα. Το βέλος δείχνει τον ινώδη συνδετικό ιστό του περιχόνδριου. Φωτογραφία από αναπτυσσόμενο πρόσθιο άκρο ποντικού (Χρώση Αιματοξυλίνη-Εωσίνη, μεγέθυνση 100x).

## 2.4. Η οστεογένεση

Οστεογένεση (*ossification*) καλείται η διαδικασία δημιουργίας και αύξησης των οστών στα σπονδυλόζωα. Τα οστά προέρχονται από εμβρυικά μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία ονομάζονται οστεογονικά (*osteogenic*) κύτταρα. Τα περισσότερα οστά σε ένα σπονδυλόζωο είναι μεσοδερμικής προέλευσης. Μερικά όμως από τα οστά του κρανίου είναι εκτοδερμικής προέλευσης και σχηματίζονται από τα κύτταρα της νευρικής κρηπίδας (*neural crest*). Τα οστεογονικά κύτταρα στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε ώριμα οστεοκύτταρα. Εάν κοντά στα οστεογονικά κύτταρα αναπτυχθούν αιμοφόρα αγγεία, τότε τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται απ' ευθείας σε οστεοβλάστες μέσω της υμενογενούς οστεογένεσης. Εάν πάλι βρίσκονται μακριά από αιμοφόρα αγγεία τότε αρχικά μετατρέπονται σε χονδροβλάστες, οι οποίοι στη συνέχεια της διαφοροποίησης καταστρέφονται και αντικαθίστανται από οστεοβλάστες μέσω της χονδρογενούς οστεογένεσης.

Τα πλατιά οστά του εγκεφαλικού και του προσωπικού κρανίου, όπως είναι το μετωπικό, το κροταφικό, το βρεγματικό τμήμα του ινιακού οστού, τμήματα των άνω και κάτω γνάθων, προκύπτουν μέσω της υμενογενούς οστεογένεσης. Τα υπόλοιπα τμήματα των γνάθων και το κάτω τμήμα του ινιακού προκύπτουν μέσω της χονδρογενούς οστεογένεσης, ενώ τα υπόλοιπα οστά του κορμού και των άκρων προκύπτουν κατόπιν οστέωσης ενός χόνδρινου προτύπου.



#### 2.4.α. Υμενογενής οστεογένεση

Στις θέσεις όπου πρόκειται να σχηματισθούν τα υμενογενή οστά, όπως είναι τα κρανιακά, παρατηρούνται μεμβρανώδεις σχηματισμοί αποτελούμενοι από αστεροειδή μεσεγχυματικά κύτταρα. Κοντά στα αιμοφόρα αγγεία τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται σε οστεοβλάστες, οι οποίοι συνθέτουν και εκκρίνουν τη θεμέλια ουσία, που περιλαμβάνει κολλαγόνο και μία γλυκοπρωτεΐνη, υπεύθυνη για την εναπόθεση αλάτων ασβεστίου και φωσφόρου. Τα κύτταρα που εγκλείονται στην εφαιλωμένη θεμέλια ουσία ονομάζονται οστεοκύτταρα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω των οστικών σωληνίσκων. Οι πρώτες μικρές εστίες οστίτη ιστού καλούνται ακίδες ενώ όταν αυξηθούν σε μέγεθος καλούνται δοκίδες. Χαρακτηριστικό του ανατομικού τους εντοπισμού, είναι ότι εμφανίζονται σαν νησίδες που περιβάλλονται από μεγάλα βασεόφιλα κύτταρα, τους οστεοβλάστες.

Όταν οι δοκίδες αυξηθούν σε μέγεθος και αριθμό ώστε να έρθουν σε επαφή με παρακείμενες και να συντηχθούν, τότε το οστό αποκτά διάτρητη-πορώδη υφή και χαρακτηρίζεται ως σπογγώδες. Στα κενά διέρχονται αιμοφόρα αγγεία, ενώ νέα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα μετατρέπονται σε μυελό των οστών. Τώρα η επιφάνεια των δοκίδων είναι επικαλυμμένη με οστεοβλάστες και με γεναρχικά οστεογονικά κύτταρα. Αυτά διαιρούνται και μετατρέπονται σε οστεοβλάστες οι οποίοι βρίσκονται στην περιφέρεια της νησίδας οστεοποίησης και έτσι το οστό αυξάνει χάρη σε συγκεκριμένες αποθέσεις θεμέλιας ουσίας.

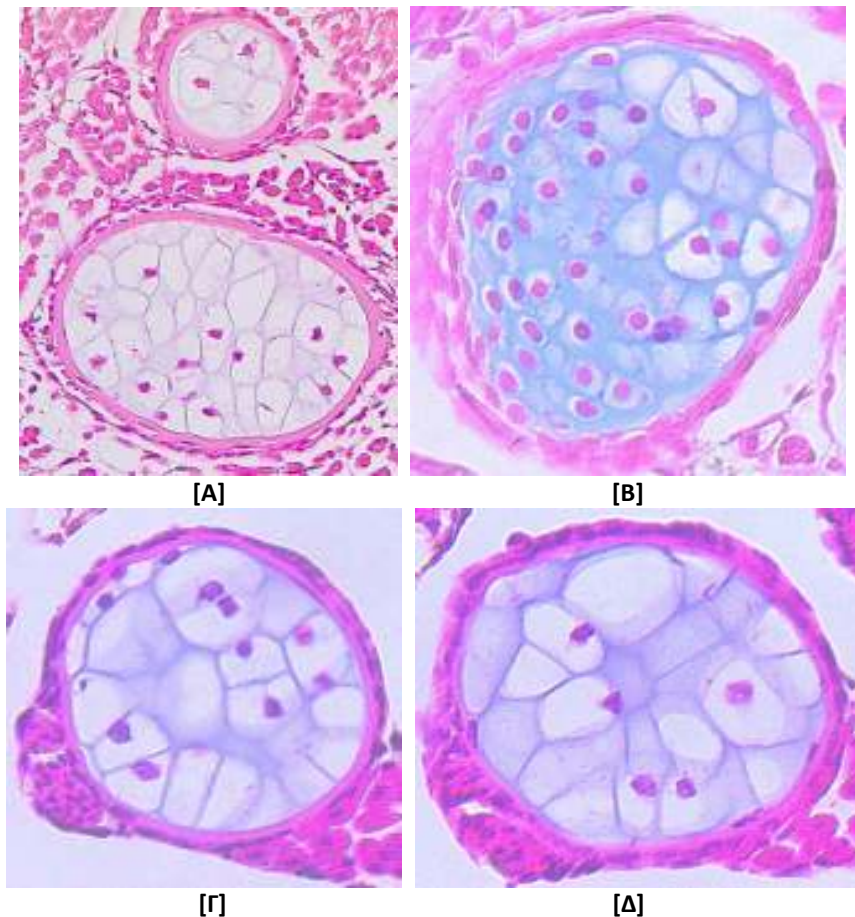
Όσο νέος οστίτης ιστός αποτίθεται σε ορισμένα σημεία, παλαιός οστίτης ιστός απομακρύνεται από άλλα σημεία. Η απομάκρυνση αυτή γίνεται από ειδικά, πολυπύρηνια κύτταρα, τους οστεοκλάστες. Η διαδικασία της μορφογένεσης του οστού καλείται οστική αναδόμηση (*bone remodelling*) και περιλαμβάνει συντονισμένη αποικοδόμηση και δημιουργία οστίτη ιστού. Έτσι, μεγαλώνουν οι δοκίδες και το οστό μετατρέπεται από σπογγώδες σε συμπαγές. Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ σπογγώδους και συμπαγούς οστίτη ιστού εντοπίζεται στην ποσοστιαία αναλογία μεταξύ μαλακού συνδετικού ιστού και σκληρού οστίτη ιστού.

Στα συμπαγή οστά ο μαλακός συνδετικός ιστός είναι ελάχιστος. Ακόμη, τα συμπαγή οστά κατανέμουν κεντρικά τις περιοχές της σπογγώδους μάζας λόγω της ειδικής διαδικασίας μετατροπής του σπογγώδους οστού σε συμπαγές. Η βαθμιαία αυτή μετατροπή οδηγεί στη δημιουργία των σωλήνων Havers. Οι σωλήνες Havers είναι μικρά κεντρικά κανάλια που φέρουν ένα έως δύο αιμοφόρα αγγεία και υπενδύονται από οστεογονικά κύτταρα, ενώ γύρω από κάθε σωλήνα Havers διατάσσονται οστεοκύτταρα σε επάλληλα συγκεντρικά ελάσματα. Κάθε τέτοια δομή καλείται αβέρσιο σύστημα ή οστεώνας (Κουσουλάκος, 2002).

#### 2.4.β. Χονδρογενής οστεογένεση

Σε αντίθεση με την υμενογενή, κατά τη χονδρογενή οστεογένεση τα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται αρχικά σε χονδροβλάστες οι οποίοι στη συνέχεια της πορείας διαφοροποίησης καταστρέφονται και δίνουν γένεση στους οστεοβλάστες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα χονδρογενούς οστεογένεσης είναι τα μακρά οστά, κυρίως στα άνω και κάτω άκρα (*limbs*) του σώματος.

Επιλέγοντας ως πειραματικό σύστημα την καταβολή (ή φύτρο) του άκρου (*limb*), στις κυτταροβριθείς μάζες που είναι διαταγμένες κατά μήκος του προσθιοπίσθιου (*Anterior-Posterior*) άξονα ασυμμετρίας, όπου και επίκειται να σχηματισθεί ο σκελετός του, πραγματοποιείται βαθμιαία μια διαδικασία αναδιευθέτησης που συγκλίνει στη συμπύκνωση της συνάθροισης των μεσεγχυματικών κυττάρων (*mesenchymal condensation*), τα οποία διαφοροποιούνται περαιτέρω σε χονδροβλάστες εξαιτίας της απουσίας παρακείμενων αιμοφόρων αγγείων. Οι χονδροβλάστες παράγουν και εκκρίνουν κολλαγόνο. Με τον τρόπο αυτό ο σκελετός του εμβρύου διαμορφώνεται αρχικά από υαλώδη χόνδρο που περιβάλλεται από περιχόνδριο. Κατά την αποθετική αύξηση του χόνδρινου σκελετού, οι χονδροβλάστες που βρίσκονται στο μέσο (ή κέντρο) του σκελετικού στοιχείου υφίστανται υπερτροφία και έτσι αυξάνει το μέγεθος τους.



**Εικόνα II.2.14.:** Τοπολογία ζωικού μορφογενετικού πεδίου: Οι φωτογραφίες απεικονίζουν εγκάρσιες διατομές των οντογενετικών καταβολών από δάκτυλα άκρου γυρίνου (*limb bud*), στο στάδιο που τα κύτταρα των μεσεγχυματικών συμπυκνώσεων (*mesenchymal condensations*) αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε προχονδροκύτταρα. Στην πάνω δεξιά εικόνα [**Εικ. II.14.Β.**] διακρίνεται η συσσωρευμένη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ, *ECM*) χρωματισμένη γαλάζια, γνώρισμα ενδεικτικό των περισσότερο όψιμων φάσεων διαφοροποίησης. Στην κυτταρική μορφολογία διακρίνονται τα γεωμετρικά στοιχεία που αντιστοιχούν σε αδρά πολυγωνικά περιγράμματα, ακμές και κορυφές. Η κανονική (ή εύτακτη) διευθέτηση των κυττάρων σε πρωιμότερες φάσεις της διαφοροποίησης συνοψίζει το μορφογενετικό αντίκτυπο της πολυγωνικής σχηματοποίησής τους και είναι άρρηκτα συσχετισμένη με την απουσία (ΕΘΟ).

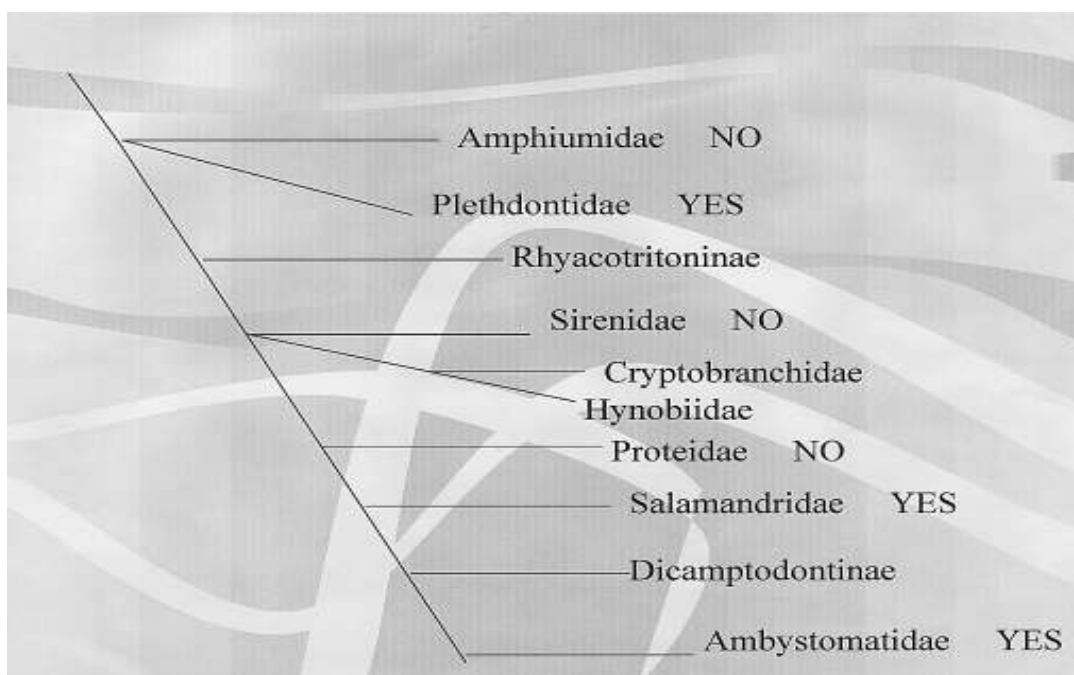
Από την άλλη, η θεμέλια ουσία εφαιλάτνεται και γίνεται σκληρή και αδιαπέραστη από τα τροφικά συστατικά και το οξυγόνο. Ως συνέπεια ο χόνδρος αρχίζει να αποικοδομείται και δημιουργούνται στην περιφέρεια κενά όπου αναπτύσσονται αιμοφόρα αγγεία. Στη συνέχεια, τα κύτταρα του περιχόνδριου μετατρέπονται παρουσία οξυγόνου σε οστεοβλάστες που αρχίζουν να παράγουν οστίτη ιστό. Το περιχόνδριο τώρα χαρακτηρίζεται ως περιόστεο. Πρέπει να σημειωθεί πως η διάκριση των οστών σε υμενογενή και χονδρογενή αφορά μόνο στα οστά που πρωτοσχηματίζονται κατά την οντογένεση. Μετά τον αρχικό τους σχηματισμό, και στους δύο τύπους συμβαίνει συνεχής αναδόμηση (*remodelling*). Ο καινούργιος οστίτης ιστός που σχηματίζεται και αποτίθεται είναι ίδιος και στους δύο τύπους οστών (Κουσουλάκος, 2002).

Συνοψίζοντας, η προχονδρική μεσεγχυματική συμπύκνωση (*prechondral mesenchymal condensation*) είναι η ειδική ανατομική διάπλαση που κατανέμεται καθόλο το μήκος του προσθιοπίσθιου (*Anterior-Posterior*) άξονα ασυμμετρίας των αναπτυσσόμενων και / ή των αναγεννώμενων άκρων, η οποία οργανώνει τις καταβολές όλων των εξειδικευμένων σκελετικών στοιχείων του, δηλαδή του στυλοποδίου, του ζευγοποδίου και του αυτοποδίου, που αντιπροσωπεύονται αντίστοιχα για τα πρόσθια (*forelimbs*) και τα οπίσθια άκρα (*hindlimbs*), από:

βραχίονα / μηρό, του πήχυ / κνήμη, του καρπού / ταρσό και φάλλαγγες των δακτύλων. Η χαρακτηριστική πολυεδρική μορφολογία την οποία υιοθετούν τα προχονδρικά κύτταρα στις μεσεγγυματικές συμπυκνώσεις, συγκεντρώνει τις περισσότερες από τις βασικές τοπολογικές ιδιότητες, τις οποίες εισηγείται η παρούσα εργασία στην ενότητα που πραγματεύεται τη θεωρία των κελλωτών στερεών. Η απεικόνιση των προχονδρικών αυτών κυττάρων στο επίπεδο των εγκάρσιων ιστολογικών τομών, αντανακλά τη γεωμετρική προβολή της *in vivo* τριδιάστατης στερεοδιάταξης του κυτταρικού σχήματος και της κυτταρικής διεύθετησης, παρέχοντας μια συλλογή από εποπτικά κριτήρια για σύγκριση με τις *in vitro* διδιάστατες (ή ομοεπίπεδες) παραλλαγές της μορφολογίας και των προτύπων-μοτίβων συνάθροισης των μεσεγγυματικών κυττάρων (*WJ-MSA aggregates*) που απομονώνονται από τη Βαρτόνιο γέλη (*Wharton's Jelly*) ανθρώπινου ομφάλιου λώρου.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ-3<sup>ο</sup>: Παραλληλισμοί της αναγέννησης με τη φυλογένεση και με την οντογένεση****3.1. Ο ΠΑΡΑΛΛΗΛΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗΣ**

Η αναγεννητική ικανότητα και η φυλογενετική πολυπλοκότητα, είθισται να παραλληλίζονται η μια προς την άλλη υπό τη μορφή μιας γενικευμένης -μη συγγραμμικής- συσχέτισης, περίπου όπως την καταδεικνύει η καθιερωμένη σύγκριση της αναγεννητικής δυναμικής μεταξύ οστέιχθύνων και αμφιβίων. Οι δυο αυτές ομοταξίες, στο βαθμό που αντιπροσωπεύουν τα εκτοθερμικά σπονδυλόζωα, χαρακτηρίζονται από παρόμοιους μηχανισμούς δευτερογενούς ανάπτυξης όσον αφορά στην καρκινογένεση. Ωστόσο, όταν συγκρίνονται με κριτήριο την απόδοση της αναγεννητικής δυναμικής τους, τα (ουροδελή) αμφίβια υπερτερούν θεαματικά (Ζηλάκος, 1989; Okamoto et al., 1986, 1987; Wallace et al., 1978, 1979, 1981; Goss et al., 1969, 1974). Σε αυτή τη δυσανάλογη σύγκριση αντιπαραβάλλεται μια διαφορετική εκδοχή του παραλληλισμού μεταξύ αναγεννητικής δυναμικής και φυλογενετικής πολυπλοκότητας, ο οποίος τείνει σε μια αρνητική συσχέτιση, στο βαθμό που η διαειδική σύγκριση περιορίζεται στις απλούστερες ταξινομικές βαθμίδες των μεταζώων (Ζηλάκος, 1989; Μαυρόγιαννου, 2003; Slack et al., 1980; Tassava and Goss, 1966). Με άλλα λόγια οι ποιοτικές και ποσοτικές παράμετροι των αναγεννητικών φαινομένων που αποτελούν αντικείμενο σύγκρισης στον παραλληλισμό αυτό, αποδίδουν τόσο καλύτερες επιδόσεις, όσο απλούστερες είναι οι βαθμίδες βιολογικής οργάνωσης και όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός της φυλογενετικής συγγένειας των ειδών που συγκρίνονται. Εξάλλου, ακόμη και κατά τη σύγκριση μεταξύ αντιπροσώπων από πολύ συγγενικά είδη, υπεισέρχεται μια ποικιλία ειδοειδικών χαρακτηριστικών (π.χ. τα διαφορετικά ενδαιτήματα), που σε τελική ανάλυση εξατομικεύουν τους σηματοδοτικούς μοριακούς μηχανισμούς που υιοθετούνται από τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (π.χ. βλαστηματικά, γεναρχικά, κλπ) (Ζηλάκος, 1989; Illingworth et al., 1974; Holder et al., 1981; Tsonis et al., 1985a, 1995, 1996, 1999, 2000; Beauchemin et al., 1998; Stocum et al., 1991).



**Εικόνα II.3.15.:** Σχηματοποιημένες φυλογενετικές σχέσεις των υποτάξεων που απαρτίζουν την τάξη των ουροδελών αμφιβίων (maximum parsimony analysis of aligned ribosomal RNA sequences, Larson, 1991), **YES** = παρατηρηθείσα αναγέννηση άκρου σε ενήλικα άτομα, **NO** = μη παρατηρηθείσα αναγέννηση άκρου σε ενήλικα άτομα). Δεν αναδεικνύεται κανένα ευλογοφανές κλαδιστικό πρότυπο που να συσχετίζει τις αναγεννητικές ικανότητες των υποτάξεων (Illingworth et al., 1974; Tsonis et al., 1985a, 1995, 1996, 1999, 2000).

### 3.2. Ο ΠΑΡΑΛΛΗΛΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗΣ

Από την άλλη, συντρέχει σωρεία λόγων που δικαιολογούν τον παραλληλισμό μεταξύ των επιμέρους διεργασιών (π.χ. αποδιαφοροποίηση, *dedifferentiation*) που είναι κοινές και για τα αναγεννητικά φαινόμενα και για την πρωτογενή ανάπτυξη (οντογένεση, *outgrowth*) (Ζηλάκος, 1989; Okamoto et al., 1986, 1987; Wallace et al., 1978, 1981). Πιθανώς οι διαφορές που διαπιστώνονται σε τέτοιες συγκρίσεις, αντιπροσωπεύουν περισσότερο παραλλαγές βασικότερων κυτταροβιολογικών μηχανισμών (π.χ. κυτταρικής πρόσφυσης, *cell adhesion*, *cell-cell conjugation*, ή καθοδηγούμενης κυτοκίνησης, *oriented cytokinesis*), που υπαγορεύονται από την διαφορική έκφραση ενός περιορισμένου φάσματος γονιδίων (π.χ. ομοιωτικών), παρά από αυτοτελείς αναπτυξιακές διαδικασίες.

#### 3.2.1. Οι μορφογενετικές αλληλεπιδράσεις που είναι συσχετισμένες με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Οι παραλλαγές αυτές σε βασικούς κυτταροβιολογικούς μηχανισμούς, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας προσεγγίζονται από μια σκοπιά που συνάδει με την αναπτυξιακή έννοια της «πληροφορίας θέσης» (*positional information*) και τις διαχωρίζει σε δυο κατηγορίες:

1] σε εκείνες που αφορούν τις «*τρέχουσες αλληλεπιδράσεις*» μεταξύ κυττάρων, των οποίων η φυσική παρουσία αποτελεί τετελεσμένο (οριστικοποιημένο) γεγονός και

2] σε εκείνες που αφορούν τις «*επικείμενες αλληλεπιδράσεις*» μεταξύ κυττάρων, των οποίων η φυσική παρουσία αποτελεί δυνητικό γεγονός, δηλαδή η παραγωγή τους ως μιτωτικά προϊόντα τελεί υπό εκκρεμότητα, ή με άλλα λόγια η κυτταροδιαίρεση που είναι προορισμένη να τα παραγάγει αναμένεται να συντελεσθεί σε ένα προσεχές αναπτυξιακό στιγμιότυπο.

Ένα τέτοιο παράδειγμα αντιπροσωπεύεται στον αναπτυξιακό καθορισμό (*determination*) ο οποίος υπαγορεύει και καθοδηγεί κατά την πρώιμη οργανογένεση, την αντιδιαμετρική διευθέτηση των επικείμενων βλαστομεριδίων στο ζωικό και φυτικό πόλο του βλαστιδίου του αμφιβίου, μέσω μιας προσχηματισμένης διαβάθμισης (*gradient*) των μορφογόνων σινιάλων του ωαρίου. Η προϋπάρχουσα αυτή τοπογραφική κατανομή, καθώς μεταβάλλεται σταδιακά από τους υποπληθυσμούς των βλαστομεριδίων που πολλαπλασιάζονται ολοένα και πιο ασύγχρονα και από τις κυτταρικές μεταναστεύσεις που σηματοδοτούν τη γαστριδίωση, συνοψίζει ένα στερεότυπο πρότυπο ή μοτίβο αλληλεπιδράσεων μορφογενετικού χαρακτήρα, το οποίο στοιχειοθετεί την πολύπλοκη αναπτυξιακή διαδικασία που αποδίδεται με τον όρο: χάραξη σχεδίου (*pattern formation*). Έτσι στα πρωιμότερα οντογενετικά στάδια των μεταζώων, η καθοριστική σημασία του χρονισμού των κυτταρικών διαιρέσεων διαφαίνεται από το μορφογενετικό αντίκτυπο, που οι διαφορετικοί ρυθμοί πληθυσμιακής επέκτασης (*expansion*) των βλαστομεριδίων του ζωικού και του φυτικού πόλου, επιφέρουν σύντομα στη μορφολογία του βλαστιδίου. Ο γενετικά καθορισμένος αυτός ετεροχρονισμός που διέπει τον πολλαπλασιασμό των ζωικών και φυτικών βλαστομεριδίων, σε απώτερη ανάλυση απορρέει από τον εξειδικευμένο τύπο κυτταροδιαίρεσης που αντιπροσωπεύει η αυλάκωση (*cleavage*). Ο αναπτυξιακός ρόλος της εμπλουτίζεται από τη μορφογόνο δυναμική που της εξασφαλίζουν, αφενός η επίσπηση του κυτταρικού κύκλου μέσω συρρίκνωσης των **G1** και **G2** φάσεων (και αντιπροσωπεύει τη χρονική μεταβλητή της χάραξης σχεδίου) και αφετέρου το καθεστώς της προϋπάρχουσας τοπογραφικής κατανομής των μορφογενετικών καθοριστών στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου (που αντιπροσωπεύει την τοπογραφική μεταβλητή της χάραξης σχεδίου) (Harrison, 1917, 1921; Steinberg, 1963, 1978; Faber et al., 1971). Οι δυο αυτές μορφογενετικές συνιστώσες του πρώιμου κυτταρικού πολλαπλασιασμού συναποτελούν την ικανή και αναγκαία συνθήκη για τον ταχύρυθμο και εύτακτο καταμερισμό των μορφογόνων σινιάλων στο κυτταρόπλασμα των βλαστομεριδίων, μια συνθήκη που δεν επρόκειτο να τελεσφορήσει ποτέ αν μεσολαβούνταν από τις τυπικές μιτωτικές διαιρέσεις.

Ο μορφογενετικός ρόλος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εμπλουτίζεται σταδιακά με περισσότερη πολυπλοκότητα (Koussoulakos et al., 1992, 1993), καθώς τις εύπλαστες τοπογραφικές αλληλεπιδράσεις των βλαστομεριδίων, διαδέχονται οι οψιμότερες ανατομικές αλληλεξαρτήσεις, που σταθεροποιούνται μετά την ταξίθτηση των τριών βλαστικών δερμάτων στην εμβρυική επιφάνεια κατά την οργανογένεση. Αναφέρεται ενδεικτικά μόνο το παράδειγμα της εναλλαγής των προτύπων της μορφογόνου επίδρασης του **FGF-2** στα μόρια προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας, σε συνάρτηση με τη διαδοχή των σταδίων της οργανογένεσης, επειδή σχετίζεται με την αποκλίνουσα διαφοροποίηση μεταξύ μεσεγχυμαγγειοβλαστικού φαινότυπου (*mesenchymangioblast*) και αιμαγγειοβλαστικού (*hemangioblast*) φαινότυπου, που υπεισέρχεται στην οντογένεση των βλαστικών κυττάρων (Stocum et al., 1984).

### **3.2.2. Οι μορφογενετικές αλληλεπιδράσεις που είναι συσχετισμένες με τον κυτταρικό φαινότυπο**

Αυτός ακριβώς ο μορφογενετικός χαρακτήρας της κυτταροδιαίρεσης, αντιπροσωπεύει πιθανώς την πιο καίρια κυτταρολογική ιδιότητα, βάσει της οποίας η συνιστώσα του πολλαπλασιασμού κατά τη δευτερογενή ανάπτυξη (αναγεννητική), είναι εφικτό να συγκριθεί (ή να αντιπαραβληθεί) με την αντίστοιχη συνιστώσα της πρωτογενούς (οντογενετικής). Εκτός από αυτή την κυτταρολογική σκοπιά, επισημαίνονται τρεις κύριες διαφορές μεταξύ αναγέννησης και οντογένεσης, οι οποίες αφορούν το μορφογενετικό ρόλο που ασκεί γενικότερα ο φαινότυπος των αδιαφοροποίητων κυττάρων:

1] το φαινόμενο της αποδιαφοροποίησης (*dedifferentiation*): τερματικά διαφοροποιημένα κύτταρα χάνουν τη φαινοτυπική τους ταυτότητα (ιστοειδικό χαρακτήρα), επανεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο, υιοθετούν αδιαφοροποίητο φαινότυπο και πολλαπλασιάζονται, παράγοντας θυγατρικά κύτταρα που ακολούθως διαφοροποιούνται προς τους «πεπατημένους» ή προς εναλλακτικούς φαινότυπους,

2] το φαινόμενο της «μεταδιαφοροποίησης» (ή «υπερδιαφοροποίησης», *transdifferentiation*), μια εκδοχή της οποίας εμπλέκεται στην αναγέννηση του παγκρέατος, όπου διαφοροποιημένα κύτταρα (*acinar and / or duct cells*) αλλάζουν την ταυτότητα του καθορισμού τους προς εκείνη των β-κυττάρων που εκκρίνουν ινσουλίνη. Εναλλακτικές εκδοχές του φαινομένου παρατηρούνται επίσης στις περιπτώσεις αναγέννησης του άκρου και του οφθαλμικού φακού των ουροδελών αμφιβίων (DeBoth et al., 1970; Bohn et al., 1965, 1976; Bart et al., 1988; Tsonis et al., 1985a, 1995, 1996, 1999, 2000; Iten et al., 1973, 1975; Stocum et al., 1975, 1979; Pyribram et al., 1926, 1931; Milosevic et al., 1924). Επίσης με τη φαινοτυπική αυτή μεταβολή, φαίνεται να σχετίζονται ορισμένα χαρακτηριστικά της καρκινικής εξαλλαγής (μεταστατικός φαινότυπος) (Ζηλάκος, 1989),

3] τη μεσολάβηση ολοδύναμων αδιαφοροποίητων κυττάρων εμβρυικού φαινότυπου που κινητοποιούνται από δυο ξεχωριστούς εφεδρικούς μηχανισμούς, αυτόν που ενεργοποιεί τους νεοβλάστες και δεσπόζει σε κατώτερες φυλογενετικές βαθμίδες (Mukai et al., 1978; Martell et al., 1984), καθώς κι εκείνον που επάγει τον πολλαπλασιασμό στελεχιαίων γεναρικών κυττάρων (*stem cells*), υποκαθιστώντας το ρόλο των νεοβλαστών σε ανώτερες ταξινομικές ομάδες (Koussoulakos et al., 1992, 1993),

Ειδικότερα, παραμένει αμφιλεγόμενος ο ρόλος των νεοβλαστών ως πολυδύναμων, αδιαφοροποίητων κυττάρων (στελεχιαίων ή γεναρικών κυττάρων, *stem cells*) εμβρυικού φαινότυπου, που συνιστούν αποθεματική εφεδρεία κατανεμημένη στο παρέγχυμα των μεταζώων υποδεέστερων ταξινομικών βαθμίδων με δυνατότητες μορφαλλακτικής αναγέννησης. Αυτό υποδηλώνει η πληθώρα των συνώνυμων όρων στη βιβλιογραφία (Κουσουλάκος, 2002). Κατά τη μορφάλλαξη (*morphallaxis*), ένα πληθυσμιακό κλάσμα από τα εναπομείναντα, διαφοροποιημένα

κύτταρα αποδιαφοροποιούνται και αναδιατάσσονται στο επίπεδο της χειρουργικής τομής, όπου και επανεξειδικεύονται για τον επανασχηματισμό του ακρωτηριασθέντος σωματικού τμήματος, με στρατολόγηση και συμμετοχή νεοβλαστών. Αυτή είναι μια ειδική διαδικασία συμπλήρωσης του αυτοτελούς οργανισμού, που όμως δε συνοδεύεται και από την αποκατάσταση του αρχικού του μεγέθους, εξαιτίας της περιορισμένης συμμετοχής της μίτωσης (που κανονικά θα αναπλήρωνε με νεοδημιουργούμενα κύτταρα την απώλεια ιστικής μάζας). Η όλη διεργασία μορφολογικής αποκατάστασης του ατόμου εκτυλίσσεται είτε ως συνάρτηση (*Hydra sp.*) είτε ανεξάρτητα (*Planaria sp.*) από τον προσανατολισμό της χειρουργικής τομής, μέσω φαινοτυπικών μεταβολών που συνοδεύονται από εκτεταμένη γεωμετρική αναδιάταξη κυτταρικών πληθυσμών (Κουσουλάκος, 2002; Kalthoff, 1966; Korschelt et al., 1927; Needham et al., 1950). Ειδικά στην πλανάρια οι νεοβλάστες αντιπροσωπεύουν προγονικά κύτταρα των πολυάριθμων αδένων, ενώ για τα αποδιαφοροποιούμενα και εν'συνεχεία επαναδιαφοροποιούμενα κύτταρα, η καταγωγή τους ανάγεται ως επί το πλείστον στο μυϊκό ιστό. (Brockes et al., 1994, 2002; Mukai et al., 1978; Martell et al., 1984, Morgan et al., 1901, Korschelt et al., 1927; Ando et al., 1989; Vorontsova et al., 1960).

Ο ρόλος των δορυφόρων (*satellites*) ως αδιαφοροποίητων αποθεματικών κυττάρων κατανεμημένων στο γραμμωτό (σκελετικό) μυϊκό ιστό, αναδεικνύεται και στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα γεναρχικά κύτταρα (*stem cells*) αφορούν ειδικά το έντερο, το χόνδρο, το οστό, την επιδερμίδα, το ήπαρ και το μυ, καθώς τα περισσότερα όργανα στερούνται τέτοια κύτταρα (Kalthoff, 1966; Illingworth et al., 1974).

Μερικές περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται συχνά ως συστήματα μελέτης της αναγέννησης, συμπεριλαμβάνουν δακτυλιοσκώληκες και πλατυέλμινθες, αντιπροσώπους (υδρόζωα) του φύλου των κνιδόζων, το είδος *C. elegans*, είδη του στροβιλιστικού πλατυέλμινθα, πλανάρια (*P. lugubris*, *P. maculata*, *P. gonoccephala*, *Dendrocoelum lacteum*) (Mukai et al., 1978; Martell et al., 1984, Korschelt et al., 1927), από τους οστεϊχθείς το *Zebrafish* (Brockes & Kumar, 2002), ουροδελή και άνουρα αμφίβια, πτηνά και ο άνθρωπος (Illingworth et al., 1974). Αξιοσημείωτο είναι ότι σε έξι φύλα, μεταξύ των οποίων Τροχόζωα και Νηματώδεις, δεν παρατηρούνται αναγεννητικά φαινόμενα (Brockes et al., 2002). Αυτοί θεωρούνται ως οι σημαντικότεροι παράγοντες στους οποίους αποδίδονται:

1] η κανονικότητα (ή συστηματικότητα) που διέπει τη συχνότητα των αναγεννητικών φαινομένων, την οποία επιδεικνύει σε οποιαδήποτε οντογενετική περίοδο, μονάχα ένα περιορισμένο φάσμα ειδών (ουροδελή αμφίβια, καρκινοειδή δεκάποδα) (Okada et al., 1996),

2] η ευρέως κυμαινόμενη συχνότητα των αναγεννητικών περιστατικών που προκύπτουν αυτόματα σε πολύ ευρύτερες ταξινομικές βαθμίδες (οστεϊχθείς, άνουρα αμφίβια, αμνιωτά) (Brockes et al., 2002; Vorontsova et al., 19),

3] η σποραδικότητα των περιπτώσεων αναγέννησης, την οποία εκδηλώνει τυχαία η πλειονότητα των ειδών,

4] οι ποικίλες παρεκκλίνουσες μορφές των προϊόντων αναγέννησης (ετερομορφισμοί) από την πρότυπη (Slack et al., 1980; Tassava and Goss, 1966) δηλαδή την κανονική) ανατομική δομή από τις οποίες ενδιαφέρουν στην παρούσα εργασία, αποκλειστικά τα υπεράριθμα άκρα στις προνούμφες των άνουρων αμφιβίων.

### 3.2.3. Πορίσματα

Αυτές οι παρατηρήσεις παραπέμπουν σε αδρές γενικεύσεις που αποκτούν ισχύ κανόνα, κατά περίπτωση και μόνο στο βαθμό που περιορίζονται στο εύρος στενά συγγενικών ειδών απλούστερης βιολογικής οργάνωσης:

1/α] Ο ΚΑΝΟΝΑΣ: οργανισμοί απλούστερης φυλογενετικής ταξινόμησης εκδηλώνουν αποδοτικότερη αναγέννηση από πολυπλοκότερους.

1/β] Η ΕΞΑΙΡΕΣΗ: η ομοταξία των οστεϊχθύων εκδηλώνει αναγέννηση, υποδεέστερη αυτής των αμφιβίων.

2/α] Ο ΚΑΝΟΝΑΣ: σε δεδομένη φυλογενετική βαθμίδα τα είδη με την υψηλότερη αναγεννητική δυναμική συνιστούν μειονότητα.

2/β] Η ΕΞΑΙΡΕΣΗ: την αποδοτικότερη αναγέννηση την επιδεικνύει η πλειονότητα της τάξης των ουροδελών εν'αντιθέσει προς ό,τι ισχύει για τα άνουρα που την εκδηλώνει η μειονότητα της τάξης και μόνο για περιορισμένα οντογενετικά στάδια (Slack et al., 1980; Tassava and Goss, 1966)

3/α] Ο ΚΑΝΟΝΑΣ: σε δεδομένη φυλογενετική βαθμίδα την υψηλότερη αναγεννητική δυναμική εκδηλώνουν τα αρχαιότερα είδη. Η τάξη των ουρόδηλων, ως αρτίγονα λιποσπόνδυλα αμφίβια (διατήρηση τμημάτων της νωτιαίας χορδής μεταξύ των σπονδυλικών σωμάτων, οστεογένεση σπονδύλων χωρίς μεσολάβηση μεταβατικής χονδρογένεσης) είναι αρχαιότερη της τάξης των άνουρων, τα οποία χαρακτηρίζονταν ως ασπιδοσπόνδυλα.

3/β] Η ΕΞΑΙΡΕΣΗ: ο άνθρωπος μεταξύ των αμνιωτών (Brookes et al., 2002; Illingworth et al., 1974).

4/α] Ο ΚΑΝΟΝΑΣ: στις νεαρότερες ηλικίες τα περιστατικά αναγεννώνται καλύτερα από τα αντίστοιχα πιο παρωχημένων ηλικιών.

4/β] Η ΕΞΑΙΡΕΣΗ: οι ενήλικες σαύρες αναγεννώνται καλύτερα από τις -σεξουαλικά- ανώριμες.

Η δυνατότητα παραγωγής υπεράριθμων άκρων στα άνουρα αμφίβια αποκαλύπτει μια στερεοτυπία όσον αφορά στον αριθμό των υπεράριθμων δομών, για την οποία διαπιστώθηκε επιπρόσθετα και μια ποσοτική εξάρτηση από τα εξωγενώς χορηγούμενα ή τα ενδογενή ρετινοειδή. Η μακρόχρονη διερεύνηση αυτής της κανονικότητας επεκτάθηκε και στα αίτια που ελέγχουν τη σχετική ανατομική διάταξη των υπεράριθμων δομών, με αποτέλεσμα να αποσαφηνισθούν λεπτομέρειες των οντογενετικών μηχανισμών που παράγουν τη φυσιολογική δομή των άκρων, οι οποίες διαπιστώθηκε ότι σχετίζονται με τους γεωμετρικούς και τους τοπολογικούς περιορισμούς που διέπουν τις ανατομικές ασυμμετρίες και συμμετρίες των αμφιπλευροσυμμετρικών οργανισμών. Τέτοια πειραματικά δεδομένα συνέβαλλαν στην εισήγηση της έννοιας του μορφογενετικού πεδίου για την περιγραφή της αυτοοργάνωσης του φύτρου (*limb bud*) των αναπτυσσόμενων άκρων και του βλαστήματος (*blastema*) των αναγεννώνμενων άκρων (French et al., 1976; Stocum et al., 1991; Holder et al., 1981).

Υπεράριθμα από αναγέννηση προκύπτουν ελεγχόμενα στο εργαστήριο κατόπιν χειρουργικών επεμβάσεων ή / και χορήγησης εξωγενών ρετινοειδών, αλλά και αυθόρμητα στο πεδίο (στη φύση) ως αποτέλεσμα των εξής παραγόντων:

- 1] υπερίσχυση ακτινοβολία
- 2] μόλυνση από παρασιτικούς σκώληκες (*Riberoia sp.*)
- 3] ορμονομιμητικές ουσίες (παρασιτοκτόνα, κλπ)
- 4] τυχαιότητα (απροσδιόριστα αίτια)



### 3.3. Δευτερογενή αναπτυξιακά φαινόμενα – Αναγέννηση

Το φαινόμενο της -εκ των υστέρων- επανέναρξης της μιτωτικής δραστηριότητας σε έναν κυτταρικό πληθυσμό, καλείται δευτερογενής ανάπτυξη (*Secondary Development*). Το δευτερογενές αναπτυξιακό φαινόμενο που αναλύεται στην παρούσα εργασία είναι η αναγέννηση (*Regeneration*). Τον όρο αναγέννηση τον χρησιμοποιούμε μόνο σε ώριμους οργανισμούς, (Κουσουλάκος, 2002). Με αυτόν τον όρο χαρακτηρίζουμε την αναδημιουργία τμημάτων του ζωικού και φυτικού σώματος, που χάθηκαν κατόπιν τυχαίου ή σκοπούμενου (πειραματικού) τραυματισμού. Όταν ένας ιστός κατά τη φυσιολογική λειτουργία ενός οργάνου φθείρεται αλλά ταυτόχρονα αποκαθίσταται ποσοτικά και ποιοτικά, τότε μιλάμε περί φυσιολογικής αναγέννησης σε ανανεούμενους ιστούς. Αυτός ο τύπος αναγέννησης στηρίζεται στην ύπαρξη γεναρχικών κυττάρων (*stem cells*). Αυτά είναι μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία αφού διαιρεθούν δίνουν ένα γεναρχικό κύτταρο και ένα ακόμη, το οποίο είτε συνεχίζει μιτωτικές διαιρέσεις πριν από την τελική διαφοροποίηση (οπότε χαρακτηρίζεται ως προγονικό, *progenitor*) είτε ακολουθεί αμέσως πορεία προς τελική διαφοροποίηση (*terminal differentiation*). Γενικά, η πλειονότητα των οργάνων ενός ενήλικου ατόμου δε διαθέτει απόθεμα γεναρχικών κυττάρων.

Η αναγέννηση ιστών και οργάνων είναι μια βιολογική διαδικασία η οποία παρατηρείται σε όλα τα ζωικά φύλα. Φαίνεται ότι οι οργανισμοί που βρίσκονται χαμηλά στην εξελικτική κλίμακα παρουσιάζουν εντονότερες αναγεννητικές ικανότητες από πιο εξελιγμένα ζώα, καθώς επίσης ότι τα νεαρότερα άτομα ενός είδους αναγεννώνται καλύτερα από τα ενήλικα. Υπάρχουν όμως και εντυπωσιακές εξαιρέσεις όπως είναι για παράδειγμα, τα ουροδελή αμφίβια που εκδηλώνουν πολύ μεγαλύτερες αναγεννητικές ικανότητες σε σύγκριση με τα περισσότερα από όλα τα άλλα είδη. Πάντως μεταξύ των αμνιωτών ζώων, τις καλύτερες αναγεννητικές ικανότητες παρουσιάζει μάλλον ο άνθρωπος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μορφαλλακτικής αναγέννησης συναντάμε σε ζώα όπως η Ύδρα (*Hydra*), ενώ δυο πολλά υποσχόμενα συστήματα-μοντέλα μελέτης του φαινομένου είναι ο στροβιλιτικός σκώληκας (*planaria*) (Mercader et al., 1999, 2000; Lawrence et al., 2000; Galindo et al., 2000; Hayashi et al., 1999; Serrano et al., 1997) και η αναγέννηση του πτερυγίου στον οργανισμό *Zebrafish* (Brookes & Kumar, 2002). Η ικανότητα αναγέννησης ακρωτηριασμένων άκρων εμφανίζεται επίσης αρκετά αναπτυγμένη στα άνουρα αμφίβια. Βλαστήματα άνυρων αμφιβίων σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο μπορούν να αναγεννηθούν με πλήρη λειτουργική-μορφολογική αποκατάσταση του άκρου. Αντίθετα, βλαστήματα στα τελικά στάδια ανάπτυξης του άκρου, χάνουν κάθε αναγεννητική ικανότητα. Η ικανότητα αναγέννησης στα ζώα αυτά φθίνει σε συνάρτηση με την ευόδωση των οντογενετικών σταδίων και αυτή η συνθήκη συνδέεται με τη βαθμιαία έκπτωση της ικανότητας επανέκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) (Stocum et al., 1991; Gardiner et al., 2002). Έτσι, στα ενήλικα άνουρα αμφίβια δεν παρατηρείται αναγέννηση στα ακρωτηριασμένα άκρα, αν και κατά την ανάπτυξη των τραυματισμένων ιστών παρατηρείται αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ωστόσο χωρίς να συνοδεύεται και από μορφογένεση της συσσωρευμένης μάζας.

#### 3.3.1. Παρατηρήσεις επί της αναγέννησης των άκρων στα αμφίβια

##### 3.3.1.α. Η ΑΥΤΟΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΟΛΛΟΥΜΕΝΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΑΚΡΩΤΗΡΙΑΣΜΟΥ

Η πλέον εντυπωσιακή περίπτωση αναγέννησης είναι εκείνη κατά την οποία το τμήμα που αποκόπηκε από κάποιο όργανο ξαναδημιουργείται στην ίδια θέση, με πλήρη μορφολογική και λειτουργική αποκατάσταση. Η αναγέννηση αυτή καλείται **επιμορφική (epimorphic)** ή **τελική (terminal)** και η ιδανική εκδοχή της αντιπροσωπεύεται στα αξιοθαύμαστα φαινόμενα της αναγέννησης άκρων στα ουροδελή (ή ουρόδηλα) αμφίβια, κατόπιν χειρουργικού (ή φυσικού, δηλαδή στο πεδίο) ακρωτηριασμού. Ο ρυθμός της αναγέννησης (από 1 μέχρι 3 μήνες) εξαρτάται από το είδος του ζώου, την ηλικία του και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η ταχύτητα αυτή δε σχετίζεται με τη διατροφή αλλά εξαρτάται από τον ανατομικό εντοπισμό της ακριβούς θέσης

ακρωτηριασμού (Κουσουλάκος, 2002). Οι τρεις κυτταρικοί τύποι που διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στη διαδικασία της αναγέννησης είναι οι ινοβλάστες, τα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα της επιδερμίδας (Stocum et al., 1991; Gardiner et al., 2002).

Στην επιφάνεια ακρωτηριασμού του άκρου ενός ουροδελούς αμφιβίου, κύτταρα από την **βλαστική στοιβάδα** της περιφερικής επιδερμίδας απελευθερώνονται από την κανονική τους θέση στις παρυφές του κολοβώματος, μεταναστεύουν και εντέλει επικαλύπτουν με εντατικό πολλαπλασιασμό ολόκληρη την επιφάνεια της τομής, περιβάλλοντας πλήρως το τραύμα. Τα κύτταρα αυτά (επιθηλιακής προέλευσης) σε πολύ σύντομο διάστημα σχηματίζουν ένα κυτταροβριθές πολύστοιβο στρώμα, το **τραυματικό επιθήλιο (wound epithelium)**. Ο αναντικατάστατος ρόλος του στην πρόοδο της αναγέννησης, αναδεικνύεται στα πειράματα της παρεμπόδισης του σχηματισμού του, είτε της επανειλημμένης απομάκρυνσής του ή ακόμη, της αντικατάστασής του με επιθήλιο άλλης ανατομικής περιοχής, καθώς όλα οδηγούν σε ματαίωση της αναγέννησης άκρου. Στο μεταξύ, φαγοκύτταρα κατατρώγουν τους νεκρωτικούς ιστούς του τραύματος ενώ καθώς διάφορες υδρολάσες αποικοδομούν τα μεσοκυτταρικά υλικά, διαφοροποιημένα κύτταρα των παρακείμενων ιστών υπεισέρχονται σε διαδικασίες **αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation)**, με αποτέλεσμα να υιοθετούν εμβρυϊκούς φαινότυπους. Τα αποδιαφοροποιημένα πλέον κύτταρα πολλαπλασιάζονται εντατικά και συσσωρεύουν μια κυτταροβριθή μάζα, το **μεσοδερμικό βλάστημα (mesodermal blastema)** όπου επικρατεί ο **μεσεγχυματικός φαινότυπος**. Αυτό μαζί με το τραυματικό επιθήλιο, συνιστούν το **αναγεννητικό βλάστημα (regenerative blastema)**. Στη συνέχεια, με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επαναδιαφοροποίηση και μορφογένεση, οργάνωνεται και διαπλάθεται το νέο άκρο («αναγέννημα», *regenerate*) (Κουσουλάκος, 2002). Στο ακόλουθο διάγραμμα γίνεται μια σύγκριση του φαινομένου της αναγέννησης (*regeneration*) σε σχέση με τη φυσιολογική ανάπτυξη (*outgrowth*) του άκρου.

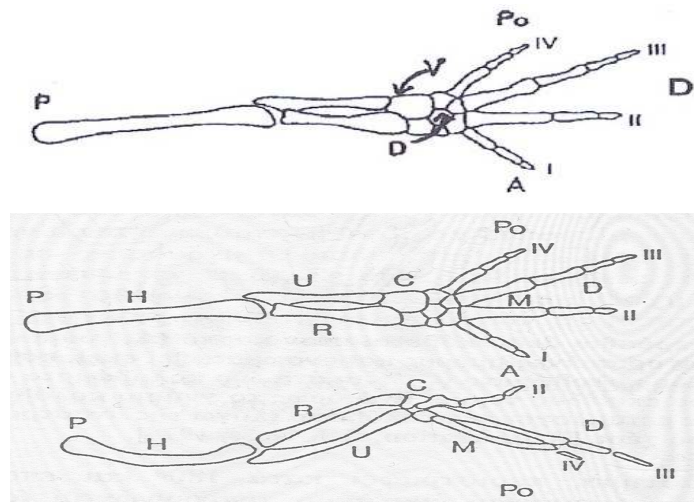


Εικόνα II.3.16.: Σύγκριση μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς ανάπτυξης (Gardiner et al., 2002)

### 3.3.2. Παρατηρήσεις επί της μορφογένεσης που υπεισέρχεται στην αναγέννηση των άκρων στα αμφίβια

#### 3.3.2.α. Ο ΑΝΤΙΚΤΥΠΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ ΣΤΗ ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΙΕΥΘΕΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΞΟΝΩΝ ΑΣΥΜΜΕΤΡΙΑΣ

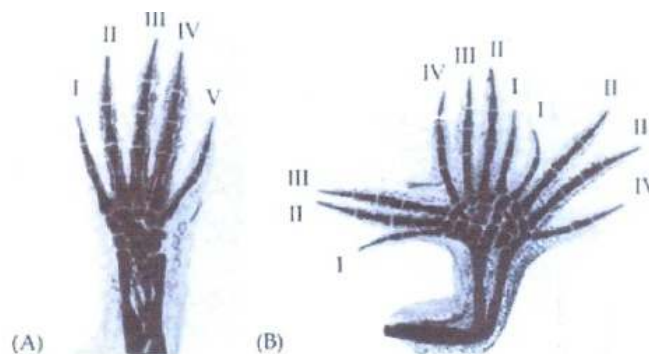
Τα επιμέρους γεγονότα που συγκλίνουν στην (επιμορφική) αναγέννηση ενός κανονικού άκρου και η διαδοχή τους στο χώρο και στο χρόνο είναι αυστηρά προγραμματισμένα και αυτορυθμιζόμενα, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η δημιουργία ενός πλήρους -μορφολογικά και λειτουργικά- άκρου. Το άκρο των σπονδυλοζών χαρακτηρίζεται από τρεις άξονες ασυμμετρίας, στην αναδιάταξη των οποίων αποσκοπούν οι πειραματικοί χειρισμοί των μεταμοσχεύσεων που πραγματοποιούνται σε άκρα αμφιβίων. Ο άξονας που ενώνει τον ώμο με τα δάχτυλα ονομάζεται εγγύς-μακράν (*Proximo-Distal*, *Proximal-Distal*, [**P-D**]), αυτός που περνά από τον «αντίχειρα» προς το μικρό δάχτυλο καλείται προσθιοπίσθιος (*Anterior-Posterior*, [**A-P**]), ενώ αυτός που περνά από τη ράχη του χεριού προς την παλάμη είναι ο ραχαιοκοιλιακός (*Dorsal-Ventral*, [**D-V**]) [Εικ. II.3.17.].



**Εικόνα II.3.17.: [ΠΑΝΩ ΕΙΚΟΝΑ]** Μπροστινό άκρο αμφιβίου: εγγύς-μακράν (Proximo-Distal axis, **[P-D]**): Ενώνει τον ώμο με τα δάχτυλα, προσθιοπίσθιος (Antero-Posterior axis, **[A-P]** ή **[A-Po]**): Περνά από τον αντίχειρα (**A**), προς το μικρό δάχτυλο (**Po**), ραχαιοκοιλιακός (Dorso-Ventral axis, **[D-V]**): Περνά από τη ράχη του χεριού προς την παλάμη. **[ΚΑΤΩ ΕΙΚΟΝΑ]** Αντιπαραβολή προς το σκελετό άκρου πτηνού (Μουκούλη, 2003).

### 3.3.2.b. Ο ΣΤΟΧΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ

Από τις πολυάριθμες έρευνες που έχουν διεξαχθεί, εξαντλώντας τις δυνατότητες των χειρουργικών συνδυασμών στο πλαίσιο της μεταμόσχευσης άκρων στα αμφίβια, καθώς και τις πιθανές παραλλαγές στα αποτελέσματά τους σε αναπτυσσόμενα και αναγεννώμενα άκρα, επελέγησαν μόνο δυο είδη μεταμοσχεύσεων για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, οι ομόπλευρες (*ipsilateral*) και οι ετερόπλευρες (*contralateral*) μεταμοσχεύσεις. Η επιλογή αυτή δικαιολογείται στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας από το γεγονός ότι παράγουν ισοδύναμα αποτελέσματα από αναγεννητικής σκοπιάς, με την έννοια ότι το άκρο (*regenerate*) που αναγεννάται φέρει υπεράριθμες δομές, των οποίων η σχετική ανατομική διεύθυνση παρέχει, αφενός πληροφορίες για την ταξινόμηση των αναγεννητικών περιπτώσεων και αφετέρου δεδομένα για τον έλεγχο των θεωριών περί μορφογένεσης, που αναλύονται στη συνέχεια (Carlson B.M., 1975; Bryant & Iten, 1976).

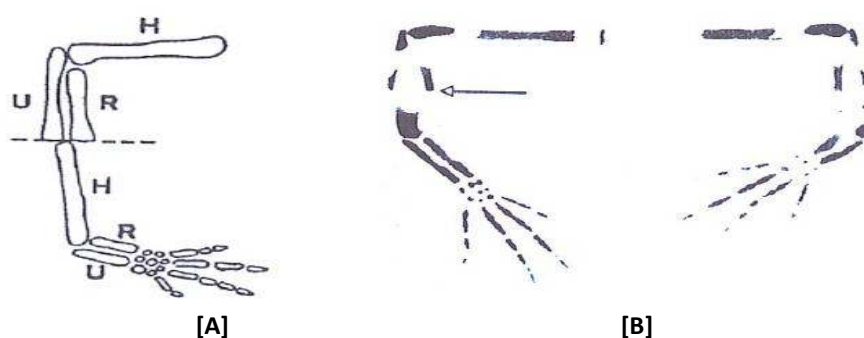


**Εικόνα II.3.18.: (A)** Ακτινογραφίες από ετερόπλευρη μεταμόσχευση (*contralateral transplantation*). Μάρτυρας: Τα πέντε δάχτυλα του πίσω δεξιού ποδιού της σαλαμάνδρας έχουν σχηματιστεί φυσιολογικά μετά από αποκοπή του βλαστήματος και επανανοτοθέτησή του στο αναγεννώμενο κολόβωμα χωρίς περιστροφή. **(B)** Το άκρο που προέκυψε μετά από τοποθέτηση ενός μοσχεύματος από το φυτό του αριστερού πίσω ποδιού, πάνω στο κολόβωμα του δεξιού μετά από περιστροφή ως προς τον εγγύς-μακράν (*Proximo-Distal*, **[P-D]**) άξονα (με ισοδύναμη διατύπωση, κατόπιν αναστροφής του προσθιοπίσθιου (*Antero-Posterior*, **[A-Po]**) άξονα) (Βλάχου, 2006).

### 3.3.2.c. Η ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΜΟΡΦΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΚΑΝΟΝΑ ΑΚΡΑΙΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ (“distal transformation rule”, “distalization rule”)

Ένα αξιοσημείωτο φαινόμενο που κίνησε την περιέργεια των επιστημόνων ήταν το γεγονός ότι τα κύτταρα του βλαστήματος δημιουργούν πάντοτε δομές που κείνται πέραν της θέσης ακρωτηριασμού (προς την ανατομική κατεύθυνση «μακράν»). Δηλαδή αν ακρωτηριάσουμε στον πήχη, τα κύτταρα του βλαστήματος δεν κάνουν (υπό φυσιολογικές συνθήκες) ποτέ το λάθος να φτιάξουν το βραχίονα αλλά στερεότυπα δίνουν μορφογένεση σε πήχη, καρπικά, κ.λ.π.. Το φαινόμενο αυτό είχε τέτοια καθολική ισχύ ώστε έγινε γνωστό ως **κανόνας του ακραίου μετασχηματισμού** (“**Rule of Distal Transformation**”). Η κυριότερη αφορμή για τη διατύπωση αυτού του κανόνα υπήρξε το κλασικό πλέον πείραμα αναστροφής του μοσχεύματος, ως προς το κολόβωμα του άκρου. Ωστόσο, συνδυαστικά πειράματα που συμπεριέλαβαν και τις τερατογόνες επιδράσεις παραγόντων όπως τα εξωγενώς χορηγούμενα ρετινοειδή, αποκάλυψαν τη δυνατότητα παραβίασης του κανόνα του ακραίου μετασχηματισμού (“**Distal Transformation Rule**”, “**distalization rule**”). Γενικά, περιπτώσεις κατά τις οποίες το αναγεννημένο μέλος ή εξάρτημα (**regenerate**) δεν είναι «ακριβές αντίγραφο» αυτού που απομακρύνθηκε, χαρακτηρίζονται με τον όρο **ετερομόρφωση** (**heteromorphosis**). Από την ποικιλία των ετερομορφικών παραλλαγών, στην παρούσα εργασία ενδιαφέρουν εκείνες που αφορούν τα υπεράριθμα άκρα (**supernumerary regenerates**).

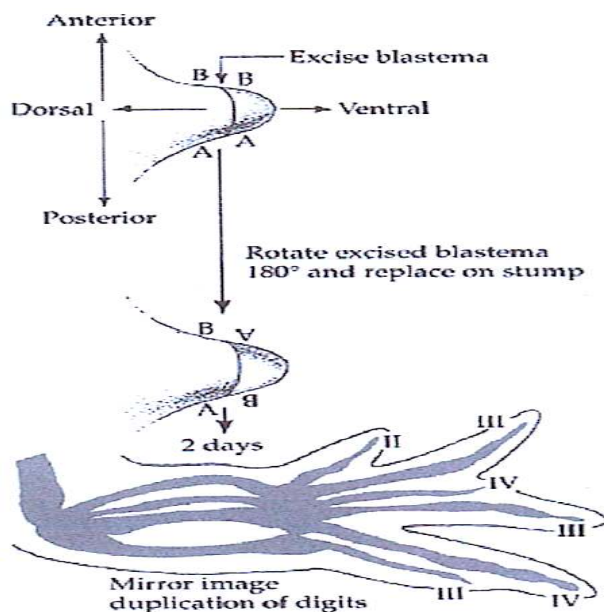
Χορήγηση βιταμίνης-A (Vit-A) είτε (εξωγενών) ρετινοειδών (RA) σε ουροδελές αμφίβιο που ακρωτηριάστηκε στο ύψος του αυτοπόδιου, προάγει αυτοοργάνωση βλαστήματος (**regenerative blastema**), το οποίο προορίζεται να παράξει ένα ετερομορφικό αναγέννημα που αντιστοιχεί σε εκείνο που θα παρήγαγε μια ισοδύναμη έναρξη της αναγέννησης από ανατομική θέση εγγύτερη (**proximal**) προς την ωμική ζώνη (ώμο, **girdle**), αντιβαίνοντας στον «κανόνα του ακραίου μετασχηματισμού» (**distal transformation rule**) (Crawford K. and Stocum D.L., 1988; DeLuca F. et al., 2000; Desbois C. et al., 1991; Hernandez-Lagunas L. et al., 1998; Jiang H. et al., 1994). Οι ουσίες αυτές μέσω της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς για τα ρετινοειδή (RARs), των βλαστικών κυττάρων (**blastemal cells**) που συναθροίζονται στην αφητηρία του αναγεννήματος (**regenerate**), προωθούν όλη την τοπική πληροφορία προς περισσότερο αρχέγονους φαινότυπους, ικανούς για παραγωγή εγγύτερων ανατομικών δομών, παρεκτρέποντας τελικά το πρόγραμμα της επιμορφικής αναγέννησης (**distalization rule**) (Balling R., 1991; Beauchemin M. et al., 1998; Bollag W., 1996; Denker, L., et al., 1990; Bryant S.V., 1981; Bryant S.V. and Gardiner D.M., 1992; Maden M., 1982).



**Εικόνα II.3.19.:** Στις ακτινογραφίες [B] και στο διάγραμμα [A] φαίνεται το αποτέλεσμα μιας ειδικής παραλλαγής της ετερομορφικής αναγέννησης που ερμηνεύεται ως μορφογενετικός αντίκτυπος της διένεξης των τοπικών πληροφοριών για τον εγγύς-μακράν (**Proximal-Distal, [P-D]**) άξονα ασυμμετρίας (**proximalization effect**). Η αντικανονική επανεγκατάσταση και επανεξειδίκευσή τους (χάραξη σχεδίου, **pattern formation**) αποδίδεται στην αμβλυμένη «γενεαλογική ετερογένεια» (ή «διασπορά του βαθμού καθορισμού») των αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών φαινότυπων που συναθροίστηκαν στην επιφάνεια ακρωτηριασμού μέσω αναδραστικής επαγωγής του πολλαπλασιασμού των βλαστηματικών πληθυσμών (**blastemal cells**), κατά την περίοδο της αλληλεπίδρασης των εξωγενών ρετινοειδών με την αποδιαφοροποίηση (**dedifferentiation**).

## 3.3.2.d. Η «ΕΤΕΡΟΜΟΡΦΙΚΗ ΙΣΟΔΥΝΑΜΙΑ» ΤΩΝ ΔΥΟ ΤΥΠΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ

Αν κοπεί το βλάστημα, περιστραφεί κατά  $180^\circ$  γύρω από τον [P-D] άξονα και επανατοποθετηθεί στο κολόβωμα (ομόπλευρη μεταμόσχευση, “*ipsilateral transplantation*”), τότε αντί να αναγεννηθεί ένα άκρο, αναγεννώνται συνήθως τρία!... Κάτι παρόμοιο συμβαίνει όταν αποκοπεί κάποιο βλάστημα από το ένα άκρο και μεταμοσχευθεί σε κολόβωμα του άλλου (ετερόπλευρου) άκρου, χωρίς την περιστροφή κατά  $180^\circ$  (ετερόπλευρη μεταμόσχευση, “*contralateral transplantation*”). Αυτά τα «πλεονάζοντα» αναγεννώμενα μέλη χαρακτηρίζονται ως υπεράριθμα (**supernumerary regenerates**) και αντιπροσωπεύουν ποιοτικές παραλλαγές ετερομορφικής αναγέννησης. Τα μοντέλα των πολικών συντεταγμένων (PCM, HPCM), τα οποία είναι «σηματικά» προσφέρουν εξήγηση για αυτά τα αποτελέσματα, σύμφωνα με την οποία: όταν το βλάστημα (ή μόσχευμα) τοποθετείται επάνω στο κολόβωμα όπως περιγράφηκε παραπάνω, τότε δεν εξασφαλίζεται «συμφωνία» (ή συνέχεια, ομαλή διαβάθμιση) των πληροφοριών θέσης που εξαρτώνται από τους άξονες ασυμμετρίας και είναι κατανεμημένες (ή εξειδικευμένες) στους ιστούς που εξαναγκάζονται σε γειτνίαση βάσει του τρόπου μεταμόσχευσης. Δηλαδή έρχονται σε αντικανονική επαφή κύτταρα, εφοδιασμένα με διαβαθμισμένες τιμές για τις τοπικές πληροφορίες των αξόνων ασυμμετρίας, οι οποίες παρουσιάζουν μεταξύ τους ασυνέχεια (ή «χάσμα»), εξαιτίας της αντιπαράλληλης στοίχισής τους στις δυο συγκολλημένες επιφάνειες ακρωτηριασμού. Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (βλαστηματικά, **blastemal**) που συναθροίζονται στις δυο όψεις εκατέρωθεν της κοινής επιφάνειας συγκόλλησης, παράγονται από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που επάγεται εξαιτίας της διένεξης των πληροφοριών θέσης, που επέβαλλε η ετερόπλευρη μεταμόσχευση είτε η ομόπλευρη μεταμόσχευση κατόπιν περιστροφής  $180^\circ$ . Στη συνολική μορφογένεση που παράγει και οργανώνει αυτά τα αδιαφοροποίητα κύτταρα, συμβάλλουν διαδικασίες όπως η αποδιαφοροποίηση (*dedifferentiation*) και η χάραξη σχεδίου (*pattern formation*), με αποτέλεσμα τη συγκρότηση περισσότερων του ενός, μορφογενετικών πεδίων, τα οποία εικάζεται ότι ισοδυναμούν με τις καταβολές των υπεράριθμων άκρων. Τα πρώτα στάδια της αναγέννησης εξαρτώνται άμεσα από το νευρικό σύστημα. Αν κατά τη στιγμή του ακρωτηριασμού του άκρου μιας σαλαμάνδρας αποκοπεί και το βραχιόνιο πλέγμα, τότε δε γίνεται αναγέννηση. Η δυνατότητα αναγέννησης εξαρτάται από το ποσοστό των νευρικών ινών που προϋπάρχουν στο επίπεδο της τομής. Απαιτείται μια ελάχιστη (κατώφλια) τιμή που κυμαίνεται περίπου στο 30% του συνόλου των νευρικών ινών που κανονικά νευρώνουν την περιοχή, κάτω από την οποία η αναγέννηση δεν ξεκινά. Φαίνεται ότι τα νεύρα παρέχουν με παρακρινείς μηχανισμούς, παράγοντες καθοριστικούς για την αυτοοργάνωση και τη μιτωτική ενεργότητα των κυττάρων του βλαστήματος [Εικ. II.3.21.] (Κουσουλάκος, 2002).

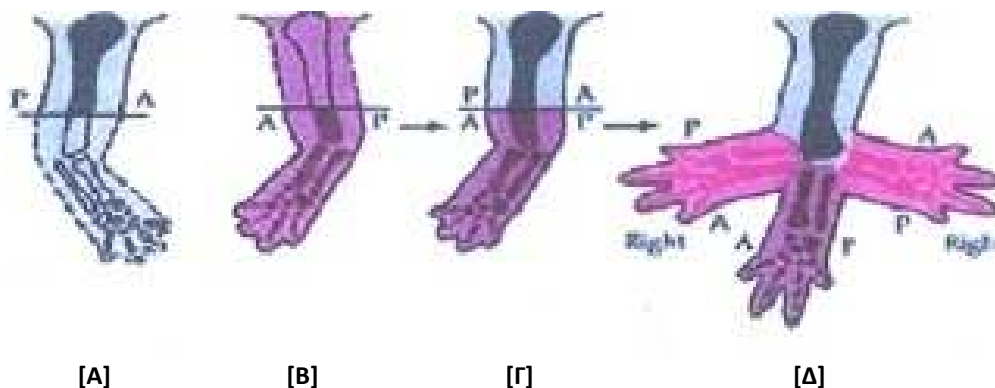




**Εικόνα II.3.20.:** Πείραμα περιστροφής βλαστήματος (ομόπλευρης μεταμόσχευσης, *ipsilateral transplantation*). Αν ένα νεοαναπτυσσόμενο φυτό άκρου (ή αναγεννώμενο βλάστημα) αποκοπεί από τη βάση του, περιστραφεί κατά  $180^\circ$  και στη συνέχεια επανατοποθετηθεί στο κολόβωμα (ομόπλευρη μεταμόσχευση), τότε προκύπτει ένα άκρο με τρεις περιοχές έκφυσης (καταβολές). Στην περίπτωση αυτή το φυτό του άκρου σχηματίζει μια κερκίδα και μια ωλένη, με δύο νέες ωλένες ενδιάμεσα (Javois and Iten, 1986). Επιπλέον, αυτό το πρότυπο σχηματισμού, φαίνεται να είναι παρόμοιο, είτε σε αναγεννώμενα είτε σε φυσιολογικά αναπτυσσόμενα άκρα. Πειράματα στα οποία φύτρα άκρων από το ουρόδηλο αμφίβιο *Axolotl* μεταφέρθηκαν σε αναγεννώμενα βλαστήματα, με τρόπο τέτοιο ώστε να διατηρούνται οι αρχικές ανατομικές συντεταγμένες σε σχέση με το κολόβωμα, τα αποτελέσματα έδωσαν φυσιολογικά ανεπτυγμένα άκρα. Από την άλλη, όταν η πολικότητα του προσθιοπίσθιου άξονα αντιστράφηκε (σε σχέση πάντα με το κολόβωμα), δημιουργήθηκαν υπεράριθμα δάκτυλα με συμμετρία ειδώλου-αντικειμένου (Βλάχου, 2006).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό γυρίνοι του είδους *Rana temporaria*, στο στάδιο **ανάπτυξης-V** (Taylor & Kolros, 1946), στα άκρα των οποίων πραγματοποιήθηκε «αντιστροφή» του προσθιοπίσθιου άξονα ασυμμετρίας (*Anterior-Posterior axis*, **[A-P]** ή **[A-Po]**) μεταξύ ζευγοποδίου (*zeugopodium*) και στυλοποδίου (*stylopodium*), δηλαδή περιστροφή κατά  $180^\circ$  ολόκληρου του απώτερου (*Distal*) τμήματος του άκρου ως προς το εγγύτερο (*Proximal*). Το τεχνητό αυτό ανατομικό αποτέλεσμα επιτεύχθηκε μέσω αμφοτερόπλευρης εγχείρησης, με τη μορφή του πλήρους ακρωτηριασμού περίπου στο ύψος του αγκώνα ή του γόνατου (για τα πρόσθια και τα οπίθια άκρα αντιστοίχως) και αμοιβαίας μεταφοράς (ανταλλαγής ή «αντιμεταφοράς») του κάθε μοσχεύματος στο χειρομορφικά αντίθετο («αντιποδικό») κολόβωμα του ίδιου ζώου. Με άλλα λόγια, το μόσχευμα που παρασκευάστηκε χειρουργικά από το αριστερό άκρο, τοποθετήθηκε (*transplanted*) στο ακρωτηριασμένο δεξί άκρο με τέτοιο τρόπο ώστε τα κατάλοιπα των αρχικών («εγγενών») αξόνων ασυμμετρίας τους ευθυγραμμίστηκαν κατά τον εγγύς-μακράν άξονα (*Proximal-Distal*, **[Pr-D]**) ασυμμετρίας.

Όμως, όσον αφορά τον αντίκτυπο των μεταμοσχεύσεων στη διεύθυνση των υπόλοιπων αξόνων ασυμμετρίας, προέκυψε αντικανονική στοίχιση και για τους δυο προσθιοπίσθιους **[A-P]** αλλά και για τους δυο νωτοκοιλιακούς **[D-V]** άξονες ασυμμετρίας. Όπως φαίνεται στην παρακάτω διαγραμματική απόδοση των επεμβάσεων, οι δυο διαχωρισμένοι προσθιοπίσθιοι **[A-P]** άξονες που διευθετήθηκαν αντιπαράλληλα ο ένας σε σχέση προς τον άλλο στην επιφάνεια διατομής, συγκολλήθηκαν αντεστραμμένοι κατά  $180^\circ$  εξαιτίας της χειρομορφικότητας των άκρων, που διέπει όλους τους αμφιπλευροσυμμετρικούς οργανισμούς. Ανάλογοι χειρισμοί εφαρμόστηκαν συγχρόνως για το άλλο (αμοιβαίο ή «έτερο») άκρο του ίδιου ζώου, στο πλαίσιο ολοκλήρωσης της ετερόπλευρης επέμβασης (*contralateral transplantation*).

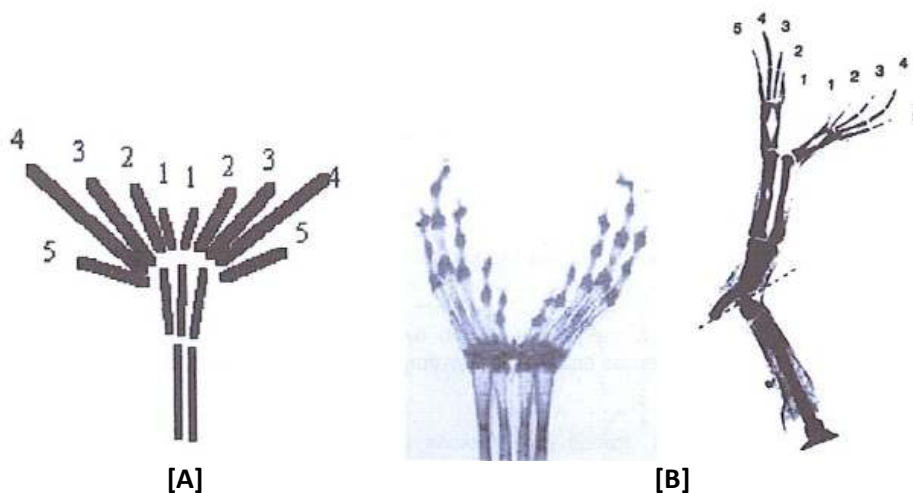


**Εικόνα II.3.21.:** Ο ακρωτηριασμός κάθε άκρου διαχώρισε το νοητό αρχικό προσθιοπίσθιο άξονα ασυμμετρίας **[A-P]** σε δυο παράλληλες συνιστώσες που επιμερίστηκαν στις δυο διακριτές όψεις εκατέρωθεν του επιπέδου της διατομής και αντιστοιχούν στις χειρουργικές επιφάνειες του μοσχεύματος και του κολοβώματος, οι οποίες

παριστάνονται στα τμήματα [A] και [B] του διαγράμματος, με τα οστά του ζευγοποδίου και του στυλοποδίου κάθε άκρου, αντίθετα σκιασμένα. Κατά την αμοιβαία τοποθέτηση κάθε μοσχεύματος στη (μη ομόλογη) επιφάνεια ακρωτηριασμού του ετερόπλευρου κολοβώματος, οι δυο όψεις κάθε διατομής ευθυγραμμίστηκαν ξανά κατά τον [Pr-D] άξονα, αποκαθιστώντας την ανατομική του συνέχεια στο [Γ]. Ωστόσο, στην ετερόπλευρη μεταμόσχευση (*contralateral transplantation*) την οποία συνοψίζει αυτό το τμήμα του διαγράμματος και για τις δυο επεμβάσεις, οι δυο επιμέρους προσθιοπίσθιοι [A-P] άξονες που διαχωρίστηκαν χειρουργικά και αντιπροσωπεύονται στις αντίστοιχες όψεις κάθε διατομής, συγκολλήθηκαν με αντιπαράλληλο προσανατολισμό (ή στοίχιση) εξαιτίας της αντισυμμετρικής διευθέτησής τους κατά την αμοιβαία τοποθέτηση κάθε μοσχεύματος στη (μη ομόλογη) επιφάνεια ακρωτηριασμού του ετερόπλευρου κολοβώματος. Το ετερομορφικό προϊόν της «υπεράριθμης αναγέννησης» φαίνεται σχεδιαγραμματικά στο [Δ] (Maden., 1982).

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η συμβολή του χειρομορφισμού (ή αριστεροδεξιότητας) των άκρων στην ετερόπλευρη μεταμόσχευση (*contralateral transplantation*), επισημαίνεται ότι το ισοδύναμο αυτό αποτέλεσμα της «ανατομικής αντιστροφής» του προσθιοπίσθιου [A-P] και του νωτοκοιλιακού [D-V] άξονα ασυμμετρίας, επιτυγχάνεται εναλλακτικά κατά την ομόπλευρη μεταμόσχευση (*ipsilateral transplantation*), η οποία συνίσταται σε αποκοπή και επανατοποθέτηση του μοσχεύματος στην (ομόλογη) επιφάνεια ακρωτηριασμού του κολοβώματος του ίδιου άκρου, με την προϋπόθεση όμως της περιστροφής των χειρουργικών επιφανειών τους κατά  $180^{\circ}$ .

Τα αναγεννητικά φαινόμενα παραγωγής υπεράριθμων άκρων (*supernumerary regenerates*) εξηγήθηκαν μερικώς, με την ιδέα ότι τα κύτταρα του κολοβώματος και του μοσχεύματος που έρχονται σε άμεση γειτνίαση εξαιτίας της συγκόλλησης των δυο επιφανειών ακρωτηριασμού, υπεισέρχονται σε μια γενικευμένη συνθήκη μαζικής αντιπαραβολής των τοπικών πληροφοριών τους επειδή είναι εφοδιασμένα με πληροφορίες θέσης, οι οποίες δε συνάδουν όσον αφορά την ανατομική συνέχειά τους. Η διένεξη αυτή είναι μεγιστοποιημένη σε υπερθετικό βαθμό εξαιτίας της αντιπαράλληλης στοίχισης μεταξύ των προσθιοπίσθιων και μεταξύ των νωτοκοιλιακών αξόνων ασυμμετρίας που οριοθετούν τις εφαπτόμενες επιφάνειες διατομής μοσχεύματος και κολοβώματος. Η αντιπαράθεση αυτή επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*intercalary regeneration, intercalary outgrowth*) που συνήθως καταλήγει στο σχηματισμό υπεράριθμων άκρων.



**Εικόνα 11.3.22.:** Στις ακτινογραφίες [B] και στο διάγραμμα [A] φαίνεται το σύνθετο αποτέλεσμα μιας άλλης παραλλαγής της ετερομορφικής αναγέννησης που ερμηνεύεται ως μορφογενετικός αντίκτυπος (*proximalization & mirror imaged supernumerary digits*) της διένεξης των τοπικών πληροφοριών για τον εγγύς-μακράν (*Proximal-Distal, [P-D]*), σε συνδυασμό με τη διένεξη των τοπικών πληροφοριών για τον προσθιοπίσθιο (*Anterior-Posterior, [A-Po]*) άξονα ασυμμετρίας, που οργανώθηκαν από τα βλαστικά κύτταρα (*blastemal cells*) κατά την περίοδο που πολλαπλασιάστηκαν και συναθροίστηκαν (μορφογένεση) στην επιφάνεια ακρωτηριασμού, υπό την επίδραση τερατογόνων ουσιών, όπως τα εξωγενώς χορηγούμενα ρετινοειδή (Maden, 1982).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ-4<sup>ο</sup>: Μορφογενετικοί μηχανισμοί

### 4. Μορφογενετικοί μηχανισμοί

Η διάπλαση του σώματος των αμφιβίων, όπως εξάλλου ισχύει και για τα άλλα μετέζωα, σε απώτερη ανάλυση ανάγεται στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις των πρωιμότερων σταδίων της ανάπτυξης (κυρίως κατά τη γαστριδίωση, *gastrulation*), οι οποίες εξαρτώνται από το γεγονός ότι τα αρχικώς ισοδύναμα βλαστομερίδια καθίστανται σταδιακώς διαφορετικά επειδή στην πορεία της οργανογένεσης εμπλεκούνται μορφογενετικούς καθοριστές που διαφέρουν ποιοτικώς και ποσοτικώς. Οι αρχικές συνθήκες του μορφογενετικού μοριακού αυτού υποβάθρου, οι οποίες αφορούν, αφενός το ωάριο πριν τη γονιμοποίησή του και αφετέρου το ζυγωτό που αυτοοργανώνεται μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου, μεταβάλλονται με ποικίλους κυτταροβιολογικούς μηχανισμούς, από το σύνολο των οποίων ενδιαφέρει στην προκειμένη περίπτωση ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, επειδή ασκεί μια άμεση και πιθανότατα μηχανιστική επιλογή (ή διαλογή, *sorting*) στο απόθεμα των προϋπαρχόντων μορφογόνων μορίων. Οι αυλακώσεις αντιπροσωπεύουν τον τύπο κυτταροδιαίρεσης που εξυπηρετεί αποδοτικότερα αυτή τη βιολογική αναγκαιότητα του διαμοιρασμού, της διαμερισματοποίησης και της ρυμοτόμησης των μορφογόνων συστατικών στο κυτταρόπλασμα των βλαστομεριδίων, τα οποία σε οψιμότερα στάδια της ανάπτυξης έχουν σταθεροποιήσει και / ή οριστικοποιήσει την τοπογραφική διευθέτησή τους, κατά πρώτον σε σχέση με τους εμβρυικούς άξονες ασυμμετρίας και κατά δεύτερον σε σχέση με τη γειτνίαση των τριών βλαστικών δερμάτων (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα). Οι μιτώσεις αντιπροσωπεύουν τον τύπο κυτταροδιαίρεσης που εξυπηρετεί ευνοϊκότερα τη βιολογική αναγκαιότητα των τοπικών αλληλεπιδράσεων στο πλαίσιο της γειτνίασης παρακείμενων κυττάρων και από αυτή τη σκοπιά το ειδικότερο ενδιαφέρον στην παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στις καθοδηγούμενες κυτταρικές διαιρέσεις («διατεταγμένες μιτώσεις», *oriented divisions*), επειδή διαδέχονται την αυλάκωση στη μορφογενετική σκυταλοδρομία της επέκτασης (*expansion*) και της εξειδίκευσης (*specification*) των τοπογραφικών πληροφοριών που αφορούν τις ανατομικές συντεταγμένες των κυττάρων (πληροφορίες θέσης, *positional informations*).

#### 4.1. Χάραξη σχεδίου (ή Σχέδιο Ρύθμισης, *pattern formation*)

Ως μορφογενετικό πεδίο (*morphogenetic field*) θεωρείται μια ομάδα αρχικώς ισοδύναμων κυττάρων, ικανή να αυτοοργανώνεται και να καθοδηγεί και / ή να τελεσφορεί το σχημασμό μιας ειδικής ανατομικής δομής του σώματος (π.χ. φυτόρο άκρου, *limb bud*), ανεξάρτητα από την ενδεχόμενη απομάκρυνση (ή απουσία) ορισμένων κυττάρων από την υπόλοιπη αυτή δομή και ανεξάρτητα από την ενδεχόμενη μεταμόσχευση της κυτταρικής ομήγυρης σε εκτοπική θέση. Η ομάδα αυτή είναι σε θέση να σχηματίσει το όργανο για το οποίο είναι προορισμένη, ακόμη κι αν αφαιρεθούν από αυτήν αρκετά κύτταρα, μέσω διεργασιών που σχετίζονται με τη ρύθμιση (*“regulation”*) που παρατηρείται κατά την πρώιμη περίοδο της εμβρυογένεσης και με τις μορφογενετικές διεργασίες που πλαισιώνουν την αναγέννηση (*regeneration*) κατά τη μετεμβρυική περίοδο (π.χ. αποδιαφοροποίηση, υπερδιαφοροποίηση, κλπ) (Kalthoff, 1966).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά τη νευριδίωση (*neurulation*) περατώνεται ο καθορισμός των κυττάρων, η διαφοροποίηση κυτταρικών ομάδων προς ιστούς, η οργανογένεση και η μορφογένεση, με τελική έκβαση τη δημιουργία ενός πλήρους οργανισμού. Ανάλογα με την τοπική μνήμη με την οποία εφοδιάζεται κάθε κύτταρο του πεδίου, αλληλεπιδρά αφενός με τα του ιδίου πεδίου και αφετέρου με αυτά των γειτονικών, με προοπτική τη χάραξη (προτύπωση) μιας αρχέτυπης εκδοχής του ανατομικού σχεδίου ορισμένου τμήματος του σώματος. Τη διεργασία αυτή διαδέχεται η διαφοροποίηση προκειμένου να ολοκληρωθεί ως συνάρτηση της πληροφορίας θέσης που διαθέτει κάθε κύτταρο.

Με άλλα λόγια, η χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) ισοδυναμεί για τα κύτταρα ενός δεδομένου πεδίου, με μια κωδικοποιημένη προεπισκόπηση κάποιου μεταγενέστερου επιπέδου



αυτοοργάνωσης της αρχιτεκτονικής του δεδομένου τμήματος του σώματος, για το οποίο προορίζονται. Αυτή η κωδικοποιημένη προαπεικόνιση ισοδυναμεί με ένα είδος υποτυπώδους προτύπωσης του δικτύου των γενετικών κυκλωμάτων και των ομοιοστατικών μηχανισμών που θα μεσολαβήσουν στη διάπλαση της δεδομένης σωματικής δομής κατά τη διαφοροποίησή της. Η όλη αναπτυξιακή διαδικασία της χάραξης του σχεδίου προηγείται χρονικά της διαφοροποίησης.

#### 4.2. Η μεταβίβαση της τοπικής πληροφορίας

Οι τοπικές πληροφορίες παρέχονται και αλληλεπιδρούν με δυο κυρίως τρόπους, όσον αφορά τη μεταβλητή του «οντογενετικού χρόνου»:

α) με «κάθετη» (γενεαλογική) μεταφορά της τοπικής πληροφορίας, δηλαδή μεταξύ κυττάρων που αντιπροσωπεύουν είτε διαφορετικές, είτε όμοιες ανατομικές συντεταγμένες και μεσολαβούν στην τοπική πληροφόρηση μονόδρομα, χωρίς τις φυσικές παρουσίες τους. Τα κύτταρα που αντιστοιχούν σε προγενέστερη γενιά ενεργούν ως πομποί (ή «πηγές») των τοπικών πληροφοριών και τα κύτταρα που αντιστοιχούν σε μεταγενέστερη γενιά ενεργούν ως αποδέκτες (ή «τελεστές»), ενώ η μεταβίβαση αυτή εξαρτάται από τη διαφορετική θέση που κατέχουν στην οντογενετική κλίμακα του χρόνου και

β) με «οριζόντια» μεταβίβαση της τοπικής πληροφορίας, δηλαδή μεταξύ κυττάρων, των οποίων οι ίδιες οι φυσικές παρουσίες αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές ανατομικές συντεταγμένες. Από αυτή την άποψη, τα κύτταρα που είναι ήδη εφοδιασμένα με την (αμοιβαία ή αμφίδρομη) ικανότητα να ανταλλάσσουν τοπική πληροφόρηση, ενεργούν ως αναμεταδότες της, ανεξάρτητα από την ιστοειδική τους ταυτότητα, ή από τη θέση τους στην οντογενετική κλίμακα του χρόνου, ή από οποιαδήποτε άλλη φαινοτυπική διαφορά, ως απώτερη συνέπεια της «κάθετης» (γενεαλογικής) μεταβίβαση της τοπικής πληροφορίας.

Οι τοπικές πληροφορίες παρέχονται και αλληλεπιδρούν με δυο κυρίως τρόπους, όσον αφορά τη μεταβλητή του «ανατομικού χώρου»:

α) με κυτταρικές αλληλοεπιδράσεις (*cell to cell interactions*), μέσω μορίων προσκόλλησης (*Cell Adhesion Molecules, CAMs*) της κυτταρικής επιφάνειας, που προσδένονται σε μόρια άλλης κυτταρικής επιφάνειας ή σε εξωκυτταρικό υλικό (*ECM*) και

β) με επαγωγή, μέσω διαχεόμενων μορίων (μορφογόνων) που καθοδηγούν (π.χ. με παρακρινή δράση) την ανάπτυξη κάποιου γειτονικού ιστού, διαφορετικού από αυτόν που τα παράγει.

Για την ερμηνεία της αμφίδρομης μεταβίβασης της τοπικής πληροφορίας μεταξύ κυττάρων που γειτνιάζουν, δηλαδή που συμμετέχουν σε τέτοια κυτταροβιολογική μορφή αλληλεπίδρασης η οποία εξαρτάται άμεσα από τη φυσική διακυτταρική απόσταση, έχουν διατυπωθεί δύο εναλλακτικές κατηγορίες μορφογενετικών μοντέλων (Bryant S.V. et al., 1977, 1981, 1982, 1992):

1] η μια κατηγορία συμπεριλαμβάνει τα μοντέλα πολικών συντεταγμένων (*polar coordinate models*), που πρεσβεύουν μεταξύ άλλων πως οι τοπικές πληροφορίες κωδικοποιούνται σε ειδικά μόρια της κυτταρικής επιφάνειας (πιθανώς πρωτεϊνικής σύστασης) και προκύπτουν κυρίως εξαιτίας διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Αντιπροσωπευτικότερα είναι:

1/α] Polar Coordinate Model (PCM) (French V. et al., 1976; Gardiner D.M. et al., 1989; Endo T. Et al., 2002; Iten L.E. et al., 1975; Javois & Iten, 1986).

1/β] Hierarchical Polar Coordinate Model (HPCM) (Tabin C. J. et al., 1991, 1994; Muneoka K. & Murad E.H., 1987; Stocum D.L. et al., 1980, 1984, 1991, 2003; Sessions S.K. et al., 1989).

2] η άλλη κατηγορία συμπεριλαμβάνει τα μοντέλα κλίσης συγκέντρωσης μορφογόνων ουσιών (ή κλίσης μορφογόνων, *gradient models*), που υποστηρίζουν τη διαμόρφωση της τοπικής πληροφορίας ως συνάρτηση της διαφοράς των τοπικών συγκεντρώσεων μιας διαχεόμενης ουσίας, της οποίας έχει ταυτοποιηθεί η μορφογόνος ενεργότητα. Τα αντιπροσωπευτικότερα από αυτά είναι:

2/α] Boundary Model (Meinhardt H. et al., 1993)[25, 30]

2/β] Bootstrap Model (Meinhardt H. et al., 1993)[25]

#### 4.3. Η εισήγηση της έννοιας του μορφογενετικού πεδίου

Οι τρέχουσες υποθέσεις ερμηνείας των μηχανισμών μορφογένεσης συγκλίνουν στα εξής σημεία, όσον αφορά στην εισήγηση της έννοιας του μορφογενετικού πεδίου (Κωσταρίδης Π., 1984):

(α) Ένα (ή λίγα) χημικό είδος ουσίας (το επονομαζόμενο μορφογόνο) κατανέμεται υπό μορφή διαβάθμισης της συγκέντρωσής της μέσα στα όρια του θεωρούμενου μορφογενετικού πεδίου, ενώ παράλληλα η απλή αυτή χημική κλίση μετασχηματίζεται σε σύνθετη τοπογραφική συνάρτηση όλων των πιθανών ενδιάμεσων συντεταγμένων που μπορούν να συμπληρωθούν από κύτταρα. Με άλλα λόγια ο τριδιάστατος χώρος του δεδομένου αναπτυσσόμενου (ή αναγεννώμενου) τμήματος του σώματος (π.χ. φυτό άκρου), φαίνεται να ανάγεται σε ένα σχετικά αυτοτελές σύστημα εμβρυικών αξόνων ασυμμετρίας που καταστρώνεται και εμπλουτίζεται με τις τοπικές πληροφορίες που αφομοιώνουν τα κύτταρα που προοδευτικά καταλαμβάνουν αυτόν τον οριοθετημένο ανατομικό χώρο (του μορφογενετικού πεδίου).

(β) Όσα κύτταρα εκτίθενται στην τοπική και χρονική αυτή κλίση συγκέντρωσης, καταλήγουν να εκφράσουν διαφορετικές παραλλαγές του βασικού γενετικού προγράμματος απόκρισης, ως συνέπεια της ποιοτικής και ποσοτικής εξάρτησης από τις αντίστοιχες ανατομικές συντεταγμένες που καταλαμβάνουν στο ενιαίο αυτό σύστημα τοπικών πληροφοριών του δεδομένου πεδίου. Δηλαδή εφοδιάζονται με μια μορφή τοπικής μνήμης των επιμέρους ανατομικών συντεταγμένων που κατέχουν στο αναπτυσσόμενο σύστημα, που απορρέει από την ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του οντογενετικού τους προκαθορισμού (*determination*) και της ποιοτικής και / ή ποσοτικής περιβαλλοντικής πληροφορίας που ανιχνεύουν στο σύστημα της κλίσης συγκέντρωσης του μορφογόνου. Αυτή η τοπική μνήμη σταθεροποιείται στο φορέα της με την παραγωγή μιας ορισμένης αναπτυξιακής ταυτότητας, η οποία προηγείται χρονικά του φαινότυπου που πρόκειται να οριστικοποιηθεί από τη διαφοροποίηση.

Το κύτταρο αυτό μετά το πέρας της διαφοροποίησής του, διασώζει μέρος ή και το σύνολο των ιδιοτήτων που προσδιορίζουν την αναπτυξιακή του ταυτότητα, συνθήκη που υποδηλώνεται από τη δυνατότητα επανενεργοποίησής της κατά την έναρξη αναγέννησης ακόμη και σε μια έκτοπη θέση στον οργανισμό. Αυτές οι ιδιότητες εξακολουθούν να απεικονίζουν την αντίστοιχη πληροφορία θέσης με την οποία εφοδιάστηκε το κύτταρο στο (αρχικό) οντογενετικό (*outgrowing*) μορφογενετικό πεδίο και δικαιολογούν τη δυναμική της δευτερογενούς ανάπτυξης στα αναγεννητικά (*regenerative*) μορφογενετικά πεδία.

(γ) Τα κύτταρα που συναπαρτίζουν μορφογενετικό πεδίο μπορούν να μεταβιβάζουν τις τοπικές πληροφορίες που φέρουν, σε οποιοδήποτε νεοσχηματιζόμενο (μέσω μίτωσης) ή νεοεισερχόμενο (μέσω μετανάστευσης, μεταμόσχευσης, κλπ) κύτταρο, εντός του βεληνεκού ομοιοστασίας του πεδίου. Ως αποτέλεσμα, αν είναι εφικτή η αναγέννηση μιας σωματικής δομής (π.χ. άκρου), τότε εκτυλίσσεται συναρτήσει του βαθμού στον οποίο τα παραμένοντα (ή προϋπάρχοντα) κύτταρα των ιστών που την πλαισιώνουν, κατορθώνουν να αποκαταστήσουν το αρχέτυπο δίκτυο (ή κύκλωμα) των γενετικών αλληλεπιδράσεων που καθορίζουν τη στερεότυπη ανατομική της θέση (ή εντοπισμό) στον οργανισμό. Με άλλα λόγια, η αναγέννηση άκρου τουλάχιστον για τα αμφίβια, εξαρτάται από τη δυνατότητα ανάταξης (ή ανάκλησης) των μορφογενετικών αλληλεπιδράσεων χάραξης σχεδίου για το δεδομένο πεδίο, σε ένα ευρύτερο κυτταρικό περιβάλλον με διαφοροποιημένη (άρα ετεροχρονισμένη) ανατομική ταυτότητα. Η συνθήκη αυτή από αναπτυξιακής σκοπιάς, δεν ισοδυναμεί με επανάληψη, ούτε αντανakλά ανακεφαλαίωση της οντογενετικής (*outgrowth recapitulation*) παραγωγής του άκρου, διότι η οντογενετική καταβολή του (φύτρο άκρου) διαφέρει από ένα οποιοδήποτε πιθανό αναγεννητικό μορφογενετικό πεδίο, στο βαθμό που επιστρατεύει «καινοτόμα» αναπτυξιακά φαινόμενα, όπως είναι για παράδειγμα η αποδιαφοροποίηση (*dedifferentiation*). Επειδή στο πλαίσιο της (φυσιολογικής) οντογένεσης, η μορφογένεση προηγείται χρονικώς της διαφοροποίησης, πιθανώς η εμφάνιση μορφογενετικών πεδίων στο φυλογενετικό δένδρο να απετέλεσε προϊόν της ειδοειδικής

απόκρισης σε μια επίμαχη εξελικτική πρόκληση για καταμερισμό και ιεράρχηση της αναγκαιότητας αυτοοργάνωσης των κυττάρων του αναπτυσσόμενου οργανισμού σε επιμέρους υποπληθυσμούς (π.χ. βλαστικών κυττάρων) ποικίλων βαθμών αναπτυξιακής αυτονομίας και, των υποπληθυσμών σε αυτοτελή συστήματα (π.χ. φύτρα άκρων), κυμαινόμενου επιπέδου οντογενετικής αυτοτέλειας.

#### **4.4. Η αποδιαφοροποίηση αντιπροσωπεύει εξελιγμένο μηχανισμό αυτοοργάνωσης του μορφογενετικού πεδίου**

Ως συνέπεια της εξελικτικής αφομοίωσης των αναπτυξιακών μηχανισμών από τις φυλογενετικές βαθμίδες, επικράτησαν δυο διαφορετικές εκδοχές της έννοιας του μορφογενετικού πεδίου, σύμφωνα με τις οποίες:

α] όσον αφορά τη μια εκδοχή, κατά την ιστογένεση επιλέγεται και / ή αυτονομείται από την πορεία της μαζικής διαφοροποίησης (ή του καθορισμού) ένας εφεδρικός πληθυσμός γεναρχικών κυττάρων (*stem cells*) κυμαινόμενου βαθμού διαφοροποίησης (ή καθορισμού), ο οποίος:

α/1] είτε τροφοδοτεί σποραδικά ή συστηματικά το μορφογενετικό πεδίο του ιστού όπου ανήκει, όπως συμβαίνει στους ανανεούμενους ιστούς που υπεισέρχονται στη λεγόμενη φυσιολογική αναγέννηση,

α/2] είτε επιστρατεύεται μαζικά και αυτοσυγκροτείται σε μορφογενετικό πεδίο εκτεταμένης αυτονομίας, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις αποκατάστασης της απωλεσθείσας μάζας κατά την αναπλαστική ή υπερπλαστική αναγέννηση.

β] όσον αφορά την άλλη εκδοχή, κατά την ιστογένεση τα διαφοροποιούμενα κύτταρα διασώζουν τις ιδιότητες και τις τιμές των παραμέτρων του μορφογενετικού πεδίου υπο τη μορφή τοπικής πληροφορίας (Κωσταρίδης, 1984, Βλάχου, 2006), την οποία ανατάσσει (ή ανακαλεί) η ειδοειδική αναπτυξιακή διεργασία της αποδιαφοροποίησης (*dedifferentiation*). Η διατήρηση των τιμών των παραμέτρων του πεδίου υπό τη μορφή τοπικής μνήμης υποδηλώνεται από τον κανόνα του ακραίου μετασχηματισμού (*rule of distal transformation*), ο οποίος διέπει τη φυσιολογική επιμορφική αναγέννηση, αλλά υποδηλώνεται περαιτέρω και από τα περιστατικά ετερομόρφωσης που παράγουν οι παραλλαγές (*supernumerary regeneration*), καθώς και οι παρεκτροπές της (π.χ. παραγωγή υπεράριθμων άκρων εξαιτίας εξωγενούς εφαρμογής ρετινοειδών, παραγωγή έκτοπων δομών-*spikes*, κλπ) (Kalthoff, 1966).

Άρα, δεδομένης της δυνατότητας αποδιαφοροποίησης, διαπιστώνεται ότι κατά την αναγέννηση τουλάχιστον, μορφογενετικό πεδίο (*regenerative morphogenetic field*) συναπαρτίζονται και οι αδιαφοροποίητοι και οι διαφοροποιημένοι κυτταρικοί πληθυσμοί, με την επιφύλαξη ωστόσο ότι για τους πρώτους η τοπική πληροφορία είναι εγγενής (ποιοτική) ιδιότητα της αδιαφοροποίητης κατάστασης (του τύπου «όλα ή τίποτα», αφού η μορφογένεση προηγείται χρονικώς της διαφοροποίησης), ενώ για τους δεύτερους η πληροφορία θέσης φαίνεται να αποτελεί ιδιότητα ποσοτικώς εξαρτημένη από τη διαφοροποιημένη κατάσταση των κυττάρων.

Εξάλλου ούτε όλα τα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία (*regenerative morphogenetic fields*) στις διάφορες φυλογενετικές βαθμίδες αναδεικνύουν ικανότητα αποδιαφοροποίησης, ούτε οποιοδήποτε επιμορφικό πεδίο επιδεικνύει την ίδια απόδοση αναγέννησης, ανεξάρτητη από το στάδιο οντογένεσης του οργανισμού. Αυτά υποδηλώνουν ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και η συνοδός χάραξη σχεδίου που συνιστούν τις αναπόσπαστες συνιστώσες κάθε διεργασίας μορφογένεσης πιθανώς αποτελούν ποσοτική συνάρτηση του επιπέδου αυτοτέλειας (ομοιόστασης) του πεδίου. Γιαυτό ορισμένα επιμορφικά πεδία (π.χ. άκρα ουροδελών αμφιβίων, ουρές σαυρών,

κλπ) μπορούν φυσιολογικά να επιτυγχάνουν πλήρη αναγέννηση για οποιοδήποτε οντογενετικό στάδιο του οργανισμού.

Έτσι η αναγεννητική δυναμική υπό αυτή την έννοια προϋποθέτει:

α] είτε την αποθήκευση αποθέματος μη διαφοροποιημένων κυττάρων αρμοδιοποιημένων στην αρχειοθέτηση της τοπικής πληροφορίας, οπότε σε αυτήν την περίπτωση η πρώτη φάση της αναγέννησης μεσολαβείται από μια εκτέλεση της διαφοροποίησης που αποπερατώνει την εκκρεμή χάραξη σχεδίου (που είχε παραμείνει αδιεκπεραίωτη στα γεναρχικά ή βλαστικά κύτταρα),

β] είτε την αποθήκευση και διαφύλαξη ακέραιας της ίδιας της τοπικής πληροφορίας στα (τερματικά ή μη) διαφοροποιημένα κύτταρα, οπότε η πρώτη φάση της αναγέννησης μεσολαβείται από μια ειδική αυτοτελή διεργασία, την αποδιαφοροποίηση.

Αυτή η απαραίτητη προϋπόθεση εξυπηρετεί την παραγωγή του απαιτούμενου μη διαφοροποιημένου πληθυσμού που θα αποτελέσει το φυσικό υπόβαθρο για την επαγωγή αλλά και για την αφομοίωση της μορφογένεσης (πολλαπλασιασμού και χάραξης σχεδίου) και της επακόλουθης διαφοροποίησης. Τη «νομοτελειακή αναγκαιότητα» παλινδρόμησης του διαφοροποιημένου φαινότυπου στην αδιαφοροποίητη αναπτυξιακή κατάσταση επιβάλλει η δεδομένη χρονική διαδοχή της μορφογένεσης και της διαφοροποίησης, με την πρώτη να προηγείται χρονικά της δεύτερης και κατά την οντογένεση και κατά τη δευτερογενή ανάπτυξη. Οι τυπικότεροι μηχανισμοί που υπηρετούν την κυτταρική διαφοροποίηση συνίστανται στη διαφορική τοπική και χρονική ενεργοποίηση (*induction*) και καταστολή (*inhibition*) ειδικών γονιδίων ή ομάδων γονιδίων, καθώς και στην εκλεκτική γονιδιακή ενίσχυση (*gene amplification*) (Kalthoff, 1966). Κατά συνέπεια η επιμορφική αναγέννηση στο βαθμό που δεν αντιπροσωπεύει αποσπασματική ανακεφαλαίωση της οντογένεσης, είναι εφικτή:

α] στο βαθμό που μπορεί να επαναληφθεί (ή να αναταχθεί) η μια από τις δυο συνιστώσες της μορφογένεσης, δηλαδή η χάραξη σχεδίου και

β] στο βαθμό που ο (τερματικά ή μη) διαφοροποιημένος φαινότυπος μπορεί να υποστραφεί στην αδιαφοροποίητη κατάσταση προγραμματισμένα, χωρίς να παρεκτραπεί σε παρεκκλίσεις της δευτερογενούς ανάπτυξης, όπως είναι για παράδειγμα η καρκινογένεση.

Εν'κατακλείδι μπορούμε να πούμε περιφραστικά ότι η μορφογένεση είναι η διεργασία που παράγει –μέσω πολλαπλασιασμού και χάραξης σχεδίου- το φυσικό «κυτταρικό ή κελλωτό υπόβαθρο» όπου εδραιώνεται και εξειδικεύεται η τοπική πληροφορία σύμφωνα με τη θεωρία των «κελλωτών στερεών», καθορίζοντας αν ο φορέας της θα αποτελεί υποκυτταρική ή μοριακή δομή, ή αν θα είναι ολόκληρο κύτταρο, ή αν θα αντιπροσωπεύεται από έναν κυτταρικό πληθυσμό. Ενώ η διαφοροποίηση αντανακλά τη διεργασία που την εξειδικεύει δομικά και λειτουργικά στο πλαίσιο της ιστικής ομοιοστασίας, προσδίδοντάς της ποσοτικό χαρακτήρα μέσω της μορφολογικής διάπλασης του κυτταρικού και / ή εξωκυττάρου περιβάλλοντος, σε όλη την κλίμακα διαστάσεων του διαθέσιμου ανατομικού χώρου (Balling R. et al., 1991; Brockes J. P. et al., 2002; Crawford K. et al., 1998; Duellman W.E. & Trueb L., 1994; Denker L. et al., 1990; Koussoulakos et al., 1992).

#### 4.5. Στην αυτοοργάνωση του μορφογενετικού πεδίου συμβάλλουν τα ομοιωτικά γονίδια

##### 4.5.α. Δράση Ομοιωτικών Γονιδίων

Από την εποχή των πρώτων εντυπωσιακών παρατηρήσεων της δράσης των ομοιωτικών μεταλλάξεων στη δροσόφιλα (Bohn et al., 1965, 1976; Bart et al., 1988; Mercader et al., 1999, 2000; Lawrence et al., 2000; Galindo et al., 2000; Hayashi et al., 1999; Serrano et al., 1997) μέχρι σήμερα, διερευνήθηκε διεξοδικά με πειραματικές (τεχνητές) κλίσεις συγκέντρωσης μορφογόνων, το φάσμα των επιδράσεων των ομοιωτικών γονιδίων στη σχηματοποίηση της αρχιτεκτονικής του σώματος σπονδυλωτών και ασπονδύλων.

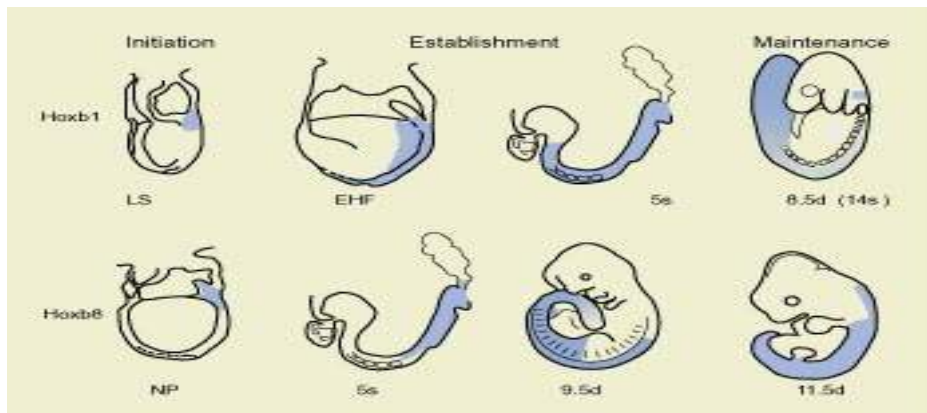
Τα **Hox γονίδια** ανακαλύφθηκαν από τους ερευνητές κατά τα πειράματά τους με μεταλλαγές στη *D. melanogaster*. Αυτού του τύπου οι μεταλλαγές προκαλούσαν αλλαγή στην πρόσθια ανατομικών δομών του εμβρύου, σε οπίσθιες (π.χ. διάπλαση ποδιών στο κεφάλι). Το φαινόμενο ονομάστηκε **ομοίωση (homeosis)** και τα εμπλεκόμενα γονίδια **ομοιωτικά (homeotic genes)**. Έτσι, όλα τα γονίδια που ελέγχουν το βασικό (αρχέτυπο) αρχιτεκτονικό σχέδιο ολόκληρου του σώματος των οργανισμών καλούνται ομοιωτικά. Με κατάλληλες τεχνικές Μοριακής Βιολογίας (επιτόπιος υβριδισμός, ανοσοφθορισμός), διαπιστώθηκε ότι όλα τα ομοιωτικά γονίδια διαθέτουν μια αρκετά παρόμοια ακολουθία **180** περίπου βάσεων. Η εξελικτική διατήρηση των ακολουθιών αυτών με ελάχιστες τροποποιήσεις, σχεδόν σε όλη τη φυλογενετική κλίμακα είναι ενδεικτική του θεμελιώδους ρόλου των στη διαμόρφωση ενός προτύπου που καθορίζει (ή καθοδηγεί) την ανατομική οργάνωση του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Η ακολουθία αυτή ονομάστηκε **ομοιοακολουθία ή ομοιοθήκη (homeobox)**.

Το πεπτίδιο που κωδικοποιείται από μια ομοιοακολουθία καλείται **ομοιοεπικράτεια (homeodomain)** και αποτελείται κυρίως από **βασικά αμινοξέα**. Οι ομοιοεπικράτειες μέσω στερεότυπης τριτοταγούς δομής (**μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα**) συνδέονται στο DNA και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων, των οποίων η έκφραση δρομολογεί τις μορφογενετικές διαδικασίες που ολοκληρώνουν το σχηματισμό δεδομένου οργάνου. Το γονιδίωμα των θηλαστικών περιέχει έως και **38 Hox** γονίδια, καταμερισμένα σε **4 κλάσεις ή συγκροτήματα (Hox A, B, C, και D clusters)**. Τα Hox συγκροτήματα είναι καταμερισμένα σε διαφορετικά χρωμοσώματα και κάθε συγκρότημα περιέχει τουλάχιστον **9 γονίδια**. (Βλάχου, 2006; Chambon P. et al., 1993; Geraudie J. et al., 1998; Godsave S. et al., 1994; Morgan B.A. et al., 1994; Prince V.E. et al., 2002; Maden M., 1983; Duester G., 2003; Muneoka K. et al., 1991; Wolpert L., 1970; Powell et al., 1997; Kieffer et al., 1994; Jones et al., 1999).

Γενικά, κοινό χαρακτηριστικό των Hox γονιδίων είναι ο **όμοιος μεταγραφικός προσανατολισμός** κατά μήκος του συγκροτήματος. Τα γονίδια στο 3'-άκρο ενεργοποιούνται νωρίτερα από τα γονίδια του 5'-άκρου, κατά τη διαδοχή των οντογενετικών σταδίων. Άρα, τα Hox γονίδια του 3'-άκρου εκφράζονται νωρίς κατά την ανάπτυξη στις **πρόσθιες δομές (π.χ. πρόσθια άκρα, forelimbs)** του εμβρύου, σε αντίθεση με τα Hox γονίδια, που είναι πιο κοντά στο 5' άκρο, και εκφράζονται σε περισσότερο **οπίσθιες δομές (π.χ. οπίσθια άκρα, hindlimbs)** του εμβρύου. Η ενεργότητα (ή έκφραση) των Hox γονιδίων και των ρυθμιστών τους, των **Cdx γονιδίων** καθορίζει τις διαδικασίες **εξειδίκευσης (specification)** του **προσθιοπίσθιου άξονα (κεφαλουραίου άξονα) ασυμμετρίας** του εμβρύου [Εικ. II.4.23].

Τα Hox γονίδια περιέχουν ομοιοακολουθίες, που κωδικοποιούν για πρόσδεση στο DNA. Τα παράγωγα των ομοιοθηκών (mRNA και πρωτεΐνες) συνήθως σχηματίζουν διαβαθμίσεις συγκέντρωσης κατά μήκος των κυρίων αξόνων ασυμμετρίας στα διάφορα μορφογενετικά πεδία. Μετά το πέρας της μορφογένεσης τα ομοιωτικά γονίδια παύουν να εκφράζονται. Ενδιαφέρουσα εξαίρεση αποτελούν ορισμένα ομοιωτικά που εξακολουθούν να εκφράζονται στο ήδη μορφοποιημένο άκρο των ουροδελών αμφιβίων, ιδιότητα που ενδεχομένως συμβάλλει στην πληρότητα της αναγεννητικής ικανότητάς τους (Βλάχου, 2006).

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη συνεπώς, συντελείται σύμφωνα με ένα γεωμετρικό (ή σχεδιαστικό) πρότυπο, συμβατό με μια ιεραρχημένη γονιδιακή έκφραση, η οποία είναι επιδεκτική (τερατογόνου) τροποποίησης από το ρετινοϊκό οξύ, κατόπιν σύνδεσης με τους υποδοχείς του (RARs) και ως εκ τούτου, μέσω των ειδικών αλληλεπιδράσεων με τα Hox γονίδια (Hernandez-Lagunas L. et al., 1998).



**Εικόνα 4.23:** Έκφραση των Hox γονιδίων στο 3'-άκρο (Hoxb-1) και 5'-άκρο (Hoxb-8) της ακολουθίας του Hox γονιδίου κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης ποντικού. Στην εικόνα παρουσιάζονται επιλεγμένα στάδια ημερών κατά τα οποία η δράση των Hox γονιδίων ενεργοποιείται στις χρωματισμένες μπλε περιοχές. Αυτό γίνεται ορατό μέσω ενός συστήματος Hoxb8 / lacZ, που το γονίδιο αναφοράς διακόπτεται και έτσι επιτρέπεται η έκφραση του γονιδίου lacZ που μεταβολίζει τη γαλακτόζη και χρωματίζει μπλε τις περιοχές (Marshall et al., 1994).

Συνεπώς η τέταρτη βασική συνιστώσα της αναγέννησης αναφέρεται στην ποικιλότητα των αλληλεπιδράσεων των ρετινοειδών με το ειδοειδικό πρότυπο έκφρασης των ομοιωτικών γονιδίων, του οποίου η εγγενής πολυπλοκότητα υποδηλώνεται από πειραματικά δεδομένα όπως τα εξής:

α) Οι θέσεις στο αναπτυσσόμενο φυτό όπου προτυπώνονται οι επιμέρους νεκρωτικές ζώνες του αυτοποδίου (πρόσθιες, οπίσθιες, μεσοδακτυλικές), συμπίπτουν τοπογραφικά με τις ζώνες έκφρασης των CRBP, RARs, Hox-7, γονιδίων.

β) Η έκφραση του HOXD-11 κατά την οντογένεση της καταβολής του άκρου ανιχνεύεται σε οψιμότερη φάση της ανάπτυξής του σε σχέση με τα άλλα ομοιωτικά, κατά την εξειδίκευση της ταυτότητας του αυτοποδίου δηλαδή της πλέον μακράν δομής του. Αναλόγως, κατά την αναγέννηση η έκφρασή του στο πρώιμο αναγεννητικό βλάστημα, εντοπίζεται σε μακράν αλλά περισσότερο οπίσθια θέση, εκεί όπου σχηματοποιείται ευκρινώς το μελλοντικό αυτοπόδιο.

Συνεπώς ο χρονικός και τοπικός παραλληλισμός της εξειδίκευσης της ανατομικής ταυτότητας του αυτοποδίου με τα πρότυπα ιεραρχημένης έκφρασης των ομοιωτικών γονιδίων, επιβεβαιώνει τρεις υποθέσεις:

- 1) η μορφογένεση του αναπτυσσόμενου και / ή αναγεννώμενου άκρου καθορίζεται από την -τοπικά και χρονικά- ιεραρχημένη έκφραση των ομοιωτικών γονιδίων,
- 2) τα ρετινοειδή ασκούν την ειδική επίδρασή των μέσω των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών υποδοχέων που τα δεσμεύουν και που αλληλεπιδρούν -ως μεταγραφικοί παράγοντες- με τα ομοιωτικά γονίδια, τροποποιώντας το προκαθορισμένο (*wild type*) πρότυπο της έκφρασής των,
- 3) τα ρετινοειδή επανεξιδικεύουν την τοπική μνήμη των βλαστηματικών κυττάρων που οργανώνουν το αναγεννητικό πεδίο, προς εγγύτερες ανατομικές διατομές του εγγύς-μακράν άξονα του άκρου και / ή πρωιμότερα στάδια της οντογένεσής του, αλληλεπιδρώντας με τα διαθέσιμα ομοιωτικά γονίδια κατά τρόπο που τροποποιεί και / ή αντιστρέφει ενδεχομένως, την ιεραρχημένη έκφρασή τους (Torok et al., 1998).

#### 4.5.b. HOX Γονίδια και Ρετινοειδή

Τα ρετινοειδή μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των Hox γονιδίων τόσο σε κυτταρικές σειρές (τερατοκαρκινώματος) όσο και σε εμβρυϊκούς ιστούς, όπως ο ρομβοειδής εγκέφαλος και η βραγχιακή περιοχή του κρανίου στα θηλαστικά, που εκδηλώνουν τερατογόνο απόκριση στις επιδράσεις του ρετινοϊκού οξέος.

- Η αλληλεπίδραση μεταξύ ρετινοϊκού οξέος και Hox γονιδίων μεσολαβείται μέσω των κυτταροπλασματικών, καθώς και των πυρηνικών υποδοχέων του, οι οποίοι αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες (Σιάπικα, 2006; Beauchemin et al., (1998).
- Ταυτοποίησαν στοιχεία **RAREs (Retinoic Acid Response Elements)** σε αλληλουχίες των 3' Hox γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια των Hoxa-1 και Hoxb-1 που καθορίζουν (εξειδικεύουν) τον κεφαλουραίο άξονα, ρυθμίζονται επίσης από RAREs. (Marshall et al., 1994).
- Στα Hox γονίδια που εκφράζονται στα φύτρα των άκρων κατά μήκος του εγγύς μακράν-περιφερικού άξονα, παρατηρείται αρχικά έκφραση των 3' γονιδίων, ενώ η έκφραση των 5' γονιδίων γίνεται τελευταία ([www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox\\_pro/zpa.html](http://www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox_pro/zpa.html))
- Διάσπαση που στοχεύει στα hoxd-11 και στα hoxa-11 γονίδια ταυτόχρονα προκαλεί έλλειψη κερκίδας και ωλένης στα πρόσθια άκρα ποντικού (Davis et al., 1995).
- Επαγωγή έκτοπων άκρων συνοδεύεται από αναδιευθέτηση του τοπογραφικού σχεδίου έκφρασης των hox (hoxb-9, hoxc-9, hoxd-9) γονιδίων στην πλευρική πλάκα μεσοδέρματος (Cohn et al., 1997; Chambon P., 1993; Cormier S.A., 2003; Cowan C.M., 2005).

Σύγκριση των πειραμάτων της υπο-έκφρασης των Hox γονιδίων με τα αποτελέσματα της προκαλούμενης -από ρετινοϊκό- τερατογένεσης, επαληθεύει ότι τα ρετινοειδή επηρεάζουν την ανάπτυξη μέσω της ρύθμισης των Hox γονιδίων. Έκθεση των εμβρύων σε εξωγενές ρετινοϊκό, το οποίο αυξάνει τα επίπεδα των ρετινοειδών κατά μήκος του κεφαλουραίου άξονα του σώματος, επεκτείνει τα πρόσθια όρια κάποιων Hox γονιδίων και μπορεί να μετατρέψει πρόσθιες δομές σε οπίσθιες δομές. Αυτό οφείλεται, στη συμμετοχή των ενδογενών ρετινοειδών στην εγκαθίδρυση του προσθοπίσθιου προτύπου έκφρασης των Hox γονιδίων. Για παράδειγμα η περίσσεια ρετινοϊκού κατά την μορφογένεση του κυρίως εμβρυϊκού άξονα ρυθμίζεται ομοιοστατικά από την διακοπή της έκφρασης των Hox γονιδίων στον οπισθοεγκέφαλο.

Οι φαινότυποι τερατογένεσεων, προκαλούμενων από ρετινοειδή, επιδεικνύουν συστηματικές ομοιότητες, γεγονός που επιτρέπει τη γενίκευση ενός μοντέλου ερμηνείας των μηχανισμών όπου εμπλέκονται Hox γονίδια. Κατά τη μορφογένεση συμβαίνει φυσιολογικά, τοπικά και χρονικά ελεγχόμενος προκαθορισμένος θάνατος-απόπτωση (*apoptosis*) που οφείλεται στην δράση ειδικών γονιδίων. Σε πολλές δομές που προορίζονται να υποβληθούν σε πρότυπα απόπτωσης (χάραξη σχεδίου, *pattern formation*) προτυπώνονται οι επικείμενες νεκρωτικές ζώνες ως συνάρτηση της έκφρασης ομοιωτικών γονιδίων [Εικ. II.5.35.].

#### 4.5.c. HOX Γονίδια και Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος

Κατά την μορφογένεση μιας αναπτυσσόμενης εμβρυϊκής δομής, στη σταδιακή διάπλασή της συμβάλλει φυσιολογικά η απόπτωση που ελέγχεται από τη δράση ειδικών γονιδίων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και ορισμένα που μπορούν να δράσουν ως τελεστές των ομοιωτικών γονιδίων (*downstream effectors*). Συνεπώς ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος συμμετέχει συστηματικά και κατά τρόπο ώστε τα τοπικά και χρονικά πρότυπα έκφρασης των εμπλεκόμενων ομοιωτικών γονιδίων, να κατανέμονται σε κυτταρικούς υποπληθυσμούς, των οποίων ο εντοπισμός περιορίζεται από ευδιάκριτα γεωμετρικά όρια που διαμερισματοποιούν εντέλει σε ολόκληρη την επιμέρους ανατομική δομή (π.χ. την καταβολή του άκρου) τις θέσεις επικείμενης απόπτωσης, που ονομάζονται «νεκρωτικές ζώνες» (*necrotic domains*).



#### 4.6. Τα μοντέλα μορφογένεσης

##### 4.6.1. Αναπαράσταση του μορφογενετικού πεδίου με τα Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων

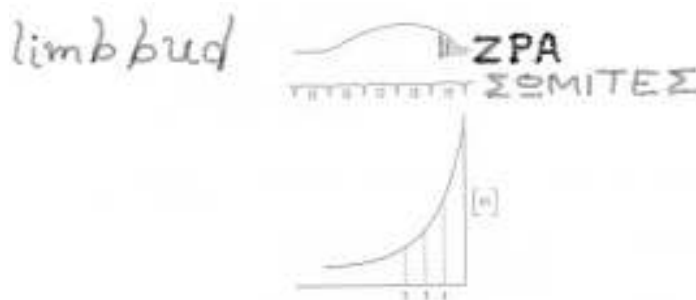
Πληθώρα πειραματικών δεδομένων από αναπτυσσόμενα και αναγεννώμενα άκρα υποδηλώνουν την παρουσία κοινού προτύπου σχηματισμού που φαίνεται να διατηρεί πολλά από τα βασικά του χαρακτηριστικά και στις φυσιολογικές (*epimorphic regeneration*) και στις παρεκκλίνουσες (*heteromorphic regeneration*) περιπτώσεις. Για την ερμηνεία των κοινών αυτών χαρακτηριστικών καταστρώθηκαν σχηματικά μοντέλα που βασίστηκαν σε ποικίλες παραμέτρους της αρχέτυπης ανατομίας του άκρου, όπως είναι αυτά που προσδιορίζουν την πλευροπόλωση (*chirality*) του, τη σχετική διάταξη επιμέρους ανατομικών δομών κατά μήκος και πλάτος των κύριων αξόνων ασυμμετρίας, κλπ. Όλη αυτή η προσέγγιση συσχετίζεται υπό τον αναπτυξιακό όρο «ετερομορφισμοί» (*“heteromorphosis”*), του οποίου την ασάφεια αποπειρώνται να διαλευκάνουν οι διάφορες θεωρίες περί μορφογένεσης του άκρου των σπονδυλοζώων. Σε αυτή την κατηγορία κατατάσσονται και τα λεγόμενα υπεράριθμα άκρα (*supernumerary regenerates*). Ποικίλες πειραματικές διατάξεις εφαρμόστηκαν, από τις οποίες ενδιαφέρουν εν'προκειμένω, η εξωγενής χορήγηση ρετινοειδών άνευ ή συμπαρουσία αναστολέων τους, καθώς και οι ετερόπλευρες (*contralateral*) και οι ομόπλευρες (*ipsilateral*) μεταμοσχεύσεις άκρων σε συνδυασμό με περιστροφές κατά  $180^\circ$  των επιφανειών ακρωτηριασμού, μοσχεύματος και κολοβώματος, σε προνύμφες άνυρων αμφιβίων.

##### 4.6.2. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων

###### 4.6.2.α. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων: Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΚΡΟΥ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Υποστηρίζουν γενικά πως τα κύτταρα στο μορφογενετικό πεδίο του αναπτυσσόμενου οργάνου εφοδιάζονται με μια μορφή «διατεταγμένης τοπογραφικής πληροφόρησης» για τις «ανατομικές συντεταγμένες» (τοπική πληροφορία, πληροφορία θέσης, *positional information*) της σχετικής θέσης που καταλαμβάνουν στο πεδίο αυτό, για δεδομένο στάδιο της ανάπτυξης του πολυκύτταρου οργανισμού.

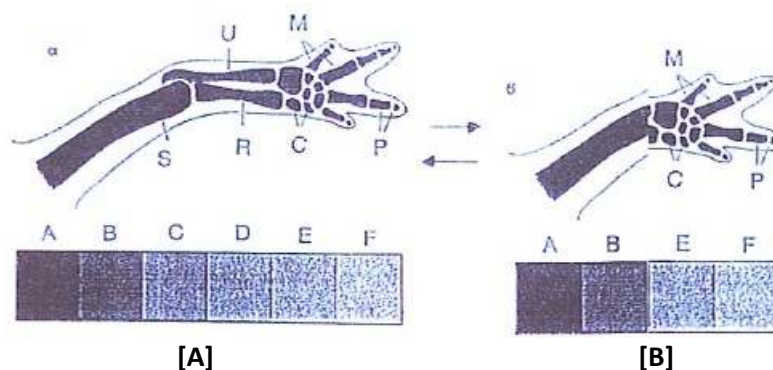
Αυτή η μορφή πληροφορίας που επανατροφοδοτείται και καταχωρείται στο αναπτυξιακό πρόγραμμα του κυττάρου, αποτελεί μια κωδικοποιημένη ενημέρωση για ποικίλες παραμέτρους του εγγύτερου και / ή του απώτερου ανατομικού περιβάλλοντός του και συμβάλλει στην καθοδήγηση της τροχιάς διαφοροποίησης την οποία διανύει σε δεδομένο αναπτυξιακό στιγμιότυπο. Στο βλάστημα (ή φυτό, καταβολή) του αναπτυσσόμενου και / ή αναγεννώμενου άκρου της κότας εντοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα του, μια ολιγάριθμη ομάδα εξειδικευμένων κυττάρων, που συνιστούν την επανομαζόμενη «ζώνη πολωτικής ενεργότητας» (ΖΠΕ) (**Zone of Polarising Activity, ZPA**) και παράγουν το μορφογόνο, το οποίο διαχέεται και κατανέμεται τοπογραφικά υπό τη μορφή μιας πολωμένης και ασύμμετρης κλίσης συγκέντρωσης, μέσω της οποίας η τοπική πληροφορία για την προτύπωση (χάραξη σχεδίου, *pattern formation*) της προβλεπόμενης διαδοχής των δακτύλων -4, -3, -2, εξειδικεύεται και τελεσφορεί [Εικ. II.3.17.].



**Εικόνα II.4.24.:** Τα κύτταρα που βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αποκτούν την τοπική πληροφορία να σχηματίσουν το δάκτυλο-4. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σχηματίζονται το δάκτυλο-3 και το δάκτυλο-2. Μακρύτερα από το δάκτυλο-2, η συγκέντρωση του μορφογόνου έχει αραιωθεί σε αμελητέα πυκνότητα, ώστε αδυνατεί να υποστηρίξει σχηματοποίηση και άλλου δακτύλου (Muneoka K. et al., 1986).

#### 4.6.2.b. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων: Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΚΡΟΥ ΤΩΝ ΑΜΦΙΒΙΩΝ

Το μοντέλο της κλίσης των μορφογόνων υποστηρίζεται και από τα πειραματικά δεδομένα που ερμηνεύονται με την παραδοχή ότι στο πρόσθιο άκρο (*forelimb*) ουροδελούς αμφιβίου κατανέμεται μια κλίση συγκέντρωσης {ABCDEFG} κατά μήκος του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονά του. Έστω ότι κόβουμε και απομακρύνουμε το ενδιάμεσο τμήμα του άκρου μεταξύ των εγκάρσιων επιπέδων διατομής, {B} και {E} και επανασυνδέουμε τα υπόλοιπα κομμάτια. Ως αποτέλεσμα τα εναπομείναντα κύτταρα των δυο εφαπτόμενων κολοβωματικών επιφανειών διατομής, εκτίθενται στη νέα κλίση συγκέντρωσης {ABEFG} του μορφογόνου, ενημερώνοντας το αναπτυξιακό πρόγραμμα για το τροποποιημένο περιβάλλον. Σύντομα αποκρίνονται αντισταθμιστικά στη μεταβολή αυτή, αναπληρώνοντας και διαχέοντας νέα ποσότητα μορφογόνου. Αυτή η προσαρμοστική βιοσύνθεση συμπληρώνει το χάσμα τιμών τοπικής πληροφορίας και αποκαθιστά την προκαθορισμένη ομαλότερη κλίση συγκέντρωσης {ABCDEFG}, οπότε αναπληρώνονται οι απωλεσθείσες ενδιάμεσες δομές και αποκαθίσταται αρτιμελές πρόσθιο άκρο. Ωστόσο την ανεπάρκεια των περί μορφογόνων θεωριών υποδεικνύει η ανεπιτυχής ερμηνεία πληθώρας πειραματικών αποτελεσμάτων μελέτης της αναγέννησης των άκρων σε έντομα και αμφίβια (Bohn et al., 1965, 1976; Bart et al., 1988; Mercader et al., 1999, 2000; Lawrence et al., 2000; Galindo et al., 2000; Hayashi et al., 1999; Serrano et al., 1997; Maden M., 1982; Monkemeyer J., 1992; Javois L.C. et al., 1991; Geraudie J. and Ferreti P., 1998; Mohanty-Hejmadi P. et al., 1992).



**Εικόνα II.4.25.:** [A] Κλίση συγκέντρωσης (*gradient*) μορφογόνου {ABCDEFG} σε αναγεννητικό βλάστημα άκρου (*limb bud*) ουροδέλου αμφιβίου, μεταβολή των επιμέρους συνθηκών της διαβάθμισης συγκέντρωσης κατά μήκος του προσθιοπίσθιου [A-P] άξονα ασυμμετρίας ύστερα από ακρωτηριασμό, απομάκρυνση του ενδιάμεσου {CD} τμήματος και χειρουργική συγκόλληση των ακραίων (κατάλοιπων) τμημάτων του διαγράμματος, δηλαδή κολοβώματος και μοσχεύματος και [B] αποκατάσταση ολόκληρης της προηγούμενης (αρχέτυπης) ακολουθίας {A-F} λόγω παρεμβόλιμης αναγέννησης (*intercalary regeneration*) και μορφογένεσης σύμφωνα με τον «κανόνα του ακραίου μετασχηματισμού» (*distal rule transformation*) (Koussoulakos et al., 1993; Maden et al., 1993; Geraudie J. & Ferreti P., 1998; Gardiner D.M., 2002; Evans T.R. & Kaye S.B., 1999).

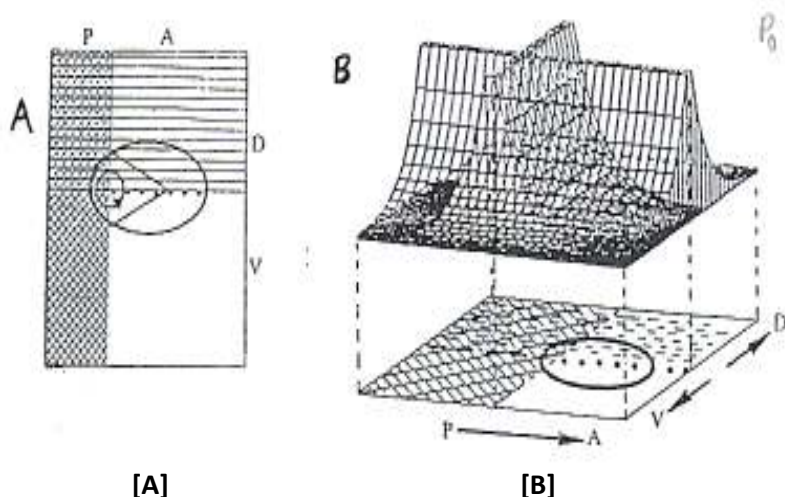
#### 4.6.3. Μοντέλα κλίσεως μορφογόνων - [Boundary Model, (Πρότυπο Ορίων) και Bootstrap Model]:

Τα μοντέλα αυτά προτάθηκαν και τα δυο, το 1983 από τον Hans Meinhardt (Meinhardt, 1983a, 1983b), στην προσπάθειά του να ερμηνεύσει τους μηχανισμούς ανάπτυξης και μορφογένεσης των άκρων σπονδυλοζώων. Το Boundary Model υποστηρίχθηκε από τον M. Maden την ίδια κιόλας χρονιά (Maden M., 1983). Το Boundary Model θεωρεί ότι η κρίσιμη τοπολογία για την αυτοοργάνωση και ανάπτυξη των οντογενετικών και / ή αναγεννητικών βλαστημάτων των

άκρων στα σπονδυλόζωα, εντοπίζεται στα όρια της γεωμετρικής τομής μεταξύ δυο καθέτως αλληλοδιασταυρούμενων διδιάστατων διαβαθμίσεων συγκέντρωσης του μορφογόνου (ή των μορφογόνων) που διατρέχουν το πλάτος και το μήκος του μορφογενετικού πεδίου του προτυπούμενου άκρου και οι οποίες είναι:

α] εκείνη που διασυνδέει το πρόσθιο (*Anterior*) με το οπίσθιο (*Posterior*) όριο της μιας κλίσης, που κατανέμεται κατά μήκος του προσθιοπίσθιου (*Anterior-Posterior*) **[A-P]** άξονα ασυμμετρίας,

β] εκείνη που διασυνδέει το ραχιαίο (*Dorsal*) με το κοιλιακό (*Ventral*) όριο της άλλης κλίσης, που κατανέμεται κατά μήκος του νωτοκοιλιακού (*Dorsal-Ventral*) **[D-V]** άξονα ασυμμετρίας του άκρου.

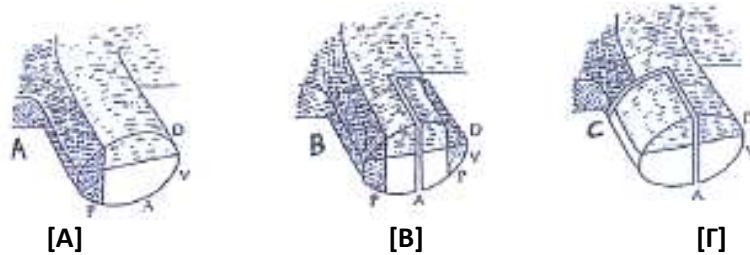


**Εικόνα 11.4.26.:** Η εγκατάσταση-εγκαθίδρυση μιας κλίσης συγκέντρωσης για ένα μορφογόνο υπόστρωμα. **[A]** Η ελλειπτική περιοχή με κέντρο την κάθετη προβολή στο επίπεδο, της διατομής **AP / DV** καθορίζει τα γεωμετρικά όρια και τις διαστάσεις του μορφογενετικού πεδίου. Η παραγόμενη τοπική πληροφορία αναπαρίστανται κατανεμημένη στις δυο ακμές του περιγράμματος του ισοσκελούς τριγώνου, που σχηματίζει το συνδυαστικό πρότυπο διασποράς του μορφογόνου, έτσι όπως υπολογίζεται με τη βοήθεια ειδικού αλγόριθμου, για την -κατά μήκος του προσθιοπίσθιου **[A-P]** άξονα ασυμμετρίας- διάχυση και για την -κατά μήκος του νωτοκοιλιακού **[D-V]** άξονα ασυμμετρίας- διάχυση. **[B]** Η συνδυασμένη κατανομή της κλίσης συγκέντρωσης του μορφογόνου αναπαριστάνεται με τη μορφή δυο παραβολοειδών πυραμίδων, των οποίων οι κορυφαίες ακμές τέμνονται αλληλοκάθετα ακριβώς πάνω από τη γεωμετρική προβολή της συγκεκριμένης **AP / DV** διατομής. Η φθίνουσα διαβάθμιση της συγκέντρωσης κατανέμεται φυγόκεντρα και ακτινοσυμμετρικά ως προς το κέντρο της **AP / DV** διατομής, υποδεικνύοντας ένα απλό γεωμετρικό υπόβαθρο για τη σχηματική μοντελοποίηση της μορφογενετικής επίδρασης προς περισσότερο "**μακράν**" (*distal*) σημεία κατά μήκος των δυο εμβρυικών αξόνων ασυμμετρίας.

Στην επιβεβαίωση της θεωρίας συνηγορούν τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία, διπλοπρόσθια άκρα (*Double-Anterior*) στερούνται αναγεννητικής δυνατότητας επειδή δεν διαθέτουν το επίμαχο αυτό σημείο της διατομής **AP / DV** των τεμνόμενων κλίσεων. Τέτοια τοπογραφικά μοτίβα διαβαθμίσεων συγκέντρωσης, υποτίθεται ότι διευθετούνται από δυο αμοιβαία αλληλεπιδρώντες κυτταρικούς υποπληθυσμούς που καταλαμβάνουν τις ανατομικές θέσεις των άκρων που αντιστοιχούν στα αντιδιαμετρικά όρια καθενός από τους δυο καρτεσιανούς άξονες όπου συγκατανέμονται οι θεωρητικές συνιστώσες της τριδιάστατης κλίσης συγκέντρωσης.

Οι δυο εμβρυικοί άξονες ασυμμετρίας του πεδίου, ο προσθιοπίσθιος (*Anterior-Posterior*) και ο νωτοκοιλιακός (*Dorso-Ventral*), συμβάλλουν αναπόφευκτα με διαφορετική επίδραση στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά και στη χρονική συνάρτηση της κατανομής, με συνέπεια ο φυσικός εντοπισμός της **AP / DV** διατομής να μην συμπίπτει με τη σχετική θέση και τις διαστάσεις της γεωμετρικής προβολής της στο επίπεδο. Πιθανότατα παράγεται μια πρόδρομη μορφή του

διαχεόμενου (διαλυτού) υποστρώματος από το ένα όριο του πεδίου που ενεργοποιείται σε λειτουργικό μορφογόνο από το αντιδιαμετρικό όριο.



**Εικόνα II.4.27.:** [A] Φυσιολογικό άκρο αμφιβίου που διαθέτει την **AP / DV** διατομή και θεωρητικώς μπορεί να αναγεννηθεί. [B] Διπλοοπίσθιο (*Double-Posterior*) άκρο που διαθέτει δυο τέτοιες διατομές και γι' αυτό έχει ισοδύναμη δυνατότητα με αυτήν του φυσιολογικού, για αναγέννηση. [Γ] Το Διπλοπρόσθιο (*Double-Anterior*) άκρο επειδή δεν διαθέτει τέτοια **AP / DV** διατομή θεωρητικώς στερείται αναγεννητικής δυνατότητας, όπως εξάλλου έχει αποδειχτεί και πειραματικά (Meinhardt H. 1983b).

#### ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ ΜΕ ΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΛΙΣΗΣ ΜΟΡΦΟΓΟΝΩΝ

Η καταβολή οργάνωσης του βλαστήματος του άκρου των σπονδυλοζώων ακολουθεί –αν και με παραλλαγές– το ίδιο βασικό πρότυπο μορφογένεσης των υπόλοιπων οντογενετικών καταβολών οργάνων (φύτρων, *rudiments*) του εμβρύου:

1] Κατ'αρχήν η *in vivo* οριοθέτηση του μορφογενετικού πεδίου του βλαστήματος, μέσα στο ανατομικό περιβάλλον του εμβρύου, αποτυπώνεται (αισθητοποιείται) μέσω μιας υπολογιστικής γεωμετρικής αναπαράστασης που έχει τη μορφή μιας διδιάστατης (επίπεδης ή καμπύλης) επιφάνειας, πάνω στην οποία προβάλλονται τα γεωμετρικά διανύσματα που αντιστοιχίζονται στις πιθανές τιμές («αξίες») που λαμβάνει δυνητικά η κλίση συγκέντρωσης ενός μορφογόνου (είτε μιας άλλης μορφογενετικής παραμέτρου / μεταβλητής). Η συνθετική κατανομή των διανυσμάτων συγκεντρώνει συνδυαστικά το πεπερασμένο εύρος όλων των πιθανών τιμών που λαμβάνει θεωρητικώς η μεταβλητή αυτή, κατά μήκος του προσθιοπίσθιου (*anterior-posterior*) και κατά μήκος του νωτοκοιλιακού (*dorsal-ventral*) άξονα ασυμμετρίας και συνοψίζει εποπτικά τη γεωμετρική αλληλεπίδρασή τους (διανυσματική σύνθεση), με τη μορφή μιας **AP / DV** διατομής.

2] Σύμφωνα με το αναφερόμενο μοντέλο (Muneoka K. et al., 1986; Scadding S.R. et al., 1994) θεωρείται ότι συντελείται σφαιρική χάραξη σχεδίου με τη δημιουργία και συγκρότηση του μορφογενετικού πεδίου στην περιοχή αυτής της διατομής. Αυτή η συνθήκη υλοποιείται με παραγωγή και διάχυση ενός ή περισσότερων μορφογόνων ως αποτέλεσμα της ειδικής αλληλεπίδρασης δυο κυτταρικών υποπληθυσμών που καταλαμβάνουν τις υποπεριοχές που οριοθετούν την **AP / DV** διατομή. Πιθανώς παράγεται η πρόδρομος μορφή του μορφογόνου από τον έναν πληθυσμό και η ενεργοποίησή του επέρχεται από την συμπαρουσία του άλλου, κατά έναν από δυο εναλλακτικούς τρόπους, ώστε:

2Α] να είναι δυνατή η εγκατάσταση δυο διαφορετικών βαθμιδώσεων, ενός και του ίδιου μορφογόνου, –μιας για τον **[A-P]** και μιας άλλης για τον **[D-V]** άξονα ασυμμετρίας,

2Β] να είναι εφικτή η παραγωγή δυο ξεχωριστών μορφογόνων, –ενός για τον **[A-P]** και ενός άλλου για τον **[D-V]** άξονα ασυμμετρίας– που κατανέμονται με τον ίδιο ή με παρόμοιους μηχανισμούς διάχυσης / διασποράς στους δυο αναπτυξιακούς άξονες.

3] Όσον αφορά την καταβολή (φύτρο, *limb bud*) του άκρου, διαπιστώθηκε ότι η οπίσθια (*posterior*) μοίρα του εγκλείει τη λεγόμενη «πολωτική ζώνη» ή «ζώνη πολωτικής ενεργότητας» (**ΖΠΕ**) (**Zone of Polarizing Activity, ZPA**) η οποία παράγει το μορφογόνο παράγοντα και μέσω της διαβαθμίδωσης της συγκέντρωσής του εγκαθιστά την προσθιοπίσθια

(*anterior-posterior*, **[A-P]**) πολικότητα και κατ'επέκταση και το γεωμετρικό πλαίσιο που καθοδηγεί την ταξιθέτηση και τη χωροχρονική ιεράρχηση της διάπλασης των δακτύλων, δηλαδή την προβλεπόμενη σειρά στον κατάλληλο χρόνο. Παράλληλα, στην ίδια διάταξη, η πρόσθια πλευρά του συστήματος λειτουργεί ως «ζώνη απόκρισης» (*competent zone*) στην τοπική και / ή χρονική βαθμίδωση του μορφογόνου, κατά τρόπο που καθορίζει τη μακροσκοπική μορφολογία του άκρου, καθώς αυτό αναπτύσσεται κατά μήκος του «εγγύς-μακράν» **[P-D]** άξονα ασυμμετρίας. Η αιτιολόγηση αυτή περί της αναπτυξιακής έκπτυξης του άκρου από τον κορμό του σώματος, προτάθηκε και στο "*Boot-strap model*", που μεταξύ άλλων πρεσβεύει τα εξής:

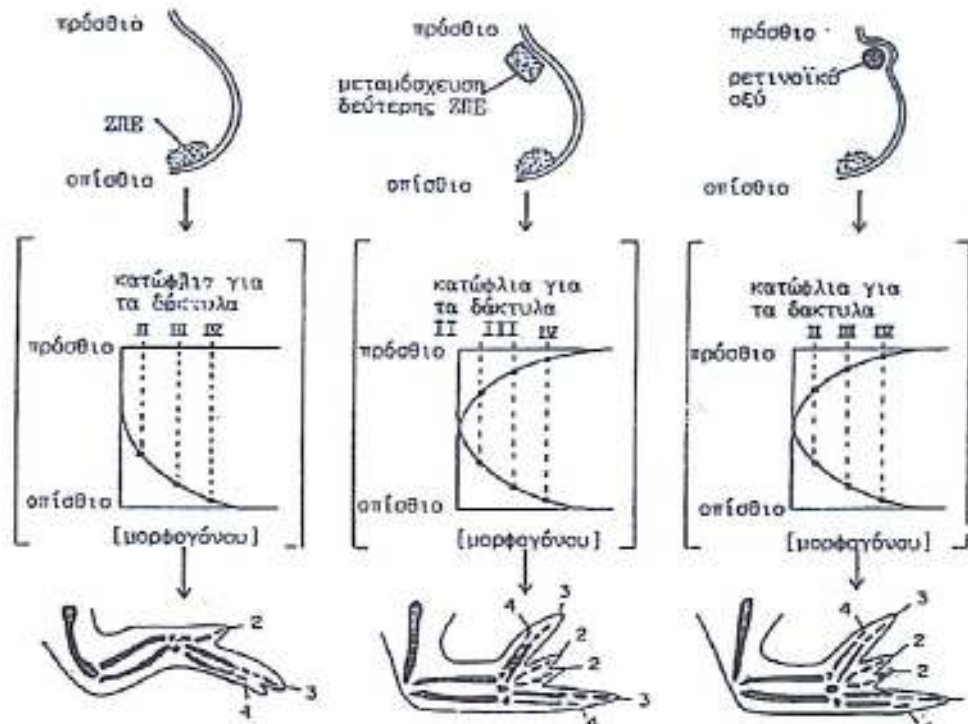
3Α] το μορφογόνο, το οποίο μέσω της κλίσης της συγκέντρωσής του ευθύνεται για τον καθορισμό του **[P-D]** άξονα παράγεται στην προαναφερόμενη **AP / DV** διατομή,

3Β] το μορφογόνο αυτό παράγεται στο απώτερο (*distal*) όριο των παρυφών του βλαστήματος (*blastema tip*), όπου διατηρεί και την υψηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά προς το υπόλοιπο εγγύτερο (*proximal*) τμήμα του,

3Γ] ενέχει τη δυνατότητα να διαχέεται και να ασκεί επαγωγή της μορφογένεσης στα μεσοδερμικά και αδιαφοροποίητα ακόμη κύτταρα που συσσωρεύονται σε όλη τη μάζα του βλαστήματος,

3Δ] με τη σταδιακή αύξηση της ποσότητας του μορφογόνου (ή γενικότερα της τοπικής παρουσίας του) επάγεται βαθμιαία η έκφραση των ομοιωτικών γονιδίων στο 5'-άκρο του συμπλέγματος, με αποτέλεσμα την κλιμάκωση της μορφοποίησης δομών με περισσότερο «μακράν» (*distal*) χαρακτήρα. Συνεπώς στα απώτερα όρια του βλαστήματος (*blastema tip*) η τοπική πληροφορία είναι ισχυρά καθοδηγητική για «μακράν» (*distal*) καθορισμό, δηλαδή για σχηματοποίηση πιο μακρινών τμημάτων του άκρου. Την υπόλοιπη μάζα του βλαστήματος και / ή του άκρου συμπληρώνουν κύτταρα ήδη καθορισμένα με μη αντιστρεπτό τρόπο προς δομές με «εγγύτερο» (*proximal*) χαρακτήρα, ως αποτέλεσμα της προγενέστερης χρονικά επαγωγής της έκφρασης των ομοιωτικών γονιδίων στο 3'-άκρο του συμπλέγματος (Venepally P. et al., 1996; Osumi-Yamashita N., 1990). Οι μηχανισμοί αναγέννησης μετά από ακρωτηριασμό, θα κινητοποιηθούν –αν πληρούνται οι υπόλοιπες προϋποθέσεις- μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του μορφογόνου κατά μήκος του *Proximo-Distal* **[P-D]** άξονα. Στην προκειμένη περίπτωση η **AP / DV** διατομή διαδραματίζει καίριο ρόλο στη μορφογένεση των δομών του στυλοποδίου, ζευγοποδίου και αυτοποδίου, τον οποίο τεκμηριώνει πληθώρα πειραματικών δεδομένων σύμφωνα με τα οποία, διπλοπρόσθια άκρα στερούνται αναγεννητικής ικανότητας αφού δε διαθέτουν τον προβλεπόμενο αυτό μορφολειτουργικό κόμβο της **AP / DV** διατομής. Επισημαίνεται ότι η δημιουργία υπεράριθμων άκρων στις πειραματικές διατάξεις προκλητής αναγέννησης, αποδίδεται στη δημιουργία νέων και κατά συνέπεια έκτοπων **AP / DV** διατομών που προκύπτουν ως απώτερο αποτέλεσμα της γειτνίασης κυττάρων, τα οποία αντιπροσωπεύουν αντιπαρατιθέμενους άξονες ασυμμετρίας και κατ'επέκταση αντανakλούν τη διένεξη (ή την ασυνέχεια) μεταξύ των διαφορετικών τοπικών πληροφοριών τους.





**Εικόνα II.4.28.:** Η πρώτη (πάνω) σειρά εικόνων αναπαριστά διαγραμματικά τους πειραματικούς χειρισμούς που εφαρμόζονται στο βλάστημα του άκρου από κοτόπουλο, με σκοπό τον κατοπτρικό διπλασιασμό της τοπικής πληροφορίας για τον προσθιοπίσθιο (Anterior-Posterior, [A-Po]) άξονα ασυμμετρίας (Tabin C.J. et al., 1991; Tickle C. et al., 1983; Summerbell D. et al., 1983). Η δεύτερη (ενδιάμεση) σειρά εικόνων παριστάνει τις κλίσεις συγκέντρωσης για το υποθετικό μορφογόνου της πηγής ΖΠΕ (ή ZPA). Η τρίτη (κάτω) σειρά δείχνει το μορφολογικό φαινόμενο των σχηματιζόμενων άκρων:

[Α] προϊόν επιμορφικής αναγέννησης, δηλαδή κανονικό άκρο (1<sup>η</sup> στήλη),

[Β] ετερομορφικό αναγέννημα με υπεράριθμα δάκτυλα (*supernumerary digits*), που παράγεται ύστερα από μεταμόσχευση και δεύτερης ΖΠΕ (ή ZPA) (2<sup>η</sup> στήλη),

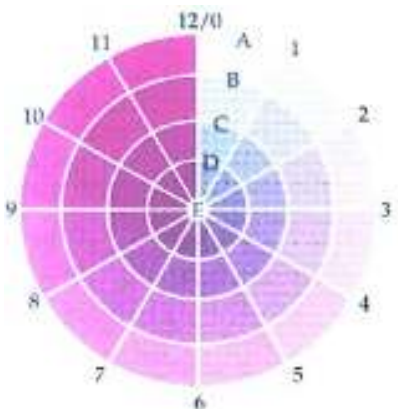
[Γ] ετερομορφικό αναγέννημα με υπεράριθμα δάκτυλα (*supernumerary digits*), που παράγεται ύστερα από χορήγηση εξωγενούς ρετινοϊκού οξέος (3<sup>η</sup> στήλη).

#### 4.6.4. Μοντέλα πολικών συντεταγμένων: Polar Coordinate Model (PCM) και Hierarchical Polar Coordinate Model (HPCM)

##### ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ ΜΕ ΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΟΛΙΚΩΝ ΣΥΝΤΕΤΑΓΜΕΝΩΝ

Το 1976 οι V. French, S. And P. Bryant με αφετηρία την πληθώρα πειραματικών δεδομένων από αναπτυσσόμενα και αναγεννώμενα άκρα σπονδυλωτών και ασπόνδυλων, πρότειναν ένα σύνολο από κανόνες, ικανών να ερμηνεύουν και να προβλέπουν ποικίλες φυσιολογικές και μη, μορφολογικές παραλλαγές της ανάπτυξης και της αναγέννησης στα άκρα των αμφιβίων. Βασιζόμενοι στον Wolpert (1969) που πρώτος ανέφερε ένα πρότυπο που αναφέρεται στην «ικανότητα μνήμης» του κυττάρου με την οποία αναγνωρίζει τη σχετική τοπογραφική θέση του σε έναν αναπτυσσόμενο κυτταρικό πληθυσμό, οι τρεις παραπάνω ερευνητές υπέθεσαν ότι οποιοδήποτε κύτταρο είναι ικανό να προσδιορίζει ποιοτικά και ποσοτικά την ανατομική θέση του στον πολυκύτταρο οργανισμό, υπό τη μορφή μιας «πληροφορίας (αξίας) θέσης», την οποία υπολογίζει σε ένα σύστημα πολικών (*clocklike*) συντεταγμένων.

Στο σύστημα αυτό κάθε κύτταρο εφοδιάζεται με ορισμένο φορτίο τοπικής πληροφορίας ανάλογα με την ακριβή θέση του σε μια κυκλική περιφέρεια, καταμερισμένης σε μια κλειστή ακολουθία 12 αξιών και ανάλογα με τη σχετική θέση του κατά μήκος μιας ακτίνας, διαβαθμισμένης αυθαίρετα σε μια γραμμική αλληλουχία αξιών, την οποία περιγράφει μια διαδοχή γραμμάτων, έστω από Α έως Ε. Στα αναπτυσσόμενα και αναγεννώμενα άκρα ο εξωτερικός (μεγαλύτερος) κύκλος αντιστοιχεί στο εγγύτερο όριο, στη βάση του άκρου (*proximal* περιοχή, ώμος), ενώ ο εσωτερικός στο απώτερο όριο, στο τέλος του άκρου (*distal* περιοχή, δάκτυλα).



**Εικόνα II.4.29.: Polar Coordinate Model:** Κάθε κύτταρο στο θεωρούμενο πεδίο εφοδιάζεται με ειδική τοπική πληροφορία που συγκεκριμενοποιείται για κάθε ανατομική θέση, σε συνάρτηση με δυο διακριτές παραμέτρους, των οποίων οι κλίμακες αξιών αλληλοσυμπλέκονται ακτινοσυμμετρικά υπό μορφήν επίπεδου πολικού συστήματος συντεταγμένων και έτσι ώστε:

- α) Η μια λαμβάνει τιμές από μια κλίμακα αξιών της οποίας οι διαβαθμίσεις κατανέμονται κατά μήκος μιας ακτίνας του επίπεδου πολικού συστήματος, έτσι ώστε κάθε τιμή {Α – Ε} να αντιπροσωπεύει μια μεμονωμένη, από την αλληλοδιαδοχή των ομόκεντρων διατομών που αναπαριστούν τη διαβάθμιση της τοπικής πληροφορίας κατά μήκος και πλάτος της μάζας που κατανέμεται στους δυο εμβρυικούς άξονες ασυμμετρίας (**AP / DV**) του θεωρούμενου πεδίου.
- β) Η άλλη λαμβάνει τιμές από μια κυκλική (κλειστή) κατανομή που επαναλαμβάνεται ομοιομορφικά στην περίμετρο καθεμιάς από τις ομόκεντρες διατομές μεταβλητής ακτίνας.

Μια από τις βασικότερες αρχές του μοντέλου PCM είναι ο λεγόμενος «κανόνας της συντομότερης παρεμβολής» (*Shortest Intercalation Rule*), σύμφωνα με τον οποίο όταν δύο μη γειτονικά κύτταρα έρχονται σε επαφή, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις χειρουργικής περιστροφής εμβρυικών αξόνων σε ομόπλευρη (*ipsilateral*) μεταμόσχευση, τότε τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν κατά τη μορφογένεση και καταλαμβάνουν τον ενδιάμεσο χώρο, εφοδιάζονται με τις τοπικές πληροφορίες που κανονικά αντιστοιχούν στο μικρότερο από τα δυο πιθανά τόξα της περιμέτρου της αντίστοιχης κυκλικής διατομής του πεδίου.

Για παράδειγμα όταν τα κύτταρα με τιμές 4 και 7 του κυκλικού δίσκου συμβεί να γειτνιάσουν πειραματικά, τότε η διένεξη τοπικής πληροφορίας εκτονώνεται (ή αμβλύνεται) με παρεμβολή νέων κυττάρων (*intercalary regeneration*), για τη διευθέτηση των οποίων υπάρχουν δύο διαθέσιμες ακολουθίες συμπλήρωσης των απόντων ενδιάμεσων τιμών:

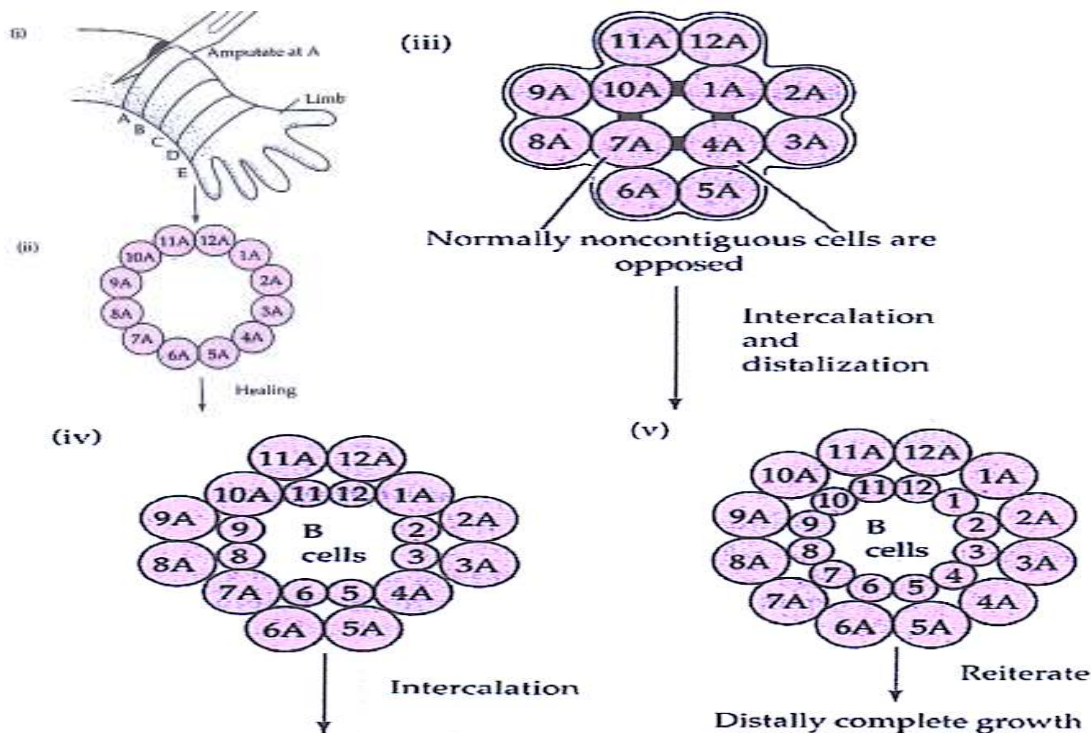
- η μια πιθανή σειρά αξιών ακολουθεί το τόξο που περιέχει τις τιμές 4,5,6,7 και
- η άλλη πιθανή σειρά αξιών παρατάσσεται στο τόξο με τις τιμές 4,3,2,1,12,11,10,9,8,7.

Λαμβάνοντας υπόψιν τον κανόνα του μοντέλου, ευνοείται το τοπογραφικό μοτίβο πολλαπλασιασμού που παράγει κύτταρα προς την κατεύθυνση του μικρότερου τόξου, μέσω της οποίας συμπληρώνεται συντομότερα το κενό των απόντων τιμών τοπικής αξίας. Με άλλα λόγια η



παράταξη των αναπληρωτικών τοπικών αξιών είναι εκλεκτική και ευνοεί τον ελάχιστο δυνατό αριθμό παρεμβαλλόμενων κυττάρων, που θα απαιτούσε η συμπλήρωση του χάσματος. Αυτή η εκδοχή είναι σύμφωνη με την ευρεία παραδοχή ότι στη μορφογένεση συμβάλλει αναπόσπαστα -εκτός από τον πολλαπλασιασμό- και η χάραξη σχεδίου, ως ξεχωριστή αυτοτελής διαδικασία.

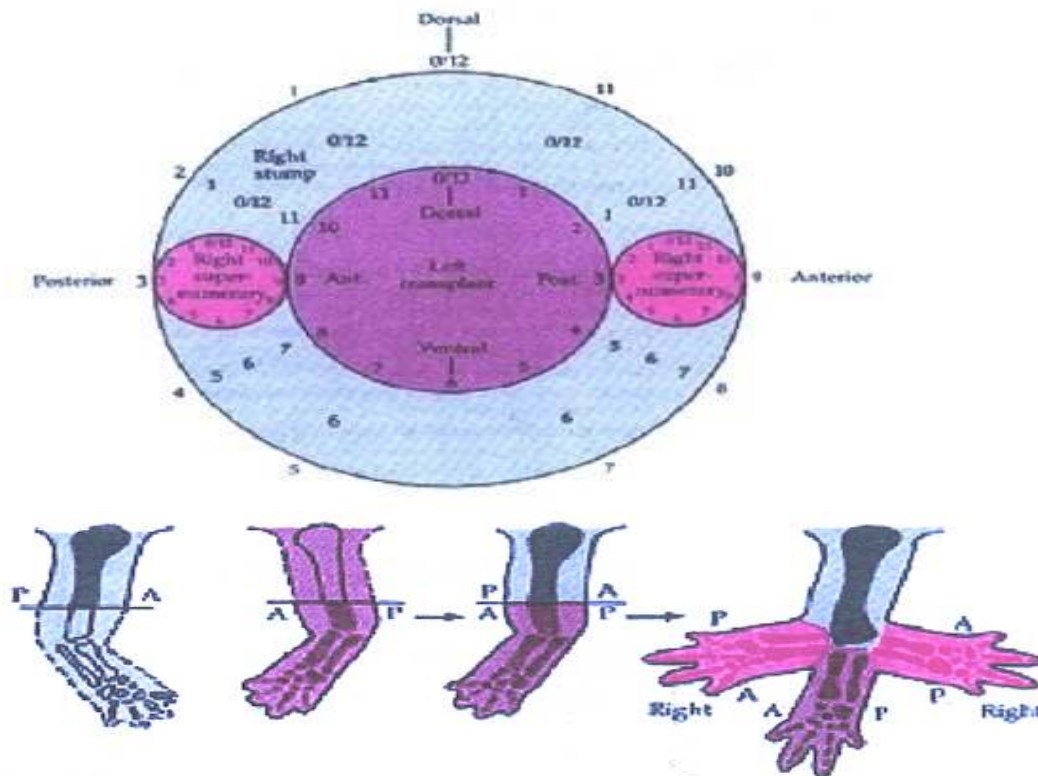
Εξαίρεση πάντως αποτελούν τα κύτταρα τα οποία εντοπίζονται ακριβώς αντιδιαμετρικά στην περίμετρο του κυκλικού δίσκου, για τα οποία δεν ορίζεται ευνοϊκότερη διεύθυνση. Σε αυτή την περίπτωση η εκπλήρωση της ευνοϊκότερης διευθυνσιοδότησης των θυγατρικών κυττάρων που παράγονται από μια τέτοια συμμετρική μορφογενετική ακολουθία κυτταροδιαιρέσεων, δεν ανάγεται σε ευλογοφανείς κυτταροβιολογικούς όρους.



**Εικόνα 11.4.30.: Μοντέλο περιφερειακής ανάπτυξης:** (i, ii) το άκρο κόβεται στη θέση A, εγγύτερα των θέσεων {B – E}. Έτσι εκτίθενται οι περιφερειακές θέσεις του {A}. Η επούλωση οδηγεί στο πλησίασμα φυσιολογικά μη γειτονικών κυττάρων {10A – 1A} κοντά στο άκρο του βλαστήματος. Τα «A» κύτταρα αυτά στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και αποκτούν εξειδικευμένες θέσεις, ενώ μοιράζονται τις ίδιες περιφερειακές τιμές με τα προϋπάρχοντα γειτονικά πλέον, κύτταρα. Δηλαδή, τα θυγατρικά κύτταρα αποκτούν ενδιάμεσες τιμές {10A – 11 – 12 – 1A} προς τον «μακράν» άξονα και επάγουν δάκτυλα (νόμος του -κατά μακράν- μετασχηματισμού, *distalization rule*). (iv, v) η παρεμβολή (*intercalation*) συμβαίνει μεταξύ των νέων κυττάρων, δημιουργώντας καινούρια «επιφάνεια» που φέρει όλες τις περιφερειακές τιμές. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη (ή αναγέννηση) του άκρου (Bryant et al., 1981).

Ο δεύτερος νόμος του PCM είναι ο «κανόνας του πλήρους κύκλου» για μετασχηματισμό προς τον μακράν άξονα (*Complete Circle Rule for Distal Transformation*). Καθώς ο πλήρης κύκλος των τοπικών πληροφοριών σχηματίζεται στην επιφάνεια του τραύματος, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και παράγουν όλο και πιο «μακράν» (*distal*) ιστούς. Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό λαμβάνει χώρα φαίνεται στην προηγούμενη εικόνα και περιλαμβάνει πάλι το φαινόμενο της παρεμβολής (*intercalation*) «κυτταρικής ή κελλωτής μάζας» μεταξύ κυττάρων με διαφορετικές (ασυνεχείς) πληροφορίες θέσης (Bryant et al., 1981).

Οι δύο παραπάνω κανόνες βρίσκουν εφαρμογή όταν ένα μόσχευμα τοποθετείται πάνω στο κολόβωμα με ανεστραμμένο τον προσθιοπίσθιο [A-P] άξονα. Το αποτέλεσμα είναι συνήθως ένα ετερομορφικό σύμπλεγμα υπεράριθμων άκρων με τρία μακράν τμήματα (Iten L.E. et al., 1975). Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί θεωρώντας τον προσθιοπίσθιο [A-P] άξονα σαν ένα πλέγμα με τιμές 9 και 3 αντίστοιχα. Καθώς οι άξονες αντιπαραβάλλονται (τιμές 3 και 9), δημιουργούνται μεταξύ τους δύο πλήρεις κυκλικές σειρές τοπικών συντεταγμένων, οι οποίες δίνουν στην πορεία, μαζί με το μόσχευμα, τρία ολοκληρωμένα και αυτοτελή άκρα τα οποία όμως εκφύονται από την κοινή επιφάνεια της χειρουργικής τομής και αποτελούν την ανατομική συνέχεια ή προέκτασή της σύμφωνα με το νόμο του -κατά μακράν- μετασχηματισμού (ή «κανόνα του ακραίου μετασχηματισμού», *distal rule transformation*). Το μοντέλο των πολικών συντεταγμένων ερμηνεύει και την περίπτωση κατά την οποία κομμάτι ιστού έχει χαθεί [Εικ. II.4.25.] (Koussoulakos S. et al., 1993).



**Εικόνα II.4.31.:** Αντιστροφή στον προσθιοπίσθιο άξονα σε αναγεννώμενο βλάστημα σαλαμάνδρας: Μεταμοσχεύοντας το βλάστημα του αριστερού πίσω άκρου, πάνω στο δεξί κολόβωμα, δημιουργούνται τρεις «μακράν» (*distal*) περιοχές στο τέλος του άκρου. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με τη βοήθεια του μοντέλου των πολικών συντεταγμένων, σύμφωνα με το οποίο δύο πλήρεις σειρές ενδιάμεσων τιμών πρέπει να δημιουργηθούν σε αντίθεση με τις φυσικές τιμές του μοσχεύματος (French et al., 1976).

Τα νέα κύτταρα που θα δημιουργηθούν θα έχουν τοπικές πληροφορίες κοντινές με αυτές εκείνων που παρέμειναν και θα έχουν τη δυνατότητα να αναπλάσουν τη μάζα κυττάρων / ιστών που απουσιάζει. Το ζήτημα, όμως, όπως έδειξαν μετέπειτα πειράματα (Maden M., 1982), δεν είναι τόσο απλό. Για παράδειγμα, σε *axolotls* μπορούν να εμφανιστούν και τρία υπεράριθμα και μάλιστα σε θέσεις εκτός των οπίσθιοραχιαίων (*Posterior-Dorsal*) και πρόσθιοκοιλιακών (*Anterior-Ventral*) (Maden M. et al., 1978, 1980). Επιπλέον υπεράριθμα παράγονται όχι μόνο μετά από περιστροφή **180°**, αλλά και σε άλλες γωνίες συγκόλλησης των επιφανειών ακρωτηριασμού, από **0°** μέχρι και **360°** (Maden M. and Turner R.N., 1978) και σε συχνότητα που σχετίζεται με την ασυμφωνία μεταξύ των αξόνων ασυμμετρίας του βλαστήματος και του κυρίως κορμού.

Από την άλλη, ο Maden χρησιμοποιώντας σαν τρόπο προσδιορισμού του προσανατολισμού των υπεραρίθμων άκρων, διαδοχικές τομές και μελέτη των μυών, βρήκε ότι οι περιπτώσεις που προκύπτουν ύστερα από περιστροφή  $180^\circ$  μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες (τάξεις):

- ❖ [1] Υπεράριθμα (*supernumeraries*) άκρα με σχέδιο μυών κανονικό
- ❖ [2] Κατοπτρικά συμμετρικά υπεράριθμα άκρα στο ραχιαίο-κοιλιακό **[D-V]** άξονα, τα οποία είναι διπλοραχιαία ή διπλοκοιλιακά.
- ❖ [3] Υπεράριθμα άκρα που είναι ενδιάμεσα μεταξύ κανονικών και κατοπτρικά συμμετρικών. Δηλαδή, αυτά τα άκρα έχουν μισό τμήμα κανονικό, το πρόσθιο (*Anterior*) ή το οπίσθιο (*Posterior*) και το άλλο μισό κατοπτρικά συμμετρικό. Έτσι, αυτά μπορεί να είναι μισοκανονικά (*Half-Normal*) και διπλοραχιαία (*Double-Dorsal*), ή μισοκανονικά (*Half-Normal*) και διπλοκοιλιακά (*Double-Ventral*).
- ❖ [4] Υπεράριθμα άκρα με ποικίλους βαθμούς ανωμαλίας, όπως επίσης και υπεράριθμα με ένα μόνο δάκτυλο. Στην κατηγορία αυτή, περιλαμβάνονται συνήθως άκρα που τα δάκτυλά τους κάμπτονται σε αντίθετες διευθύνσεις.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι, η τρίτη και τέταρτη κατηγορία βρέθηκαν μόνο σε απλά υπεράριθμα άκρα. Μελέτη επίσης, της αναγέννησης και στις τέσσερις περιπτώσεις, έδειξε ότι γενικά όλες οι τάξεις αναγεννούν κανονικά (με μικρές διαφορές), ακριβώς τα ίδια σχέδια και τις ίδιες ανωμαλίες μυών. Τα αποτελέσματα αυτά, κυρίως στις τάξεις [3] και [4], έρχονται σε αντίθεση με το μοντέλο πολικών συντεταγμένων, καθώς και με άλλα μοντέλα που στηρίζονται σε «τοπικούς παρεμβόλιμους δίσκους» (*local intercalation rules*), διότι σύμφωνα με αυτούς τους κανόνες, ανωμαλίες και μεγάλες εσωτερικές ασυνέχειες (περιπτώσεις [3] και [4]) δεν θα έπρεπε να υπάρχουν, αφού η ανομοιότητα των θέσεων θα έπρεπε να δημιουργήσει ανάπτυξη, η οποία θα παρήγαγε αύξηση υπεραρίθμων μέσα στα υπεράριθμα. Επίσης, αυτά τα μοντέλα και ιδιαίτερα το Polar Coordinate Model, έρχονται σε πλήρη σύγκρουση και με το γεγονός της τέλει αναγέννησης των ανωμαλιών, αφού τα υπεράριθμα θα έπρεπε να δημιουργήσουν και επιπλέον υπεραριθμίες, παρά αναγέννηση της ίδιας κατασκευής.

Ένα άλλο μειονέκτημα του μοντέλου των πολικών συντεταγμένων είναι ότι ορισμένα συμπεράσματά του έχουν βασιστεί σε αποτελέσματα πειραμάτων με διπλοραχιαία (*Double-Dorsal*) και διπλοκοιλιακά (*Double-Ventral*) άκρα, που δημιουργήθηκαν με χειρουργικό τρόπο και έτσι μπορεί να παρατηρήθηκαν σε αυτά και φαινόμενα που είχαν σχέση με τη χειρουργική επέμβαση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ-5<sup>ο</sup>: Θεωρία της πληροφορίας θέσης (ή τοπικής πληροφορίας, *Positional Information*)

### 5.1. Η *in vivo* εκδοχή της πληροφορίας θέσης.

Αξιοσημείωτη συνεισφορά στην ερμηνεία των πειραματικών δεδομένων και των παρατηρήσεων που αφορούν ποικίλες παραλλαγές των αναγεννητικών φαινομένων στα αμφίβια, έχει προωθήσει η μακρόχρονη πρόσδος στη θεωρία της πληροφορίας θέσης (Κωσταρίδης, 1984; Wolpert L., 1969, 1970). Οι βασικές προτάσεις της, όσον αφορά την πρωτογενή (οντογένεση, *ontogenesis*) και τη δευτερογενή ανάπτυξη (αναγέννηση, *regeneration*), συνοψίζονται ως εξής:

α] Υπάρχουν βιολογικοί μηχανισμοί που χαρακτηρίζονται μορφογενετικοί επειδή συνυπολογίζουν βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες προκειμένου να «εντάξουν» τα θυγατρικά κύτταρα κάθε (συμβάντος) κυτταροδιαίρεσης, στο τοπικό αναπτυσσόμενο σύστημα (γειτονιά ή δίκτυο) κυττάρων όπου «ανήκουν» φυσιολογικά. Το αποτέλεσμα των μορφογενετικών διεργασιών που συνοδεύουν τις *in vivo* αλλά και τις *in vitro* κυτταροδιαιρέσεις, βαίνει κατά τέτοιο τρόπο ώστε κάθε κύτταρο να καταλαμβάνει ειδική τοπογραφική θέση σε σχέση με ένα ή με περισσότερα σημεία αναφοράς μέσα στα όρια του πολυκυτταρικού συστήματος που το πλαισιώνει, είτε αυτό αντιπροσωπεύεται από ολόκληρο τον εμβρυακό οργανισμό, είτε από μια εξειδικευμένη εμβρυική καταβολή (π.χ. άκρου, *limb bud*), είτε από μια ακόμη περισσότερο περιορισμένη κυτταρική ομάδα-γειτονιά. Τα κύτταρα του αναπτυσσόμενου συστήματος, συναπαρτίζουν *μορφογενετικό πεδίο* (*morphogenetic field*) όταν όλα είναι εφοδιασμένα με τις επιμέρους τιμές (ή «αξίες») που συμπληρώνουν μια φυσική ακολουθία, η οποία αντανακλά τη συνεχή διαδοχή τιμών που είναι κατανεμημένες σε καθέναν από τους άξονες ασυμμετρίας του πεδίου και είναι συσχετισμένες με κοινό σύστημα σημείων αναφοράς.

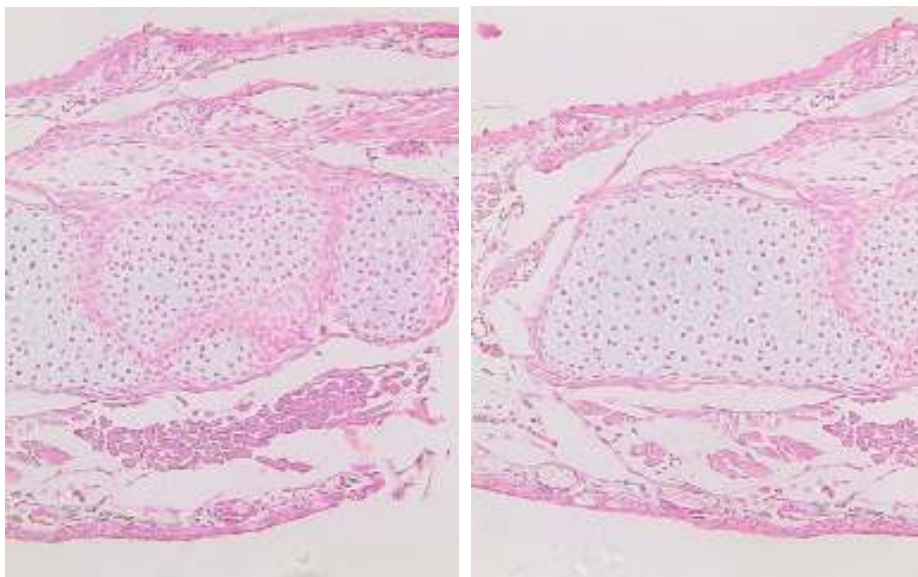


**Εικόνα II.5.32.:** Τοπολογία φυτικού μορφογενετικού πεδίου: Τα στιγμιότυπα απεικονίζουν απόψεις της κυτταροβριθούς επιφάνειας των νηματίων από θαλλούς υδρόβιου φυτικού οργανισμού (*Cladophora sp.p.*). Η αρχιτεκτονική της επιδερμίδας που οριοθετεί το δεδομένο κοίλο φυτικό όργανο, είναι ισοδύναμη εκείνης των μονόστοιβων επιθηλίων του ζωικού βασιλείου. Επιπλέον, δεδομένης της απουσίας αλληλεπιδράσεων με παρεγχυματικούς ιστούς κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα επιδερμικά αυτά κύτταρα αντιπροσωπεύουν ένα διδιάστατο μορφογενετικό πεδίο, οριοθετημένο σε όλη την έκταση της επιφάνειας του νηματίου. Γενικότερα, στις εγκάρσιες διατομές ενεργά φωτοσυνθετικών ιστών, όπως τα φύλλα για παράδειγμα, τα γεωμετρικά στοιχεία που αντιστοιχούν σε πολυγωνικά περιγράμματα (ακμές και κορυφές) είναι κατά κανόνα περισσότερο ευδιάκριτα, εξαιτίας του κυτταρικού τοιχώματος. Η κανονικότητα στη διεύθυνση των φυτικών κυττάρων είναι σε μείζονα βαθμό ανεξάρτητη της διαφοροποίησης και αντιπροσωπεύει αναπόσπαστη συνιστώσα της μορφογένεσής τους.

β] Η πληροφορία θέσης συναποτελεί μαζί με το γονότυπο (*genotype*) του κυττάρου και τη *χάραξη σχεδίου* (*pattern formation*), προαπαιτούμενες συνιστώσες για τον καθορισμό (*determination*) του αναπτυξιακού «πεπρωμένου» (ή «προορισμού», *prospective fate*), καθώς και για τη διαφοροποίηση (*differentiation*) του φαινότυπου. Δεδομένου του μορφογενετικού χαρακτήρα της, η εξειδίκευση της πληροφορίας θέσης (*positional information specification*) γενικά προηγείται της διαφοροποίησης του φαινότυπου. Η καταχώρηση και η αποκωδικοποίηση (ή «μετάφραση») της πληροφορίας θέσης μεσολαβείται από μορφογενετικές διεργασίες που



εφοδιάζουν το φαινότυπο με μια χρονικά και τοπικά ιεραρχημένη «κυτταρική μνήμη» της προγενέστερης αναπτυξιακής πορείας. Το «οντογενετικό εντύπωμα» αυτό αντιπροσωπεύει τα ορόσημα στιγμιότυπα της αναπτυξιακής προϊστορίας του κυττάρου και επιφέρει μια ιστοειδική δυναμική στην πλαστικότητα (ή στην αναστρεψιμότητα) του διαφοροποιημένου φαινότυπου. Δηλαδή, η πληροφορία θέσης που έχει -ήδη προ πολλού- αφομοιωθεί στο αναπτυξιακό πρόγραμμα ενός τερματικά διαφοροποιημένου κυττάρου, είναι επιδεκτική κάποιου είδους επαγωγής (**induction**) από ειδικές *in vivo* συνθήκες, όπως είναι εκείνες που επακολουθούν του ιστικού τραυματισμού (*trauma*). Για παράδειγμα, η ιστοειδική προέλευση (*origin*) των βλαστηματικών κυττάρων (*blastemal cells*) κατά την αναγέννηση των ακρωτηριασμένων άκρων στα ουρόδηλα αμφίβια, ασκεί καθοδηγητική επίδραση στη μορφογένεση του αναγεννήματος (*regenerate*) με την έννοια ότι από τις διαθέσιμες ανατομικές θέσεις του κολοβώματος (*limb stump*), οι ινοβλάστες (*fibroblasts*) που είναι εμφωλεμένοι στη *δερμίδα* (*dermis*) αντιπροσωπεύουν τον (διαφοροποιημένο ή καθορισμένο) κυτταρικό πληθυσμό που συνεισφέρει περισσότερο από οποιονδήποτε άλλο, στην χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της πλειονότητας των μεσοδερμικών ιστών (εξαιρουμένου του μυϊκού) (Muneoka K. et al., 1986).



[A]

[B]

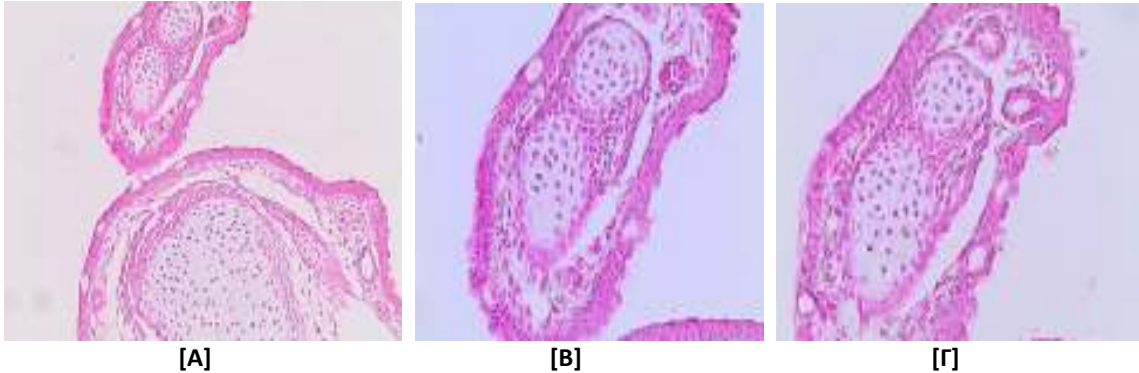
**Εικόνα II.5.33.:** Τοπολογία ζωικού μορφογενετικού πεδίου: εγκάρσιες διατομές από αναγεννητικό βλάστημα άκρου άνουρου αμφιβίου, κατά μήκος του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας της ανατομικής δομής. [A] Η γεωμετρική απόσταση μεταξύ του δεδομένου επιπέδου της διατομής και του επιπέδου της θέσης έκφυσης του βλαστήματος στον κορμό του σώματος της προνύμφης, είναι μικρότερη συγκριτικά προς την «ομόλογη απόσταση» που αντιστοιχεί για το επίπεδο διατομής που απεικονίζεται στο [B]. Και τα δυο αυτά ξεχωριστά επίπεδα διατομής αντιστοιχούν σε μια ανατομική θέση, εγγύτερου (*proximal*) εντοπισμού (εγγύτερων ανατομικών συντεταγμένων, *proximal positional information specification*), συγκριτικά προς την επόμενη εικόνα [Εικ. II.5.34.]. Η πολυγωνική σχηματοποίηση των προχονδρικών κυττάρων για τις δυο ξεχωριστές μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) είναι αμελητέα, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη μορφολογία της επόμενης εικόνας [Εικ. II.5.34.] επειδή ο βαθμός καθορισμού των κυττάρων έχει πλέον προπορευθεί προς τιμές που αντιστοιχούν σε οψιμότερα οντογενετικά στάδια.

γ) Η πόλωση (ή ασυμμετρία, *morphogenetic field polarization*) της πληροφορίας θέσης σε δεδομένο μορφογενετικό πεδίο είναι το αποτέλεσμα μιας μορφής σμίκρυνσης (ή «συμπύκνωσης») των αναλογιών και της τοπολογίας των εμβρυικών αξόνων ασυμμετρίας, συμπτωγμένων στα περιορισμένα ανατομικά όρια που καταλαμβάνει το δεδομένο μορφογενετικό πεδίο στο εμβρυικό σώμα. Αντιπροσωπεύεται από τρεις κύριες συνιστώσες που αντιστοιχούν στις επιμέρους διευθύνσεις στις οποίες η πληροφορία θέσης πρόκειται να εξειδικευθεί (*positional information specification*) στη φάση της διαφοροποίησης των κυττάρων του πεδίου, μετά την ολοκλήρωση της χάραξης σχεδίου (*pattern formation*) και σχετίζονται με:

γ1] τον εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας

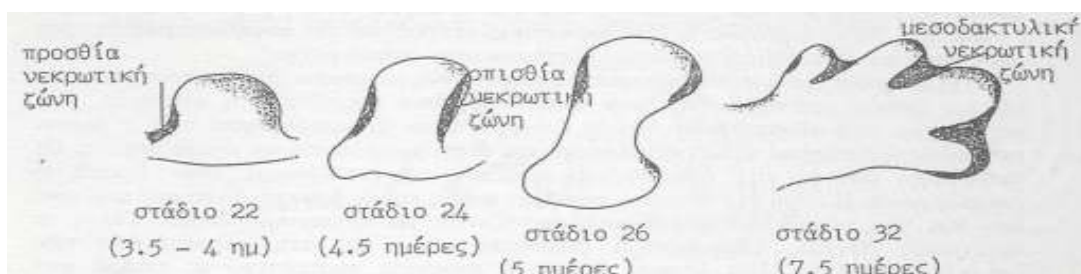
γ2] το νωτοκοιλιακό ή ραχιαιοκοιλιακό (*dorsal-ventral*) άξονα ασυμμετρίας

γ3] τον προσθιοπίσθιο (*anterior-posterior*) άξονα ασυμμετρίας



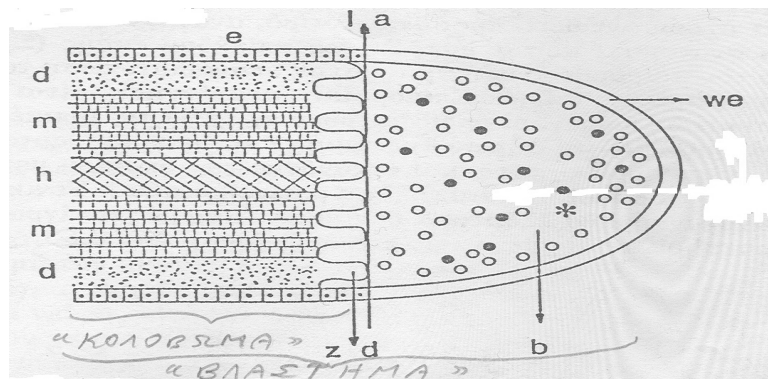
**Εικόνα II.5.34.:** Τοπολογία ζωικού μορφογενετικού πεδίου: [Α], [Β], [Γ] εγκάρσιες διατομές από αναγεννητικό βλάστημα άκρου άνουρου αμφιβίου, κατά μήκος του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας της ανατομικής δομής. [Β] Η γεωμετρική απόσταση μεταξύ του δεδομένου επιπέδου της διατομής και του επιπέδου της θέσης έκφυσης του βλαστήματος στον κορμό του σώματος της προνύμφης, είναι μικρότερη συγκριτικά προς την «ομόλογη απόσταση» που αντιστοιχεί για το επίπεδο διατομής που απεικονίζεται στο [Γ]. Και τα δυο αυτά ξεχωριστά επίπεδα διατομής αντιστοιχούν σε μια ανατομική θέση, απώτερου (*distal*) εντοπισμού (απώτερων ανατομικών συντεταγμένων, *distal positional information specification*), συγκριτικά προς την προηγούμενη εικόνα [Εικ. II.5.33.]. Η πολυγωνική σχηματοποίηση των προχονδρικών κυττάρων για τις δυο ξεχωριστές μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) είναι ακόμη ευδιάκριτη, μολονότι έχει απωλέσει το μεγαλύτερο ποσοστό από τη γεωμετρική μορφολογία που χαρακτηρίζει τα αντίστοιχα κυτταρικά σχήματα των μορφογενετικών πεδίων στις επόμενες εικόνες ([Εικ. II.5.37.], [Εικ. II.5.38.], [Εικ. II.5.39.]). Ο βαθμός καθορισμού των κυττάρων δεν έχει ακόμη προπορευθεί προς τιμές που αντιστοιχούν σε οψιμότερα οντογενετικά στάδια (Τριχρωμική Mason).

δ] Η μορφογενετική εγκαθίδρυση (ή ρυμοτομία) τέτοιας μορφής ετερογενούς (ή ασύμμετρης) τοπογραφικής κατανομής στην πληροφορία θέσης στο *in vivo* πεδίο υλοποιείται σταδιακά κατά την πρώιμη οντογένεση με τους μηχανισμούς χάραξης σχεδίου (*pattern formation*) και με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ είναι σε κάποιο κυμαινόμενο βαθμό ανεξάρτητη από την παρουσία αυτών καθαυτών των κυττάρων του πεδίου και αντανακλά μια αγχιστεία με την **αναπτυξιακή ρύθμιση (*regulation*)** που υπεισέρχεται στην οντογένεση των **ρυθμιστικών (*regulative*) εμβρύων**. Τα γεωμετρικά όρια του πεδίου δεν αντιστοιχίζονται επακριβώς και με φυσικό τρόπο -μέσω αμφιμονοσήμαντης αντιστοίχισης- στα κύτταρα που υποτίθεται ότι το οριοθετούν, αλλά σε «ισοδύναμες θέσεις τοπικής πληροφορίας», καθεμιά εκ' των οποίων μπορεί να καταλαμβάνεται από περισσότερα του ενός, κύτταρα (Trevino C., Calof A. and Muneoka K.,1992).



**Εικόνα II.5.35.:** Οι νεκρωτικές ζώνες στο αναπτυσσόμενο πρόσθιο άκρο του κοτόπουλου. Η αρίθμηση των αναπτυξιακών σταδίων είναι η συμβατική, σύμφωνα με τη σταδιογράφηση κατά Hamburger και Hamilton (Science 154: 604,. Saunders J.W, 1966).

Απότοκος αυτής της ιδιότητας που χαρακτηρίζει τις πρωιμότερες φάσεις της πρωτογενούς ανάπτυξης στους δευτεροστόμιους οργανισμούς (*deuterostomia*), θεωρείται η αναγεννητική δυναμική που παρατηρείται σε ποικίλα μορφογενετικά πεδία στο πλαίσιο της δευτερογενούς ανάπτυξης, σύμφωνα με την οποία μια ενδεχόμενη απομάκρυνση κυττάρων από το πεδίο δε συνεπάγεται και την εκμηδένισή του, καθώς τα εναπομείναντα κύτταρα είναι επιδεκτικά *επαγωγής* για τοπική αναπλήρωση της μάζας του πεδίου που εκκενώθηκε μη φυσιολογικά. Αυτή η «σφαιρική» (ή «ολιστική») δυναμική η οποία προορίζεται να αποκαταστήσει τα φυσικά όρια (ή και τις διαστάσεις) του πεδίου, μεσολαβείται κυρίως με κυτταρικό πολλαπλασιασμό και / ή κυτταρική μετανάστευση που συναθροίζουν (*in vivo recruitment*) κύτταρα με αδιαφοροποίητους φαινότυπους (π.χ. *blastemal cells*), ικανά να ανιχνεύουν, ερμηνεύουν και εντέλει να συμπληρώνουν την *ασυνέχεια τοπικής πληροφορίας* που επέφερε μια βίαιη εκκένωση ή μια αντικανονική αναδιάταξη, κυττάρων. Ωστόσο, οι μορφογενετικοί μηχανισμοί που υπεισέρχονται στη χάραξη σχεδίου (*pattern formation*), γενικά περιλαμβάνουν σύνθετες αλληλεπιδράσεις και με άλλες διεργασίες, όπως είναι εκείνες που καθοδηγούν την απομάκρυνση των κυττάρων που παρεμβάλλονται ανάμεσα στις καταβολές των δακτύλων στο αναπτυσσόμενο και / ή αναγεννώμενο *αυτοπόδιο* (*autopodium*) των ανώτερων (αμνιωτών) σπονδυλοζώων, μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-απόπτωσης (*apoptosis*) [Εικ. II.5.35.]. Συνοψίζοντας, η συνολική μορφογενετική διαδικασία προσομοιάζει μεν, αλλά δεν ταυτίζεται με εκείνη της μετεμβρυικής *ιστικής επούλωσης*, η οποία στερείται του μορφογενετικού χαρακτήρα της αποκατάστασης των εμβρυικών τραυμάτων, που ανατάσσονται χωρίς το σχηματισμό ουλής.



**Εικόνα 11.5.36.:** Σχεδιαγραμματική κατανομή της ανατομικής τοπογραφίας των κυτταρικών πληθυσμών που συμβάλλουν στη μορφογένεση του αναγεννητικού βλαστήματος από άκρο ουροδελούς αμφιβίου. Το αναγεννητικό πεδίο αυτοοργανώνεται ανεξάρτητα από την απόσταση της θέσης έκφυσής του στον κορμό του σώματος της προνύμφης, όσον αφορά τα βασικά του στοιχεία (d = δερμίδα-*dermis*, m = μυς-*muscle*, h = βραχιόνιο οστό-humerus, e = επιδερμίδα-*epidermis*, zd = ζώνη αποδιαφοροποίησης-*dedifferentiation zone*, la = επίπεδο ακρωτηριασμού-*amputation level*, b = βλάστημα-*blastema*, we = τραυματικό επιθήλιο-*wound epidermis*, αστερίσκοι = μितώσεις, μαύροι κύκλοι = κύτταρα σε φάση-S του κυτταρικού κύκλου, λευκοί κύκλοι = κύτταρα σε φάση-G1 του κυτταρικού κύκλου (Koussoulakos et al., 1993)

ε] Η πληροφορία θέσης ενδέχεται να έχει τόσο γενικευμένο χαρακτήρα, ώστε οι φυσιολογικοί μηχανισμοί που την εξειδικεύουν (*positional information specification*) σε ένα δεδομένο πεδίο, να επενεργούν παραλλήλως και σε διαφορετικά πεδία μέσα στο ίδιο ανατομικό σύστημα ή ακόμη και σε τελείως διαφορετικά ανατομικά συστήματα (π.χ. που ανήκουν σε διαφορετικές φυλογενετικές βαθμίδες ([Εικ. II.5.32.], [Εικ. II.5.37.], και [Εικ. II.5.33.], [Εικ. II.5.34.], [Εικ. II.5.38.], και [Εικ. II.5.39.], [Εικ. II.5.40.]), με περιορισμένες ή και με αμελητέες παραλλαγές, όπως είναι για παράδειγμα, η συνάφεια της οντογένεσης της καταβολής του άκρου (*limb bud outgrowth*) από τους σωμίτες (*somites*) του παραξονικού μεσοδέρματος (*paraxial mesoderm*), με την οντογένεση των καταβολών του απεκκριτικού συστήματος (*pronephros outgrowth*) από το ενδιάμεσο μεσόδερμα (*intermediate mesoderm*).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ-5<sup>ο</sup>: Θεωρία της πληροφορίας θέσης (ή τοπικής πληροφορίας, *Positional Information*)

### 5.2. Η *in vitro* εκδοχή της πληροφορίας θέσης.

#### 5.2.α. Πληροφορία θέσης και μακροσκοπική εικόνα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου

A] Τα μεσεγχυματικά κύτταρα κατά την πρώιμη φάση της καλλιέργειας του ιστοτεμαχίου (*seeding phase*) προσκολλώνται στο καλλιεργητικό υπόστρωμα πιθανώς χωρίς τη μεσολάβηση εκκρινόμενων μακρομοριακών ουσιών, αλλά μέσω άμεσης επαφής της κυτταρικής επιφάνειας με το καλλιεργητικό υπόστρωμα.



[A]



[B]

**[Εικ. II.5.37.]** Τοπολογία *in vitro* μορφογενετικού πεδίου: η ατρακτοειδής σχηματοποίηση του προσαρμοστικού φαινότυπου συμπορεύεται βαθμιαία και σε συνάρτηση με την πυκνωση της μεσεγχυματικής συνάθροισης (UC-MSA aggregation).

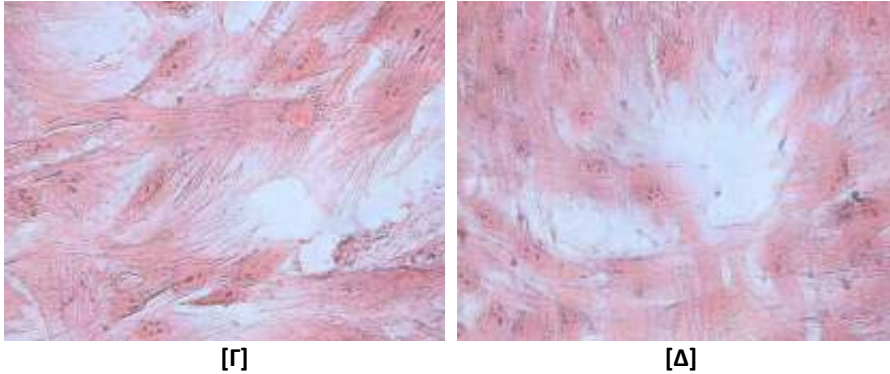
B1] Τα μεσεγχυματικά κύτταρα σε περισσότερο όψιμη (μετέπειτα) φάση της καλλιέργειας του ιστοτεμαχίου (*expanding phase*) διατηρούνται προσκολλημένα στο τρυβλίο καλλιέργειας πιθανώς μέσω παρεμβολής ενός στρώματος μακρομοριακών ουσιών, που εκκρίνονται ως απόρροια μιας αλληλεπίδρασης επιπολασμού με το καλλιεργητικό υπόστρωμα που συνοδεύει όλη την περίοδο ευόδωσης της κυτταρικής συνάθροισης (*MSA aggregation*). Η εναπόθεση αυτής της *in vitro* εξωκυττάριας ύλης (*in vitro ECM*) και ο ποιοτικός και ποσοτικός εμπλουτισμός των συστατικών της, συμπορεύονται παράλληλα με τη διαδοχή των μεταβατικών σταδίων που διέρχεται η μεσεγχυματική συνάθροιση ([Εικ. I.1.4.] και [Εικ. I.1.7.], [Εικ. II.5.33.], [Εικ. II.5.34.]). Η αλληλουχία αυτή συνοψίζεται σε μια βαθμιαία μετάπτωση (*transition*) του *μονήρους* (*solitary*) φαινότυπου στο *συναθροιστικό* (*aggregative*) και μεσολαβείται από τις εναλλαγές μεταξύ των επιμέρους διεργασιών της *επίστρωσης* (*spreading*) και της *μεταναστευτικότητας* (*motility*) των κυττάρων.



[A]

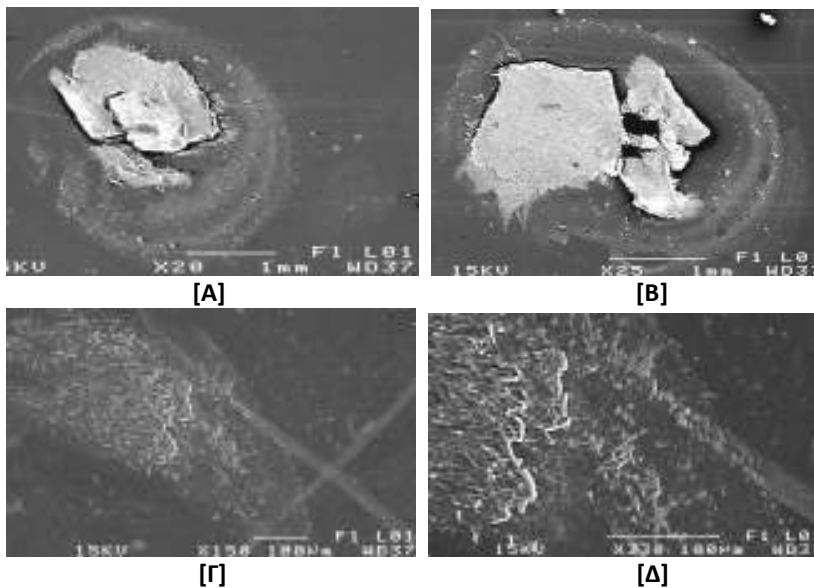


[B]



**[Εικ. II.5.38.]** Τοπολογία *in vitro* μορφογενετικού πεδίου: σε όλα τα στιγμιότυπα απεικονίζονται μεσεγχυματικά κύτταρα από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (UC-MSCs) σε διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν μετά από την απόψυξη κρυοσυντηρημένων δειγμάτων. Η διατήρηση της ατρακτοειδούς μορφολογίας είναι εφάμιλλη εκείνης που παρατηρείται στις πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειές τους. Στα στιγμιότυπα **[Α]** και **[Β]** εφαρμόστηκε χρώση Giemsa (μεγέθυνση 400x), ενώ στα **[Γ]** και **[Δ]** εφαρμόστηκε χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης, η οποία αναδεικνύει την τοπογραφία των κυτταροπλασματικών ινιδίων (μεγέθυνση 600x)

B2] Τα μεσεγχυματικά κύτταρα σε *φάση κορεσμού* (*confluency phase*) έχουν συγκροτήσει μια επίστρωση υπό τη μορφή *μονοκυτταρικού ελάσματος* (*μονοκυτταρικού ταπήτιου ή φύλλου, monolayer*), το οποίο διατηρείται προσκολλημένο στο καλλιεργητικό υπόστρωμα μέσω των παρεμβαλλόμενων μακρομοριακών ουσιών, για όσο χρονικό διάστημα επιβιώνει η καλλιέργεια.



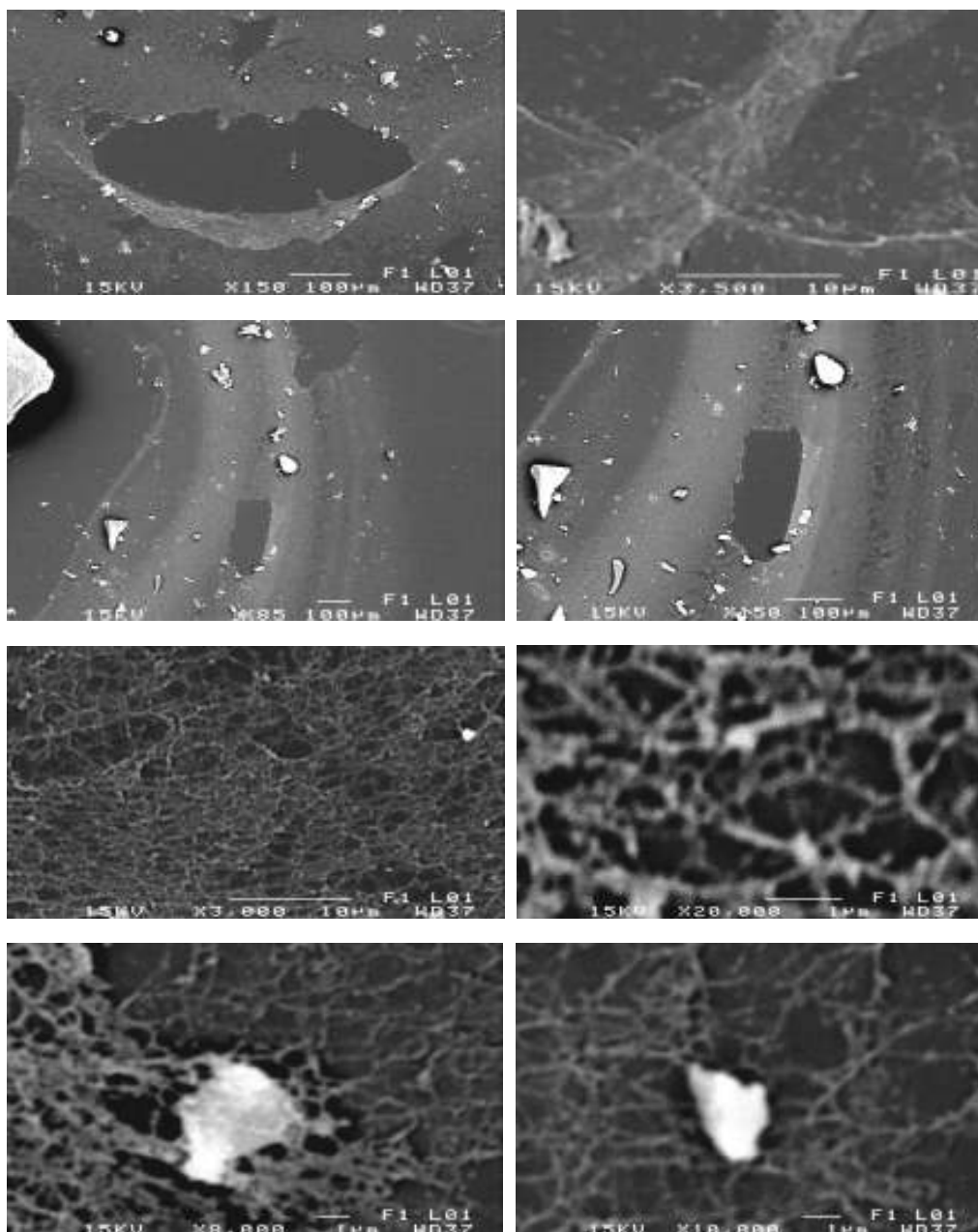
**Εικόνα II.5.39.:** Λεπτομέρειες ηλεκτρονιογραφιών σάρωσης που πραγματοποιήθηκαν σε ιστοκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (UC-MSCs).

B3] Η αξιοσημείωτη συνοχή του μονοκυτταρικού ταπήτιου (*monolayer*) που επιστρώθηκε και συνεχίζει να επεκτείνεται κατά τη *φάση κορεσμού* (*confluency phase*), εξασφαλίζεται:

[B3α] είτε μέσω των άφθονων *διακυτταρικών επαφών* (*cell-cell contacts*) που συγκροτούνται κατά τη στενή (ή εγγύτατη) γειτνίαση μεταξύ παρακείμενων κυττάρων στη *φάση κορεσμού*,

[B3β] είτε μέσω της υποκείμενης εξωκυττάριας ύλης (*in vitro ECM*, focal adhesions / integrins).

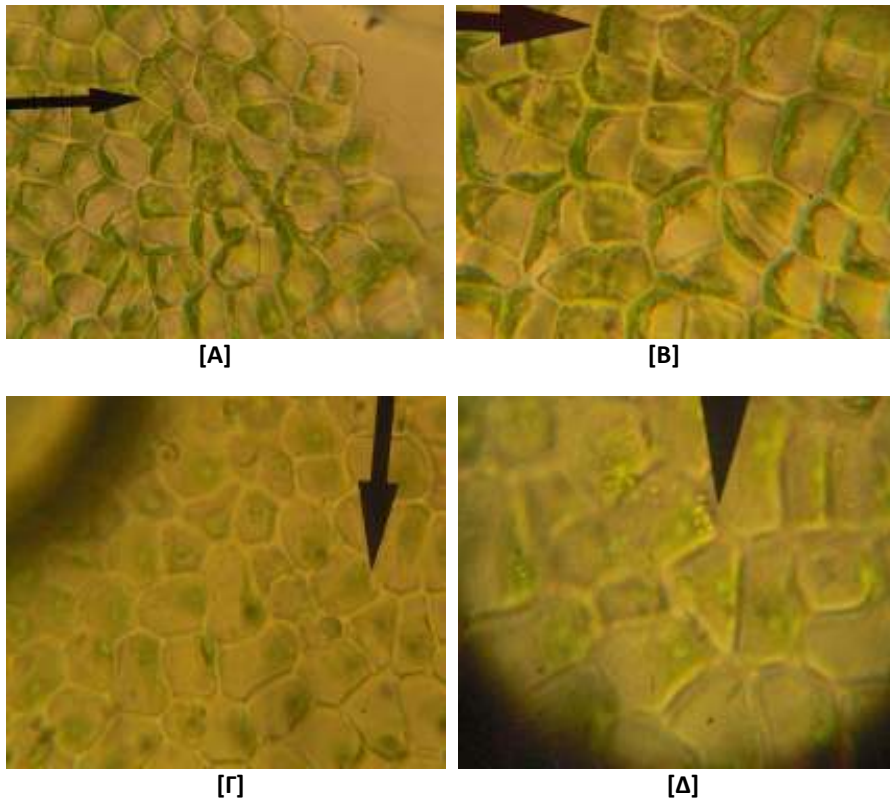
[B3γ] είτε μέσω [B3α] + [B3β].



**Εικόνα II.5.40.:** Λεπτομέρειες ηλεκτρονιογραφιών σάρωσης που αποκαλύπτουν την τριδιάστατη δομή της *in vitro* ECM στις ιστοκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (UC-MSCs).

**5.2.b. Η ECM συμπληρώνει τη μακροσκοπική εικόνα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου, χωρίς να καταργεί το καθεστώς των διακυτταρικών επαφών και κατ'επέκταση δεν αναιρεί την έννοια της πληροφορίας θέσης**

Οι τοπολογικές ιδιότητες που συνοδεύουν την πολυκυτταρική οργάνωση της έμβιας ύλης σε διδιάστατα (*honeycombs*) και / ή τριδιάστατα (*foams*) κυτταρικά («κελλωτά») δίκτυα (*cellular solids*) επικεντρώνονται στη μεταβλητή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*). Η χρηστική αξία της στη στατιστική μελέτη των κελλωτών δικτύων δεν περιορίζεται μόνο σε εκείνα που οργανώνουν οι επιθηλιόμορφοι φαινότυποι [Εικ. II.5.41.], αλλά εφαρμόζεται ακόμη και στις περιπτώσεις συσσώρευσης άφθονης Εξωκυττάριας Θεμέλιας Ουσίας («ΕΘΟ», ECM) ([Εικ. II.2.11.], [Εικ. II.2.12.], [Εικ. II.2.13.] και [Εικ. II.2.14.B.]). Η μόνη προϋπόθεση που απαιτείται για να μην καταλύεται η τοπολογική έννοια της *γειννίας* (*neighborhood*), είναι να διέπεται από ένα καθεστώς συνέχειας, η μεσοκυττάρια φάση που παρεμβάλλεται μεταξύ των κυτταρικών (ή κελλωτών) υπομονάδων (μοναδιαίων κελλιών).

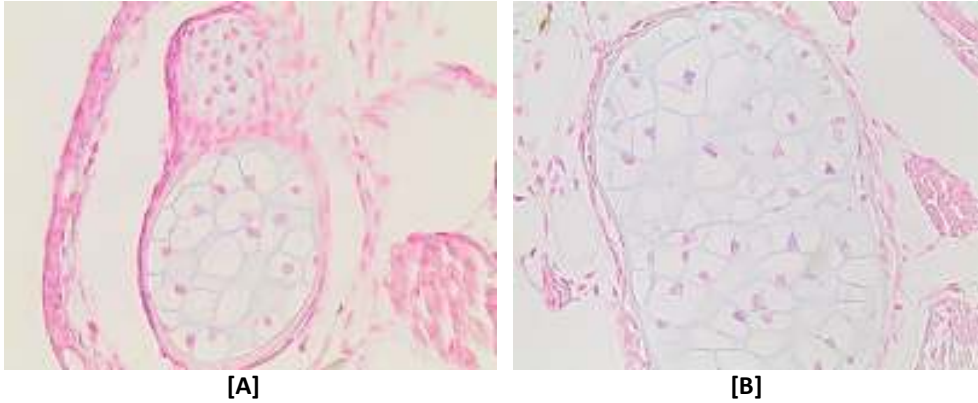


**Εικόνα II.5.41.:** Τοπολογία φυτικού μορφογενετικού πεδίου: Στα στιγμιότυπα [B], [Γ], [Δ] επισημαίνεται το τριγωνικό περίγραμμα ενός μεμονωμένου κυττάρου που προβάλλει στην επιφάνεια της φυτικής επιδερμίδας, για σύγκριση με τα περιγράμματα των ζωικών κυττάρων στις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) ([Εικ. II.5.33.], [Εικ. II.5.34.]) επειδή υπαινίσσεται τα παρόμοια αποτελέσματα της πολυγωνικής μορφογένεσης που υπεισέρχεται και στα φυτικά και στα ζωικά μορφογενετικά πεδία.

Τέτοιες περιπτώσεις είναι εκείνες που αντιπροσωπεύονται:

α) στην περίπτωση του διαφοροποιημένου χόνδρινου ιστού στο στάδιο οργάνωσης των *ισογενικών ομάδων (isogenic groups)*. Σε αντιπαραβολή προς την άμβλυση του συνωστισμού των ώριμων χονδροκυττάρων την οποία επιβάλλει η αισθητή παρουσία της ECM στη διαφοροποιημένη κατάσταση, στις καταβολές των άκρων (*limb buds*) των προνυμφών αμφιβίων, τα προ-χονδρικά κύτταρα διατάσσονται σε εγγύτατη γειτνίαση και οι πλασματικές μεμβράνες τους εφάπτονται παράγοντας μια διευθέτηση, περισσότερο εύτακτη από το μοτίβο διασποράς των διαφοροποιημένων χονδροκυττάρων. Η γνήσια τοπολογική οργάνωση των προχονδρικών κυττάρων (*prechondrocytic cells*) στο οντογενετικό στάδιο της *μεσεγχυματικής συμπύκνωσης (mesenchymal condensations)*, επιτρέπει να αντιπαρέλθουμε τη δυσχέρεια θεώρησής της ως «τυπικό κελλωτό δίκτυο», επειδή στις διακυτταρικές επαφές παρεμβάλλεται αμελητέα ποσότητα ECM. Καθώς αντιπροσωπεύει το πρωιμότερο από όλα τα στάδια της ακολουθίας διαφοροποίησης του χονδροκυττάρου, οι επικείμενοι φυσιολογικοί μετασχηματισμοί τους οποίους πρόκειται να διέλθει το αρχικό μοτίβο των διακυτταρικών επαφών καθόλη τη διάρκεια της μετέπειτα κυτταρικής υπερτροφίας και της παράλληλης συσσώρευσης ECM, δεν απεμπολούν εντελώς τον τοπολογικό χαρακτήρα του αρχικού (ή «πρωτογενούς») «κελλωτού δικτύου».





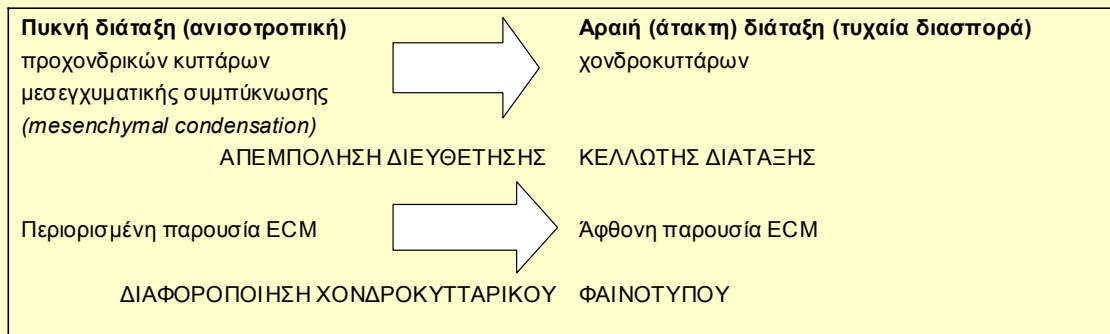
**Εικόνα II.5.42.:** Τοπολογία ζωικού μορφογενετικού πεδίου: εγκάρσιες διατομές από αναγεννητικό βλάστημα άκρου άνουρου αμφιβίου, κατά μήκος του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας της ανατομικής δομής. **[A]** Η γεωμετρική απόσταση μεταξύ του δεδομένου επιπέδου της διατομής και του επιπέδου της θέσης έκφυσης του βλαστήματος στον κορμό του σώματος της προνύμφης, είναι μικρότερη συγκριτικά προς την «ομόλογη απόσταση» που αντιστοιχεί για το επίπεδο διατομής που απεικονίζεται στο **[B]**. Και τα δυο αυτά ξεχωριστά επίπεδα διατομής αντιστοιχούν σε μια ανατομική θέση, απώτερου (*distal*) εντοπισμού (απώτερων ανατομικών συντεταγμένων, *distal positional information specification*), συγκριτικά προς προηγούμενες εικόνες (**[Εικ. II.5.33.]**, **[Εικ. II.5.34.]**). Η πολυγωνική σχηματοποίηση των προχονδρικών κυττάρων για τις δυο ξεχωριστές μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) είναι σαφώς περισσότερο ευδιάκριτη, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη, σχεδόν μη γεωμετρική μορφολογία προηγούμενων εικόνων (**[Εικ. II.5.33.]**, **[Εικ. II.5.34.]**). Ο βαθμός καθορισμού των κυττάρων αντιστοιχεί ακόμη σε πρωιμότερα οντογενετικά στάδια.

Η σταδιακή άμβλυνση που επιφέρουν οι επακόλουθοι μετασχηματισμοί στο αρχικό καθεστώς της τοπολογικής σύνδεσης, καταργούν τις διακυτταρικές επαφές χωρίς όμως και να εξαλείφουν την καθοδηγητική συμβολή τους στην εναπόθεση της ECM, με συνέπεια στα μεταγενέστερα μοτίβα διευθέτησης των ώριμων χονδροκυττάρων να διατηρείται αποτυπωμένος ο αντίκτυπος των ορόσημων γεγονότων της μορφογένεσης του άκρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επιμήκης κατάτμηση της ενιαίας μεσεγχυματικής συμπύκνωσης του κάθε δακτύλου στις διακριτές μάζες που προορίζονται να διαμορφώσουν τις επιμέρους φάλλαγγες του και η οριοθέτηση των αρθρικών επιφανειών τους (*interdigital joints*).



**Εικόνα II.5.43.:** Τοπολογία ζωικού μορφογενετικού πεδίου: στιγμιότυπα από οψιμότερα στάδια του καθορισμού των μεσεγχυματικών κυττάρων, όταν οι μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) δακτύλων (*digits*) από άκρο προνύμφης άνουρου αμφιβίου (*Rana temporaria*), προτυπώνουν τις ανατομικές θέσεις όπου επίκειται ο σχηματισμός των μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων (*interdigital joints*).

β] στην περίπτωση των διδιάστατων καλλιιεργειών μεσεγχυματικών κυττάρων. Κατά την *in vitro* επέκταση (*population expansion*) του μεσεγχυματικού πληθυσμού η διαδοχή των μετασχηματισμών του αρχικού μοτίβου των διακυτταρικών επαφών, πορεύεται αντίρροπα όσον αφορά τον καθοδηγητικό ρόλο τους στην επίστρωση της *in vitro* ECM και στη συνάθροιση των μεσεγχυματικών κυττάρων. Η γενική αυτή διαπίστωση διατυπώνεται συνοπτικά στο ακόλουθο διάγραμμα που συνοψίζει τη ροή της τοπικής πληροφορίας συναρτήσει των μετασχηματισμών της κυτταρικής συνάθροισης (*cell aggregation pattern plasticity*):

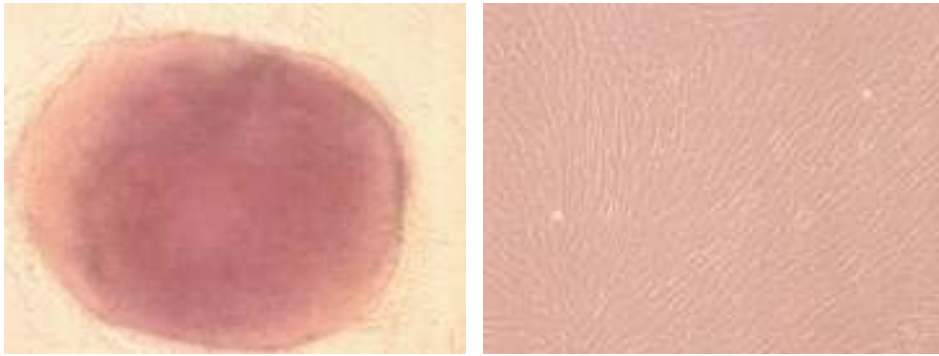
***in vivo* ροή τοπικής πληροφορίας*****in vitro* ροή τοπικής πληροφορίας**

**Πίνακας II.5.1.:** Ο μορφογενετικός αντίκτυπος της ECM στην *in vivo* συνάθροιση βλαστηματικών κυττάρων (*blastemal cells accumulation*) των μεσεγχυματικών συμπυκνώσεων (*mesenchymal condensations*), καθώς και της *in vitro* ECM στις μεσεγχυματικές συναθροίσεις (*MSC aggregates*) των ιστοκαλλιιεργειών.

**5.3. Το πεδίο βαρύτητας διαμορφώνει στις διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες μια *in vitro* εκδοχή τοπικής πληροφορίας, με τη μορφή μιας αλληλουχίας από διακεκριμένα στάδια προσαρμογής του μεσεγχυματικού φαινότυπου.**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκτίθενται στο *μηχανοαισθητικό stress* που ασκεί στον κυτταροσκελετό τους το βαρυτικό πεδίο της διδιάστατης καλλιέργειας με έναν τρόπο (*mechanotransduction*), σαφώς διαφορετικό από εκείνον που σχετίζεται με τον *in vivo* ανατομικό εντοπισμό τους στον πολυκύτταρο οργανισμό. Η μορφογενετική δυναμική που αντιτάσσουν έναντι αυτής της κατακόρυφης συνιστώσας του *in vitro* πεδίου τάσεων, ενέχει ιδιαίτερα τοπολογικά χαρακτηριστικά που τη διαφοροποιούν από ανάλογες προσαρμοστικές αποκρίσεις στις οριζόντιες (ομοεπίπεδες, *planar*) συνιστώσες άλλων *in vitro* πεδίων τάσεων, όπως για παράδειγμα έναντι του ομοεπίπεδα πολωμένου πεδίου τάσεων (*planar polarity gradient field*) που σχετίζεται με τη διαβαθμισμένη τοπογραφική κατανομή κάποιου χημειοτακτικού παράγοντα με τη μορφή μη διαλυτού υποστρώματος, π.χ. *poly-L-lysine coated substrates*). Έτσι, δεδομένου ότι το βαρυτικό πεδίο στο *in vitro* περιβάλλον προμηθεύει όλα ανεξαιρέτως τα κύτταρα της μεσεγχυματικής συνάθροισης (*MSC aggregation*) με την ίδια εκδοχή και με ισόποση τιμή τοπικής πληροφορίας (*mode / value of positional information*), μια ενδεχόμενη διαφορική προσαρμοστική απόκριση έναντι του *in vitro* πεδίου κατακόρυφων τάσεων (όπως για παράδειγμα ένα καθεστώς διαφορικής προσκόλλησης στο υπόστρωμα) θα απέφερε πολύτιμη πληροφόρηση για τον πιθανό μορφογενετικό ρόλο του βαρυτικού ανύσματος στην κυτταρική σχηματοποίηση (*cell shape plasticity*), στη μεταναστευτικότητα (*motility*), ή στη συναθροιστικότητα (*ranking, aggregation*). Όντως παρατηρείται μια τέτοια διαφορική μορφογενετική προσαρμογή, η οποία αποτυπώνεται στερεότυπα στην ποικιλότητα του *μοτίβου-συνάθροισης* (*MSC aggregation pattern*) των

διδιάστατων ιστοκαλλιιεργειών που προσεγγίζουν φάση πληθυσμιακού κορεσμού (*confluency phase*). Σε τέτοιες συνθήκες πληθυσμιακής πυκνότητας, τα MSCs που συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται σε θέσεις εγγύτατης (*proximal*) γειτνίασης με το ιστοτεμάχιο, διευθετούνται όλα σε στοίχους που συγκλίνουν κεντρομόλα προς το ιστοτεμάχιο και καταλήγουν σταδιακά να περιβάλλουν πλήρως όλη την περίμετρό του. Η χαρακτηριστική αυτή εικόνα στο ανάστροφο μικροσκόπιο με τη μορφή μιας «περικυκλωτικής MSC συστοιχίας», αντιπαραβάλλεται ευδιάκριτα με την λιγότερο κανονική (μη κυκλωτερή) διευθέτηση των περισσότερο απομακρυσμένων (*distal*) MSCs, τα οποία παρατάσσονται σε στοίχους με τυχαίο προσανατολισμό και σε κυμαινόμενη απόσταση, ως προς τη σταθερή θέση που κατέχει το ιστοτεμάχιο στο δοχείο καλλιέργειας.



**Εικόνα II.5.44.:** Τα μεσεγχυματικά κύτταρα καλλιιεργειών σε φάση κορεσμού (*confluency phase*), εγκολπώνουν κυκλωτερώς (*convolution*) όλη την περιφέρεια του ιστοτεμαχίου από το οποίο προέρχονται, υπο τη μορφή κολεού (ή στεφάνης, *convolutive zone*) που συγκροτείται από ένα πλήθος ατρακτόμορφων (*spindle shape*) κυττάρων παραταγμένων σε μια πλήρη (ή κλειστή) περιμετρική ακολουθία που προσφύεται όχι μόνο στο καλλιιεργητικό υπόστρωμα, αλλά επιπρόσθετα και στις παρυφές -τουλάχιστον- του ιστοτεμαχίου, σχηματίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο λίγους επάλληλους και ομόκεντρους στοίχους, ή ακόμη και μόνο έναν δακτυλιοειδή στοίχο.

Αυτό το ετερογενές *μοτίβο-συνάθροισης* (*aggregation pattern*) αντιπροσωπεύει μια τοπική και χρονική προσαρμοστική εξειδίκευση της ίδιας *in vitro* τοπικής πληροφορίας, στην οποία μολονότι εκτίθενται ισότιμα όλα τα κύτταρα, μόνο το πληθυσμιακό κλάσμα με την ειδικό τοπογραφικό εντοπισμό (της ελάχιστης απόστασης ή ισοδύναμα, της εγγύτατης γειτνίασης, *proximal neighborhood*) ως προς τη θέση του ιστοτεμαχίου, υιοθετεί την προσαρμοστική μορφολογία της *ομοεπίπεδης εγκόλπωσης* (*planar convolution*). Αυτή η εκλεκτική συστοίχιση (*ranking*), καθώς και η συνοδός σχηματοποίηση (*spindle shape plasticity*) συνοψίζουν την «τερματική» μορφολογία του συναθροιστικού φαινότυπου (*aggregative phenotype*), για την ερμηνεία της οποίας προτείνεται ότι τα MSCs εγγύτερης γειτνίασης (*proximal MSCs*) εξειδικεύουν την ίδια (κοινή) *in vitro* πληροφορία θέσης διαφορετικά (*differential specification*) από ό,τι τα υπόλοιπα MSCs, απώτερης γειτνίασης (*distal MSCs*), επειδή εμπλουτίζουν το συναθροιστικό φαινότυπο με «διανυσματικά δεδομένα» (*“vectorial data”*) τα οποία αφομοιώνονται στις μορφογενετικές ιδιότητες της «καθοδηγούμενης μίτωσης» (*oriented mitosis, oriented cytokinesis*).

Οι κυτταροδιαιρέσεις που συνεισφέρουν στην ειδική αυτή τοπική *χάραξη σχεδίου* (*in vitro pattern formation*), που υιοθετεί την προσαρμοστική εκδοχή της «περικυκλωτικής MSC συστοιχίας» (ή *ομοεπίπεδης εγκόλπωσης, planar convolution*), χαρακτηρίζονται ως «καθοδηγούμενες», στο βαθμό που η μοριακή σηματοδότηση (*mechanotransduction*) που διαθέτουν ή που επιστρατεύουν για την επίπεδη ταξίθευση (ή προσανατολισμό) της μιτωτικής ατράκτου εξαρτάται από την προσκόλληση στο καλλιιεργητικό υπόστρωμα (*adhesion, spreading*). Στη διεθνή βιβλιογραφία ο ειδικός τύπος κυτταροδιαίρεσης που σχετίζεται με προσκολλητικούς φαινότυπους (*adhesive phenotypes*), των οποίων ο πολλαπλασιασμός εξαρτάται συστηματικά από την πρόσφυση στο υπόστρωμα αναγνωρίζεται ως κυτοκίνηση-B (*cytokinesis-B*) (Uyeda T.Q.P. et al., 2004).



**5.3.α. Η συμβολή της *in vitro* πληροφορίας θέσης με τη μορφή της τοπογραφικής ετερογένειας, στην αναγνώριση των διακριτών σταδίων προσαρμογής του μεσεγχυματικού φαινότυπου.**

Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό του μεσεγχυματικού φαινότυπου σε βέλτιστες καλλιεργητικές συνθήκες, μεταβάλλεται σύμφωνα με την καμπύλη Hayflick [Εικ. 1.9.]. Το μεσεγχυματικό κύτταρο (όπως και άλλα ινοβλαστοειδή κύτταρα) κατά τη μεταφορά (εμβολιασμό, *seeding*) και πληθυσμιακή επέκτασή του (*expansion*), στις *in vitro* συνθήκες μιας τυπικής διδιάστατης κυτταροκαλλιέργειας (ή ιστοκαλλιέργειας), διανύει μια διαδοχή (ή εναλλαγή) μεταβατικών σταδίων πριν υιοθετήσει τον προσαρμοστικό φαινότυπο που σταθεροποιεί (ή οριστικοποιεί) το ατρακτοειδές σχήμα που αναγνωρίζεται τυπικά στις κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες, ως «τερματική μορφολογία» (ή «μορφολογία κορεσμού»). Η διαδοχή αυτή συνοψίζει μια στερεότυπη ακολουθία *στρατολόγησης* (*recruitment*), *κλιμάκωσης* (*expansion*) και *εναλλαγής* (*transition*), μεταξύ ορισμένων κυτταροβιολογικών διεργασιών, τούτέστιν της προσκόλλησης (*adhesion*), της μετανάστευσης (*motility*) και της συνάθροισης (ή *συναθροιστικότητας*, *ranking*, *aggregation*), οι οποίες συναρτηθεί του χρόνου οριοθετούν τις επιμέρους φάσεις προσαρμογής (*adaptations*) που μεσολαβούν κατά τη μετάπτωση (*transformation*) του *μονήρους* (*solitary*) φαινότυπου στο *συναθροιστικό* (*aggregative*), σε τρία ορόσημα στάδια:

1α] στο προσκολλητικό στάδιο (ή εκδοχή) του μονήρους φαινότυπου (*adhesive / spreading stage of solitary phenotype*) και αναφέρεται στη λανθάνουσα φάση της καμπύλης Hayflick,

1β] στο μεταναστευτικό στάδιο (ή εκδοχή) του μονήρους φαινότυπου (*motile stage of solitary phenotype*) και αναφέρεται στην αφετηρία («πρώτη καμπή») της καμπύλης Hayflick, που σηματοδοτεί την έναρξη της εκθετικής φάσης και

2] στο στάδιο συστοίχισης του συναθροιστικού φαινότυπου (*ranking stage of aggregative phenotype*) και αναφέρεται στην κυρίως εκθετική φάση, καθώς και στο πλατώ της καμπύλης Hayflick.

**5.3.β. Ο ημιποσοτικός χαρακτηρισμός των ορόσημων σταδίων προσαρμογής του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου**

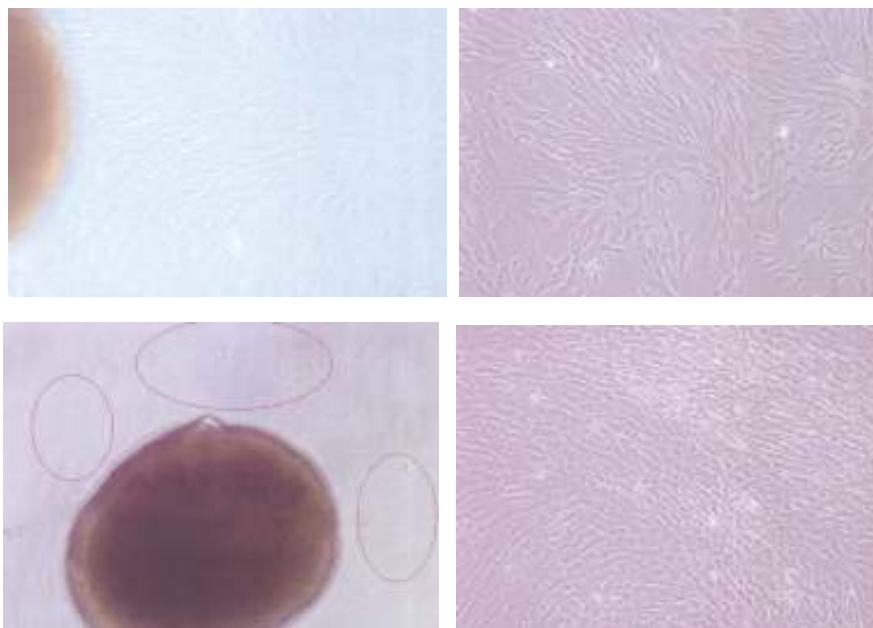
Οι διακυμάνσεις της έντασης με την οποία εκδηλώνεται καθένα από τα επιμέρους αυτά στάδια προσαρμογής για δεδομένη κυτταροκαλλιέργεια, είναι σαφώς αλληλένδετες με τις αντίστοιχες τιμές που επιδεικνύει κάθε ένα από τα υπόλοιπα της ακολουθίας, σύμφωνα με μια αδρή σχέση αναλογίας που αποτελεί συνάρτηση της «ηλικίας» («ηλικιακού σταδίου») της καλλιέργειας, δηλαδή:

1] η ένταση με την οποία εκδηλώνεται το προσκολλητικό στάδιο είναι συνάρτηση της αντίστοιχης έντασης που επιδεικνύει το μεταναστευτικό, μέσω μιας σχέσης αντίστροφης αναλογίας, κατά τη διάρκεια της πρώιμης, καθώς και της όψιμης φάσης της καλλιέργειας,

2] η ένταση με την οποία εκδηλώνεται το μεταναστευτικό στάδιο είναι συνάρτηση της αντίστοιχης έντασης που επιδεικνύει το συναθροιστικό, μέσω μιας σχέσης απλής αναλογίας, κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της καλλιέργειας,

3Α] η ένταση με την οποία εκδηλώνεται το μεταναστευτικό στάδιο είναι συνάρτηση της αντίστοιχης έντασης που επιδεικνύει το συναθροιστικό στάδιο, μέσω μιας σχέσης αντίστροφης αναλογίας, κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης της καλλιέργειας,

3Β] η ένταση με την οποία εκδηλώνεται το προσκολλητικό στάδιο είναι συνάρτηση της αντίστοιχης έντασης που επιδεικνύει το συναθροιστικό, μέσω μιας σχέσης απλής αναλογίας, κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης της καλλιέργειας.



**Εικόνα 11.5.45.:** Το μοτίβο της διαφορετικής συνάθροισης διατηρείται και συνεχίζει να ευοδώνεται προς την κυτταροβριθή επικάλυψη της εκκενωμένης θέσης, ακόμη και μετά την απομάκρυνση του ιστοτεμαχίου από το δοχείο, υπό την προϋπόθεση να έχει προηγουμένως περικυκλωθεί η θέση προσκόλλησής του, από τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων.

#### **5.4. Η διδιάστατη πόλωση (*planar polarity*) του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου συντίθεται από δυο συνιστώσες.**

Η μορφογένεση της κυτταρικής επιφάνειας δεν καθοδηγείται μόνο από ενδογενείς (π.χ. γενετικές) διεργασίες κατευθυνόμενες αποκλειστικά από το ίδιο το σχηματοποιούμενο κύτταρο. Σε μεγάλο βαθμό αποτελεί ετεροκαθοριζόμενη διαδικασία που εξαρτάται από τις διαφορετικές εκδοχές προσκόλλησης (*“adhesion modes”*) στα κυτταρικά και μη, υποστρώματα, που ποικίλλουν όχι μόνο στα *in vivo* πολυκυτταρικά περιβάλλοντα, αλλά και στο *in vitro* περιβάλλον των διδιάστατων και τριδιάστατων ιστοκαλλιέργειών. Κατ’επέκταση η αρχική *in vitro* προσαρμοστική δυναμική του μεσεγχυματικού φαινότυπου, στο βαθμό που συνοψίζει τις συστηματικές παρεκκλίσεις του κυτταρικού σχήματος από το σφαιροειδές, αντανακλά την «πλαστικότητα προσκόλλησης» (*“adhesion plasticity”*), η οποία συμπληρώνεται μεταγενέστερα από τη δυνατότητα της διατήρησης και της αναδιαμόρφωσης (*“remodelling”*) του μοτίβου των διακυτταρικών διεπαφών (*“conjugation pattern”*), συναρτήσει της δυναμικής της πρόσφυσης στο υπόστρωμα του τρυβλίου καλλιέργειας. Με άλλα λόγια, το πρότυπο των κυτταρικών συνάψεων δε συνοδεύει απαρέγκλιτα κάθε στιγμιότυπο της επέκτασης του μεγέθους του μεσεγχυματικού πληθυσμού, σε αντίθεση προς τη συστηματική συμβολή της προσκόλλησης στο δοχείο καλλιέργειας. Έτσι, η έκβαση της αλληλεπιδραστικής αυτής συνθήκης δυναμικής ισορροπίας μεταξύ της πρόσφυσης στο υπόστρωμα (*adhesion*) και της διακυτταρικής επαφής (*conjugation*), ενώ αρχικά εξαρτάται από το θερμοδυναμικό καθεστώς των συμμεταβολών όγκου και εμβαδού που υπεισέρχεται στη σχηματοποίηση του μοναδιαίου κελιού, στη συνέχεια μεταπίπτει στην εξάρτηση από τη συνδεσιμότητα των κελωτών υπομονάδων και από τη στατιστική αλληλεπίδραση των σχημάτων τους. Η μετάβαση κατά τη μορφογένεση μιας αβιοτικής κελωτής διάταξης, από τη θερμοδυναμική συνθήκη στην τοπολογική, υπεισέρχεται και στην *in vitro* προσαρμοστική μετάπτωση του μονήρους φαινότυπου, από την κατάσταση της «πλαστικότητας προσκόλλησης» (*“adhesion plasticity”*) που τον χαρακτηρίζει, στην κατάσταση της «πλαστικότητας κυτταρικής διεπαφής» (*“conjugation plasticity”*), η οποία ταυτοποιεί το συναθροιστικό μεσεγχυματικό φαινότυπο (*aggregative phenotype*).

**5.4.1. Η «κατακόρυφη» συνιστώσα αντιστοιχεί στην «κορυφο-βασική μορφολογική πόλωση» (“*apical-basal polarity*”) και η «οριζόντια» συνιστώσα συνοψίζει την «ομοεπίπεδη πόλωση» (“*planar polarity*”) του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου**

Αυτή η ίδια δυναμική υποβόσκει και στην εναλλαγή των προσαρμοστικών μεταβολών της μορφολογίας και στην αλληλουχία των μετασχηματισμών της διευθέτησης, των μεσεγχυματικών κυττάρων. Στις διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες αποτυπώνεται με τη μορφή ποικιλότητας (*polydispersity*, ή *diversity*) στα μοτίβα «προσκόλλησης-επίστρωσης» (“*spreading patterns*”, ή “*adhesion patterns*”) και στα πρότυπα «διεπαφής-συνάθροισης» (“*conjugation patterns*”). Στο *in vitro* περιβάλλον δεσπόζουν δυο βασικές περιοριστικές συνθήκες (“*constraints*”), για την αντιστάθμιση των οποίων ο μεσεγχυματικός φαινότυπος υιοθετεί δυο εναλλακτικές προσαρμοστικές προοπτικές:

- 1] τη διατήρηση του μονήρους φαινότυπου (*solitary phenotype*),
- 2] τη μετάπτωση του μονήρους φαινότυπου στο συναθροιστικό (*aggregative phenotype*).

Η πρώτη προσαρμοστική προοπτική χαρακτηρίζεται από ευνοϊκή αλληλεξάρτηση ως προς:

α] την **απουσία κυτταροβριθούς γειτονιάς**: η έλλειψη επανατροφοδότησης «οριζόντιας πόλωσης» για τη μορφογενετική καθοδήγηση (“*planar polarity feedback input*”) της κυτοκίνησης-B, δρομολογεί την τυχαία διευθέτηση των θυγατρικών κυττάρων κάθε μίτωσης, χωρίς εξάρτηση από προϋπάρχουσες διακυτταρικές συζεύξεις (“*conjugation patterns*”) εξαιτίας της απουσίας διασυνδεδεμένων γειτόνων,

β] την **παρουσία υποκατάστατου ερειστικού υπόβαθρου**: η προσαρμοστική δυναμική της προσκόλλησης (“*adhesion plasticity*”) εξειδικεύεται στη διάπλαση επιφάνειας διεπαφής (*interface*) με το υπόστρωμα του τρυβλίου καλλιέργειας, εξαιτίας της έκθεσης της κυτταρικής επιφάνειας στο κατακόρυφο άνυσμα του βαρυτικού πεδίου. Από τη θεμελιώδη αυτή προσαρμογή απορρέει η «κατακόρυφη πόλωση» (*apical-basal polarity*) του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου, η οποία είναι πιο αρχέγονη και κατά συνέπεια η πρώτη στη χρονική διαδοχή, που υποκαθιστά την *in vivo* τριδιάστατη εκδοχή του ιστικού περιβάλλοντος στο μορφογόνο ρόλο του.

Η δεύτερη προσαρμοστική προοπτική χαρακτηρίζεται από ευνοϊκή αλληλεξάρτηση ως προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια από την επέκταση του μεγέθους του μεσεγχυματικού πληθυσμού (*population expansion*). Η προσαρμοστική αυτή μετάβαση προς το συναθροιστικό φαινότυπο (*aggregative phenotype*), που είναι λιγότερο αρχέγονη και έπεται χρονικά της πρώτης προσαρμογής, εξαρτάται από το μορφογενετικό χαρακτήρα που υιοθετούν σταδιακά οι *in vitro* κυτταροδιαιρέσεις με τη μορφή της κυτοκίνησης-B. Με άλλα λόγια η αγκιστεία των οψιμότερων *in vitro* κυτταροδιαιρέσεων ως προς την *in vivo* μίτωση, κλιμακώνεται (ή ακριβέστερα αποκαθίσταται, “*restoration*”) συναρτήσει της αύξησης της πληθυσμιακής πυκνότητας και κατ’επέκταση συναρτήσει της στατιστικής επικράτησης του καθεστώτος των κυτταρικών διεπαφών (“*conjugation pattern*”) έναντι του μοτίβου προσκόλλησης στο υπόστρωμα (“*spreading pattern*”, ή “*adhesion pattern*”). Η επέκταση του πληθυσμιακού μεγέθους, στο βαθμό που αναπαράγει και σταθεροποιεί το τοπολογικό καθεστώς της συνδεσιμότητας (*connectivity*), επανατροφοδοτεί με «οριζόντια πόλωση» (“*planar polarity feedback input*”) τις *in vitro* κυτταροδιαιρέσεις και τις μετατρέπει σε «καθοδηγούμενες ή διατεταγμένες κυτταροδιαιρέσεις» (*oriented mitoses*).

#### 5.4.2. Η αλληλεξάρτηση μεταξύ της συνολικής μορφολογικής πόλωσης (“*apical-basal polarity*” και “*planar polarity*”) του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου και της κυτοκίνησης-B (“*oriented cytokinesis*”).

Τη μετάπτωση του καλλιεργούμενου μεσεγχυματικού πληθυσμού προς κυτταροβριθέστερες πυκνότητες (“*confluency*”) συνοδεύει η συνάθροιση (*aggregation*) των απομονωμένων κυττάρων, από την ακατάστατη διασπορά στην εύτακτη διευθέτηση. Μια ενδεχόμενη μη τοπολογική συσσώρευση κυττάρων θα κλιμάκωνε το συνωστισμό τους με δυσμενέστερες μορφογενετικές επιπτώσεις, αλλά αντιθέτως η *in vitro* προσαρμοστικότητα των προσκολλητικών ιδιοτήτων τους (*in vitro adhesion plasticity*), πυκνώνει τη γειτνίασή τους κι αυτή με τη σειρά της κλιμακώνει επανατροφοδοτικά τη διαθεσιμότητα των παρακείμενων επιφανειών για διακυτταρική σύζευξη, επειδή ανακατανέμει το εμβαδόν της πλασματικής μεμβράνης που καταμερίζεται στα τρία ξεχωριστά κλάσματα που συνοψίζουν τη συνολική μορφολογική πόλωση του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου:

Α) αυτό που προσκολλάται στο καλλιεργητικό υπόστρωμα και αντιπροσωπεύει την «κατακόρυφη συνιστώσα» της κυτταρικής πρόσφυσης (*cell-substrate adhesion*, *cell-ECM adhesion*) και μεσολαβεί την προσαρμογή του προτύπου οργάνωσης των *εστιακών επαφών* (*focal contacts*, *focal adhesions*) και κατ’επέκταση της προσκόλλησης στο υπόστρωμα (*adhesion pattern plasticity*, *spreading pattern plasticity*),

Β) αυτό που καταλαμβάνεται από εφαπτόμενες γειτονικές επιφάνειες και αντιπροσωπεύει την «οριζόντια συνιστώσα» της κυτταρικής πρόσφυσης (ή διακυτταρικής πρόσφυσης, *cell-cell adhesion*, *cell-cell conjugation*) και μεσολαβεί την προσαρμογή του προτύπου των διακυτταρικών επαφών (*conjugation pattern plasticity*),

Γ) αυτό που παραμένει μη κατειλημμένο (*non adhered and non conjugated*) και συνεπώς, αφενός είναι εκτεθειμένο στο θρεπτικό εναίωρημα και σε διαλυτούς χημειοτακτικούς (μορφογόνους) παράγοντες και αφετέρου είναι διαθέσιμο για την κυτταρική σχηματοποίηση (*cell shape plasticity*), μέσω της οποίας υπεισέρχεται σε μορφογενετικές αλληλεπιδράσεις με τα άλλα κλάσματα του ολικού εμβαδού της κυτταρικής επιφάνειας.

Ο στατιστικός χαρακτήρας των κυτταροβιολογικών διεργασιών (*adhesion*, *motility*, *aggregation*) που διαμεσολαβούν τους γεωμετρικούς μετασχηματισμούς της κυτταρικής επιφάνειας, η πληθυσμιακή δυναμική του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οι μορφογενετικές ιδιότητες των καθοδηγούμενων (ή διατεταγμένων) κυτταροδιαιρέσεων (*oriented mitoses*) που πλαισιώνουν τις προσαρμοστικές αλληλεπιδράσεις του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου με το αβιοτικό του υπόστρωμα στο τρυβλίο ιστοκαλλιέργειας, συμβάλλουν στη διδιάστατη (ή ομοεπίπεδη) πόλωση (*planar polarity*) της μορφολογίας του. Στο βαθμό που κατά την πληθυσμιακή επέκτασή του υπεισέρχεται καθεσώς συνδεσιμότητας (*connectivity*), η μεσεγχυματική συνάθροιση (*MSC aggregate*) υιοθετεί την τοπολογία των αβιοτικών κελωτών δικτύων (*cellular solids*) με συνέπεια ο ανισοτροπισμός που διέπει τη μορφογένεσή της, να συνοψίζει το στατιστικό υπόβαθρο όλων αυτών των ετερόκλητων αβιοτικών και βιοτικών συνιστωσών.

Στην πρώτη φάση της καλλιέργειας, δεσπόζει μια «ισοδύναμη συνθήκη κυτταροπενίας» για τα μεμονωμένα και διάσπαρτα προσκολλημένα κύτταρα, με αποτέλεσμα κατά την «αλληλεπίδραση συνάφειας» (*adhesion interaction*) μεταξύ της κυτταρικής επιφάνειας (*adhesion interfaces*) και του υποστρώματος, να επικρατεί αρχικά η γεωμετρική επίδραση του *in vitro* περιβάλλοντος, με συνέπεια τη μεγιστοποίηση του προσκολλημένου εμβαδού (“*spreading surface*”). Καθώς πληθαίνουν οι μεσεγχυματικοί φαινότυποι που υιοθετούν τις μεταβατικές μορφολογίες της αλληλουχίας προς την «τερματική» ατρακτοειδή σχηματοποίηση, το προγενέστερο γεωμετρικό καθεστώς της «επιεδοπληρωτικής παράταξης» ασύζευκτων κυττάρων εκτοπίζεται από τις μορφογενετικές ανακατατάξεις (μέσω χημειοτακτισμού—“*chemotaxis*” και / ή μέσω απτόταξης—“*haptotaxis*”) που συμπληρώνουν τη σταδιακή εδραίωση μιας «ισοδύναμης συνθήκης κυτταροβρίθειας» κατά τον προοδευτικό κορεσμό της πληθυσμιακής πυκνότητας. Το αρχικό μοτίβο της γεωμετρικής παράταξης κελιών που δε μοιράζονται κοινόχρηστες επιφάνειες (*adhesion pattern*, *spreading pattern*), αντικαθίσταται από το μεταγενέστερο καθεστώς της διακυτταρικής

δικτύωσης, καθώς η σχηματοποίηση του μονήρους φαινότυπου, με τη μηδενική ή ελλιπή συνδεσιμότητα (*connectivity*), τείνει να απεμπολήσει τη φάση απομονωτικής προσκόλλησης στο καλλιεργητικό υπόστρωμα, υποβαθμίζοντας την «κατακόρυφη συνιστώσα» της προσκόλλησης (ή «κυτταρική πρόσφυση»). Παράλληλα με την αποδέσμευση από την εξατομικευμένη σχηματοποίηση τα κύτταρα που συμπλέκουν τις επιφάνειές τους (*conjugation interfaces*) στην κελλωτή ταξιθέτηση, εγκαινιάζουν μια τοπολογική συνθήκη «αλληλεπίδρασης συνοχής» (*conjugation interaction*) μεταξύ παρακείμενων κυτταρικών επιφανειών, εμπλουτίζοντας την «οριζόντια συνιστώσα» της προσκόλλησης (ή «διακυτταρική πρόσφυση»). Υιοθετούν φαινότυπους περισσότερο εύπλαστους και κατά συνέπεια επιδεκτικούς στη συμμόρφωση προς εύτακτες μαζικές αλληλεπιδράσεις με τα παρακείμενα κύτταρα («συστοίχιση», “*ranking*”). Η προσάρτηση περισσότερων επιφανειών στην κελλωτή διευθέτηση ευνοεί την επανατροφοδοτική αφομοίωση τέτοιων προσαρμοστικών (ή πλαστικών) φαινότυπων, μέσω της αναδιάταξης (*remodelling*) των διακυτταρικών επαφών και της επακόλουθης εδραίωσης του καθεστώτος συνδεσιμότητας που αντικατοπτρίζουν. Οι κυτταροβιολογικές αυτές διαδικασίες τελεσφορούν τη στατιστική ανακατανομή του *εμβαδού προσκόλλησης* (*adhesion interfaces, spreading interfaces*) που συμμετέχει στην «κατακόρυφη πρόσφυση» και χαρακτηρίζει τις πολυγωνικές μεταβατικές μορφολογίες του μονήρους φαινότυπου (*solitary phenotype*), σε *εμβαδόν διεπαφών* (*conjugation interfaces*), το οποίο κλιμακώνεται σε συνάρτηση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που αφομοιώνονται στην κελλωτή διάταξη και σε συνάρτηση με την ατρακτόμορφη σχηματοποίηση που οριστικοποιεί το συναθροιστικό φαινότυπο (*aggregative phenotype*). Η σταδιακή υιοθέτηση της «τερματικής» ατρακτοειδούς («ινοβλαστοειδούς»-“*fibroblast-like*”) μορφολογίας περιορίζει βαθμιαία την προσκολλημένη επιφάνεια (“*spreading surface*”) παραχωρώντας συγχρόνως το πλεονάζον εμβαδόν στην τροφοδότηση του ποσοστού επιφάνειας που τελεί ως κοινόχρηστο υπό το καθεστώς της διακυτταρικής σύζευξης. Σε απώτερη κατάληξη, ελαχιστοποιεί την προσκολλημένη επιφάνεια, με μια έννοια ανάλογη της ελαχιστοποίησης του λόγου  $\{ S / V \}$  που εξασφαλίζει η σφαιροποίηση του σχήματος (“*spreading surface minimalization process*”).

#### 5.4.3. Η *in vitro* βιογένεση της «μεσεγχυματικής ακμής»

Το κλάσμα της κυτταρικής επιφάνειας που προσκολλάται στο καλλιεργητικό υπόστρωμα οριοθετεί την «υποκείμενη» (*basal*) κυτταρική επιφάνεια, η οποία εμφανίζεται διακριτή από την υπόλοιπη, δηλαδή την «υπερκείμενη» (*apical*), μέσω μιας γεωμετρικής συνθήκης που είναι εγγενής των διδιάστατων κυτταροκαλλιεργειών: κατά μήκος όλης της περιμέτρου που καταλαμβάνουν οι παρυφές της προσκολλημένης (υποκείμενης) κυτταρικής επιφάνειας, οριοθετείται μια κλειστή συνοριακή γραμμή που διαμερισματοποιεί την συνολική επιφάνεια του κυττάρου σε δυο διακριτές όψεις, οι οποίες συνοψίζουν όλη την παρατηρούμενη πόλωση της μορφολογίας του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου.

Η γεωμετρική αυτή συνθήκη που σχετίζεται με τη βιογένεση της «μεσεγχυματικής ακμής» αντανακλά τη διαφορετική στερεολογία της διδιάστατης κυτταροκαλλιέργειας, σε αντιπαράβολή προς την *in vivo* ανατομική στερεομετρία. Η διάκριση αυτή έχει την έννοια ότι υπάρχουν κυτταροβιολογικές διεργασίες που συμβάλλουν στην όλη *in vitro* προσαρμογή του μεσεγχυματικού φαινότυπου, μέσω ειδικής αλληλεπίδρασης με την κυτταρική σχηματοποίηση (*cell shape plasticity*) και ως εκ τούτου είναι τουλάχιστον υποτυπωδώς μορφογενετικές. Κατ'επέκταση ενδείκνυται η διάκριση σε επιμέρους συνιστώσες και η μελέτη της αλληλεπίδρασης κάθε μιας από αυτές, με τους Καρτεσιανούς άξονες του τριδιάστατου Ευκλείδειου χώρου, κατά αναλογία προς τον αντίστοιχο επιμερισμό των διεργασιών χάραξης σχεδίου (*pattern formation*), οι οποίες εξαρτώνται από τους εμβρυικούς άξονες ασυμμετρίας και αφορούν τα οντογενετικά και τα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία. Κατά συνέπεια η συνολική μορφολογική πόλωση που αποκομίζει το μεσεγχυματικό κύτταρο από την *in vitro* πληθυσμιακή του επέκταση, είναι δυνατό να αναλυθεί σε δυο μορφογενετικές συνιστώσες που αλληλεπιδρούν σχετικώς ανεξάρτητα η μια από την άλλη, με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και είναι:

**A] η κατακόρυφη πόλωση (*apical-basal polarity*):** σε «υπερκείμενη» (κορυφαία, *apical*) και σε «υποκείμενη» όψη της ολικής επιφάνειας (βασική, *basal*) για κάθε μεμονωμένο κύτταρο, καθώς και για το συνολικό μονοκυτταρικό ταπήτιο. Αυτή είναι η κύρια μορφή πόλωσης που συσσωρεύει ο *in vitro* μεσεγχυματικός φαινότυπος και απορρέει από την προσαρμοστική αλληλεπίδρασή του με το κατακόρυφο άνυσμα του βαρυτικού πεδίου. Συνοψίζει τις περισσότερες ομοιότητες με την ανατομική πόλωση των *in vivo* επιθηλίων.

**B] η οριζόντια πόλωση (*planar polarity*):** αυτή είναι η δευτερεύουσα μορφή πόλωσης που συγκεντρώνει ο *in vitro* μεσεγχυματικός φαινότυπος και απορρέει από την προσαρμοστική αλληλεπίδρασή του με τη μη κατακόρυφη συνιστώσα του βαρυτικού πεδίου. Αυτή σχετίζεται με το μονόστοιβο χαρακτήρα του μονοκυτταρικού ταπήτιου, ή με άλλα λόγια με την περιοριστική (απαγορευτική) συνθήκη που δεν ευνοεί την *κατακόρυφη στοίχιση* (ή *επάλληλη επιστοιβάξη*) των μεσεγχυματικών κυττάρων, σε αντιπαράθεση με την *in vivo* τριδιάστατη στερεοδιάταξη των ανατομικών επιθηλίων ή των μεσεγχυματικών ιστών. Κατά συνέπεια η *in vivo* στερεολογία του μεσεγχυματικού ιστού του ομφάλιου λώρου (όπως κι εκείνη των μεσεγχυματικών συμπτκνώσεων στις καταβολές των άκρων προνυμφών αμφιβίων) κατακερματίζεται σε μια συνάθροιση από ομοεπίπεδα κύτταρα που για λόγους κυτταρικής επιβίωσης προσαρμόζουν το καθεστώς των διακυτταρικών επαφών στην τοπολογία που διέπει το Ευκλείδειο επίπεδο. Το τοπολογικό υπόβαθρο των αβιοτικών παραγόντων (π.χ. βαρυτικό πεδίο) με τους οποίους αλληλεπιδρούν οι κυτταροβιολογικοί μηχανισμοί της προσαρμογής αυτής είναι συγκρίσιμο με εκείνο της *in vivo* επιθηλιακής μορφογένεσης.

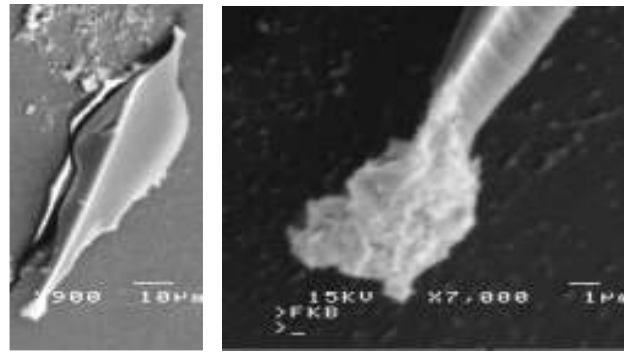
#### 5.4.3.α. Η μορφογενετική εξειδίκευση της «μεσεγχυματικής ακμής»

Οι καθοριστικοί κυτταροβιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαφορική αυτή εξειδίκευση της «μεσεγχυματικής ακμής», όσον αφορά τη χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) στις μεσεγχυματικές συναθροίσεις των διδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών, είναι οι εξής:

[1] η *προσκολλητικότητα* (*adhesiveness*) που εκδηλώνεται ως συνάρτηση της αλληλεπίδρασης με τα γεωμετρικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος του καλλιιεργητικού τρυβλίου. Η *ισχύς πρόσφυσης* (*adhesion*) και η *έκταση επίστρωσης* (*spreading*) στο πλαίσιο μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης, είναι οι καίριες κυτταροβιολογικές μεταβλητές που προσδίδουν στον *in vitro* προσκολλητικό φαινότυπο μια βαθμίδωση (ποσοτικό χαρακτήρα) και τον προβιβάζουν σε παράμετρο της κυτταρικής *σχηματοποίησης* (*cell shape plasticity*),

[2] η *προσαρμοστική μηχανοαισθητική απόκριση* (*mechanosensory adaptation, mechanotransduction*) στη συνιστώσα του βαρυτικού πεδίου. Δεδομένου ότι ο *χημειοτακτισμός* (*chemotaxis*) και η *αφινοφόρηση* (*affinophoresis* ή *haptotaxis*) είναι διεργασίες που συμμετέχουν στην οντογένεση και στην αναγέννηση, αντανakλούν τη μορφογενετική σημασία της επισκόπησης του *in vivo* πεδίου των μηχανικών τάσεων (*tension field*) που πλαισιώνουν το κύτταρο, στο ιστικό του περιβάλλον. Όμως η MSC συνάθροιση (*aggregation*) στην ιστοκαλλιέργεια, συνοψίζει τη συμβολή των «κατάλοιπων (ή υπολειμματικών) μορφογενετικών διεργασιών», στην προσαρμογή του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου, ξεκινώντας από το απροσδιόριστο (τυχαίο ή άμορφο) κυτταρικό σχήμα κατά τη φάση εποίκιςμου (*seeding*) και καταλήγοντας στην «τερματική» ατρακτοειδή μορφολογία («μορφολογία κορεσμού»). Η *μορφομετρική ποικιλότητα* (ή «μορφομετρικός ανισοτροπισμός») της συνάθροισης (*μοτίβο-συνάθροισης, aggregation pattern*) αντιπροσωπεύει ένα εποπτικό αποτύπωμα που παράγεται από την *in vitro* εκδοχή της χάραξης σχεδίου (*pattern formation*). Η μηχανοαισθητική απόκριση υπεισέρχεται και στην *κυτταρική σχηματοποίηση* (*cell shape plasticity*) και στην *κυτταρική μετανάστευση* (ή *μεταναστευτικότητα, motility*).





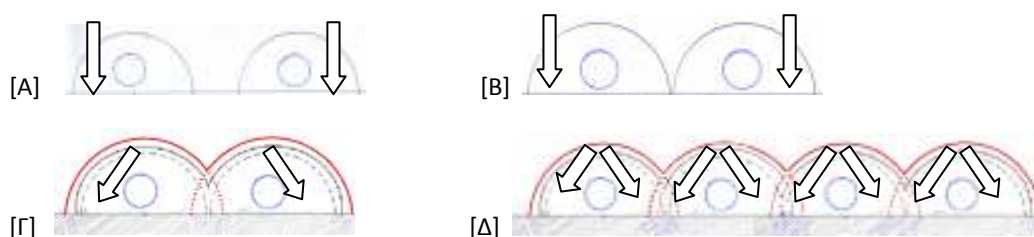
**Εικόνα II.5.46.:** με τον όρο «πλαστικότητα της μεσεγχυματικής ακμής» υποδηλώνεται η δυνατότητα της μετάπτωσής της σε ελασματοπόδιο (*lamellipodium*), το οποίο αντιπροσωπεύει το ισοδύναμο της «κορυφής» για μια πολυγωνική εκδοχή της κυτταρικής μορφολογίας. Η βιογένεση και αντιστρεπτή εναλλαγή μεταξύ «μεσεγχυματικής ακμής» και ελασματοπόδιου αποτελεί βασική συνιστώσα στη διεργασία της κυτταρικής σχηματοποίησης.

#### 5.4.3.b. Ο μορφογενετικός αντίκτυπος της «μεσεγχυματικής ακμής»

Κατά συνέπεια, η γεωμετρική αυτή συνθήκη μορφογένεσης της «μεσεγχυματικής ακμής» συνοψίζει μια ομοιόμορφη -κοινή για όλα τα καλλιεργούμενα κύτταρα- προσαρμοστική εξειδίκευση έναντι της *in vitro* τοπογραφικής πληροφορίας και εικάζεται ότι είναι εξαρτημένη από την εγγενή ικανότητα του κυτταροσκελετού για επισκόπηση (ή αισθητοποίηση) του πεδίου βαρύτητας, καθώς επίσης και από τη δυνατότητα επανατροφοδότησης (*feedback*) αυτής της πληροφόρησης στην προσκολλητική δυναμική (*adhesiveness*) της κυτταρικής επιφάνειας, ανεξάρτητα αν το υπόστρωμά της αντιπροσωπεύει το *in vivo* ανατομικό περιβάλλον ή τις *in vitro* συνθήκες της ιστοκαλλιέργειας. Ο αντίκτυπος της αφομοίωσης αυτής στη διατήρηση ή μεταβολή του πολωμένου *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου, εξαρτάται επίσης από τη μεταναστευτικότητα (*motility*) και τη συναθροιστικότητα (*ranking, aggregation*). Η μορφογενετική δυναμική με την οποία εφοδιάζονται βαθμιαία οι κυτταρικές παρυφές-περιγράμματα σε συνάρτηση με την ευόδωση της πληθυσμιακής επέκτασης, αποκαλύπτεται στη διαδοχή (ή εναλλαγή) των *in vitro* ορόσημων σταδίων προσαρμογής:

α) η υιοθέτηση περισσότερο «προσκολλητικού χαρακτήρα (ή ταυτότητας)» (*“adhesive subphenotype”, “spreading subphenotype”*) για το μονήρη φαινότυπο (*solitary phenotype*), κατά την εκθετική φάση της πληθυσμιακής επέκτασης (της καμπύλης *Hayflick*), αλληλεπιδρά προκαθορισμένα με τους άλλους (εναλλακτικούς) χαρακτήρες, καταστέλλοντας συγχρόνως τη μεταναστευτικότητα και ευνοώντας παράλληλα τις μορφογενετικές διεργασίες για κατάλληλη κυτταρική σχηματοποίηση (περιορισμό της απόκλισης από την ατρακτοειδή μορφολογία) που θα δρομολογήσει την επικείμενη μετάπτωση στο συναθροιστικό φαινότυπο (*aggregative / ranking phenotype*). Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της κυτοκίνησης-B με το καθεστώς εγγύτατης γειτνίασης των συσσωρευμένων κυττάρων (*conjugation pattern*), θα ευνοήσει την ατρακτόμορφη σχηματοποίηση υπό την προοπτική της εκπλήρωσης της τοπολογικής συνθήκης που αντιστοιχεί στον κορεσμένη πληθυσμιακή πυκνότητα. Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση της κυτοκίνησης-B με ένα καθεστώς σποραδικής ή ελλιπούς γειτνίασης μιας ολιγομελούς ομάδας κυττάρων, ή με ένα τοπικό καθεστώς «μηδενικής γειτνίασης» μεταξύ τυχαία διεσπαρμένων κυττάρων, θα ευνοήσει τον προσαρμοστικό περιορισμό της προσκολλητικότητας (*adhesiveness*) του μονήρους φαινότυπου και την παράλληλη κλιμάκωση της μεταναστευτικότητας, με την προοπτική εκπλήρωσης της τοπολογικής συνθήκης που αντιστοιχεί σε μη κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες. Κατά συνέπεια είναι τουλάχιστον επισφαλής μια θεώρηση της *in vitro* μεταναστευτικότητας με την εκδοχή της άσκοπης κύλισης (ή της ολίσθησης, *“rolling”*) μιας άκαμπτης κυτταρικής μάζας, χωρίς εξάρτηση από την *in vitro* κυτταρική σχηματοποίηση (*cell shape plasticity*).

β) η εναλλακτική υιοθέτηση «περισσότερο προσκολλητικού χαρακτήρα (ή ταυτότητας)» (“*adhesive subphenotype*”, “*spreading subphenotype*”) για το μονήρη φαινότυπο (*solitary phenotype*), κατά τη λανθάνουσα φάση της πληθυσμιακής επέκτασης (της καμπύλης *Hayflick*), θα αποτύχει να δρομολογήσει τη συνάθροιση που εξαρτάται από το συνοδό περιορισμό της μεταναστευτικότητας, εξαιτίας της ακατάλληλης κυτταρικής σχηματοποίησης (εκτροπής από τη δρομολόγηση ατρακτοειδούς μορφολογίας). Σε μια συλλογή (*ensemble*) τυχαία διεσπαρμένων μεσεγχυματικών κυττάρων, όπου απουσιάζουν εστίες κυτταρικής σύζευξης (*cell-cell conjugation*), η αλληλεπίδραση της κυτοκίνησης-B με το καθεστώς «μηδενικής γειτνίασης» μεταξύ των απομονωμένων κυττάρων, δε θα ευνοήσει τον προσαρμοστικό περιορισμό της προσκολλητικότητας (*adhesiveness*) του μονήρους φαινότυπου και την παράλληλη κλιμάκωση της μεταναστευτικότητας (*motility*), με συνέπεια την αστοχία εκπλήρωσης της τοπολογικής συνθήκης που αντιστοιχεί σε μη κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες.

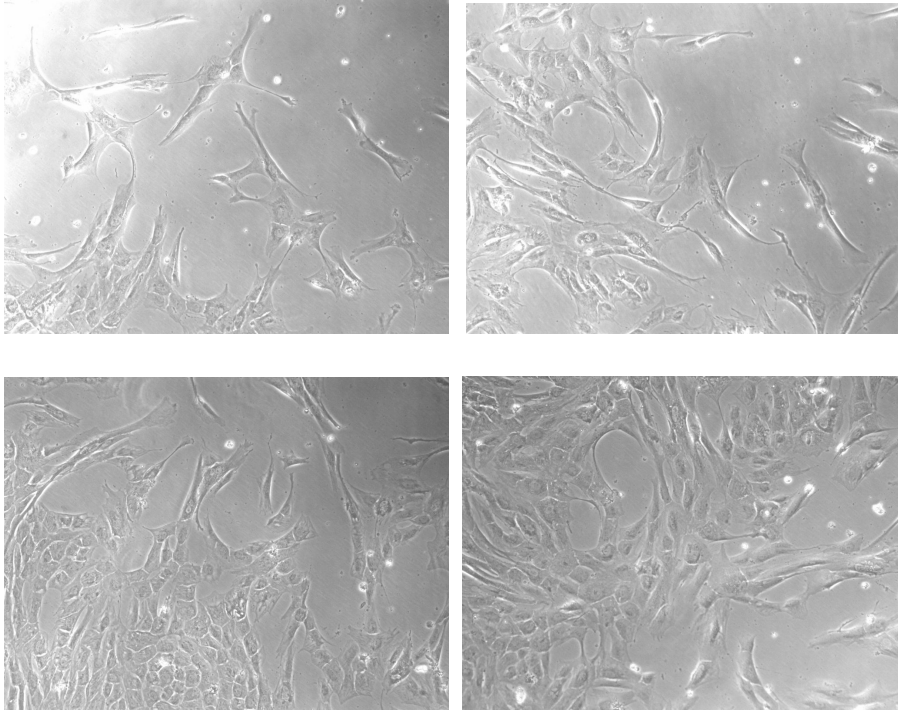


**Εικόνα II.5.47.:** Τα σχεδιαγράμματα αναπαριστούν εγκάρσιες διατομές από ατρακτόμορφα μεσεγχυματικά κύτταρα παραταγμένα σε παράλληλους στοίχους. Οι εσωτερικοί κύκλοι αντιστοιχούν στους κυτταρικούς πυρήνες. Καθένα από τα βέλη αναπαριστά τη συνισταμένη ροπή που αναπτύσσει κάθε κύτταρο για προσκόλληση στο υπόστρωμα του τρυβλίου καλλιέργειας. Στα στιγμιότυπα [Α] και [Β] δεν ορίζεται οριζόντια συνιστώσα για τη στατική του προσκολλημένων κυττάρων, επειδή είναι απομονωμένα. Αντιθέτως, στα στιγμιότυπα [Γ] και [Δ] υπεισέρχονται οριζόντιες συνιστώσες, επειδή οι επαπτόμενες επιφάνειες των παρακείμενων κυττάρων διαμορφώνουν μια «συνθήκη αντιστήριξης» η οποία αλληλεπιδρά με το ομογενές πεδίο των κατακόρυφων ανυσμάτων της βαρύτητας. Η διδιάστατη πόλωση (*planar polarity*) της μορφολογίας του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου, αντικατοπτρίζει το μορφογενετικό αντίκτυπο της αλληλεπίδρασης μεταξύ της «συνθήκης αντιστήριξης» και της κυτοκίνησης-B.

Συνοψίζοντας, η συμμεταβολή αυτή της κυτταρικής μορφολογίας παράλληλα (ή αλληλεπιδραστικά) με την επέκταση του πληθυσμιακού μεγέθους, συγκλίνει στην κυτταρική σχηματοποίηση μέσω των μηχανισμών της κυτταρικής προσκόλλησης (*adhesion*) και της μεταναστευτικότητας (*motility*). Η αποσαφήνιση της σύνθετης αυτής αλληλεξάρτησης θα αναδείξει τα προσαρμοστικά και / ή επιβιωτικά πλεονεκτήματα που εξασφαλίζει η συνάθροιση των μεσεγχυματικών κυττάρων (*MSC aggregation*) με τη μορφή ομοεπίπεδων στοίχων (*coplanar ranks*) που παρατάσσονται σε εκτενείς παράλληλες σειρές χωρίς να εγκαταλείπουν την επαφή (ή πρόσφυση) με το υπόστρωμα του δοχείου καλλιέργειας. Πιθανότατα μεταξύ αυτών των πλεονεκτημάτων, συγκαταλέγεται και η άμβλυνη (απομείωση) του stress σχηματοποίησης που εξαρτάται από τη διεύθυνση του βαρυτικού ανύσματος, μέσω της αντισταθμιστικής μηχανικής αντιστήριξης (*gravity vector compensation*) που εξασφαλίζει η υιοθέτηση των ατρακτοειδόμορφων σχημάτων (*spindle-like cell shapes*) και η παράλληλη συστοίχισή τους (*coplanar ranking*) κατά την κλιμάκωση του συνωστισμού στη φάση κορεσμού της πληθυσμιακής πυκνότητας.

Ο σύμμορφος μετασχηματισμός του κυτταρικού περιγράμματος σε συνάρτηση με το μέγεθος και τον όγκο του μεσεγχυματικού κυττάρου, καθώς διατρέχει την αλληλουχία των μεταβατικών μορφών που μεσολαβούν από την «εναρκτήρια» σφαιροειδή προς την «τερματική» ατρακτοειδή μορφολογία, συμπορεύεται παράλληλα με την αναδιάταξη (*remodelling*) των *in vitro* διακυτταρικών επαφών (*cell-cell conjugation pattern*). Η πιο άμεση μορφογόνος συνέπεια της αλληλεξάρτησης αυτής επικεντρώνεται πιθανότατα στην τροποποιημένη κυτταρική επιφάνεια στα μεθοριακά σύνορα (*cell-to-cell interfaces*) των παρακείμενων κυττάρων, αναπροσαρμόζοντας το μοριακό της υπόβαθρο κατάλληλα, ώστε να συμβάλλει επανατροφοδοτικά στην κυτταρική

επιβίωση, στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, στην καθοδηγούμενη κυτοκίνηση (προσανατολισμό μιτωτικής ατράκτου), στο βαθμό επίστρωσης-spreading (ισχύς πρόσφυσης), στη μεταναστευτικότητα (*motility*) και τη συναθροιστικότητα (*ranking, aggregation*), κλπ. Ο μορφογενετικός αντίκτυπος μιας τέτοιας προσαρμοστικής δυναμικής, εικάζεται ότι μεσολαβείται από τη δυνατότητα κυτταροδιαίρεσης του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου μέσω κυτοκίνησης-B (*cytokinesis-B*), κατά τρόπο όμως που η ολοκλήρωσή της αποτελεί συνάρτηση της πληθυσμιακής πυκνότητας, μέσω μιας διαδικασίας που εμπλέκει τις μηχανοαισθητικές (*mechanosensory*) ιδιότητες του μηχανισμού καθοδήγησης (*mitotic spindle orientation*) της μιτωτικής ατράκτου.



**Εικόνα II.5.48.:** Ποικιλότητα του προτύπου συνάθροισης (*UC-MSC aggregation pattern*) των μεσεγχυματικών κυττάρων στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειές τους.

### 5.5. Η ποικιλότητα του προτύπου συνάθροισης (*MSC aggregation pattern*) των μεσεγχυματικών κυττάρων στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειές τους αντανακλά την τοπολογική ιδιότητα του ανισοτροπισμού ("*anisotropy*") της κελλωτής διάταξης

Η προσαρμοστική αλληλεπίδραση (*adaptation*) του μεσεγχυματικού φαινότυπου με το άνυσμα της βαρύτητας ("*gravity-vector compensation*") στις διδιάστατες (2D) κυτταροκαλλιέργειες, διαπιστώνεται πρωτίστως στην ευρύτητα του φάσματος των μορφών και δευτερευόντως στη διακύμανση των διαστάσεων, τις οποίες υιοθετεί η κυτταρική μορφολογία. Ο αντίκτυπος της προσαρμογής αποτυπώνεται σε μια στατιστική ετερογένεια ("*polydispersity*") των μορφομετρικών τιμών που είναι δυνατόν να καταμετρηθούν, αφενός για τα μεμονωμένα κύτταρα και αφετέρου για τις συναθροίσεις τους. Η προέλευση όλης αυτής της πεπερασμένης ποικιλότητας, μορφής ("*cell shape and cell size diversity*") και διευσθέτησης (*topographic orientation diversity*) που συνθέτει το συνολικό ανισοτροπισμό, με τον οποίο εκδηλώνεται στο ανάστροφο μικροσκόπιο η *in vitro* προσαρμοστικότητα, ανάγεται στην πραγματικότητα σε τρεις επιμέρους πηγές ανισοτροπισμού ("*disorder origin*", ή "*anisotropy*"):

- 1] ανισοτροπισμός μεγέθους ή διαστάσεων (*size polydispersity - disorder*) [**S-D**]
- 2] ανισοτροπισμός προσανατολισμού (*orientational polydispersity - disorder*) [**O-D**]
- 3] ανισοτροπισμός σχηματοποίησης (*cell shape polydispersity - disorder*) [**CS-D**]

1] Ως ανισοτροπισμός μεγέθους ή διαστάσεων (*cell size polydispersity - anisotropy*) νοείται η ετερογένεια μεγέθους που οφείλεται στη δυνατότητα υιοθέτησης οποιασδήποτε τιμής από ένα δεδομένο εύρος διαστάσεων για τον κυτταρικό όγκο, σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας. Από όλο το φάσμα των βιοτικών παραγόντων (μεταβολικός ρυθμός, επάρκεια θρεπτικών συστατικών, κλπ.) και των αβιοτικών παραγόντων (επιφανειακή τάση ή ιξώδες καλλιεργητικού μέσου, υδροστατική πίεση, κλπ.) που επιδρούν στη διακύμανση του μεγέθους της *in vitro* μεσεγχυματικής μορφολογίας, αποκλειστικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ημιποσοτική εκτίμηση της εξάρτησής της από τις μεταβολές της τοπολογικής μεταβλητής της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*), κατά τη μετάπτωση του μονήρους (*solitary*) φαινότυπου στο συναθροιστικό (*aggregative*). Η μαθηματική διατύπωση που περιγράφει τη συσχέτιση του κυτταρικού μεγέθους ως προς τη συνδεσιμότητα και κατ' επέκταση ως προς την κυτταρική σχηματοποίηση, συνοψίζεται κομψά και περιεκτικά στο νόμο **Aboav-Weaire** (*Aboav-Weaire's law*), ο οποίος αναλύεται διεξοδικά στη θεωρία κελλωτών στερεών του Κεφαλαίου-I της Εισαγωγής [**Εικ. II.6.79.**].

2] Ως ανισοτροπισμός προσανατολισμού (*orientational polydispersity - anisotropy*) νοείται ο βαθμός στον οποίο περιορίζεται η δυνατότητα στοίχισης μέσω φυσικής επαφής (περιορισμός βαθμών ελευθερίας) μεταξύ των επιφανειών δυο ή παρακείμενων κυττάρων ίδιου ή διαφορετικού σχήματος (π.χ. μεταξύ ατρακτόμορφων), ως συνάρτηση της μορφολογίας τους (σχήματος και διαστάσεων) και κατ'επέκταση ως συνάρτηση της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*). Συνεπώς, για την ανάλυση της ετερογένειας διευθέτησης, παραθεωρείται σκόπιμα η επίδραση της μεταναστευτικότητας (*motility*), όχι μόνο για λόγους απλούστευσης αλλά επιπρόσθετα, επειδή στην παρούσα εργασία επιδιώκεται μια ποιοτική εκτίμηση της εξάρτησής της από την κυτοκίνηση-B (*cytokinesis-B*) και τη μεταξύ τους μορφογόνο αλληλεπίδραση για την παραγωγή ποικιλότητας (παραλλαγών) στο πρότυπο συνάθροισης των μεσεγχυματικών κυττάρων (*aggregation pattern*) ([**Εικ. II.5.48.**], [**Εικ. II.5.49.**], [**Εικ. II.5.50.**]).

3] Ως ανισοτροπισμός σχηματοποίησης (*cell shape polydispersity - anisotropy*) νοείται η πλαστικότητα (ή διακύμανση) που διέπει τη δυνατότητα υιοθέτησης ενός δεδομένου κυτταρικού σχήματος (π.χ. του ατρακτοειδούς), σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας και σε δεδομένη φάση της πληθυσμιακής επέκτασης, που αντανακλά ένα ορόσημο στιγμιότυπο από την αλληλουχία των μεταβατικών μορφολογιών που αντιστοιχούν στις μεταπτώσεις του μονήρους φαινότυπου στο συναθροιστικό. Ο αντίκτυπος του *ανισοτροπισμού σχηματοποίησης* στην παραγωγή και διάδοση ετερογένειας (ή διασποράς) στο μεσεγχυματικό πληθυσμό, με την έννοια της απόκλισης από μια «μέση μορφολογία», προσδίδει στην αλληλουχία των μεταβατικών μορφών έναν χαρακτήρα διαβάθμισης των σχημάτων. Η εξάρτηση της «κυτταρικής γεωμετρίας» από τη διατήρηση ή από τη μεταβολή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*) υπεισέρχεται αμεσότερα από οποιαδήποτε άλλη αλληλεπίδραση στη μορφογόνο δυναμική της κυτοκίνησης-B για εγκαθίδρυση και διατήρηση ή μεταβολή του τοπολογικού χαρακτήρα της μεσεγχυματικής συνάθροισης.

Οι διακριτές μορφολογίες αντιπροσωπεύουν τις επιμέρους προσαρμοστικές αποκρίσεις που οι κατακερματισμένες συνιστώσες του *in vitro* κυτταρικού πολλαπλασιασμού (π.χ. η οριοθέτηση της μιτωτικής ατράκτου, “*oriented cytokinesis*”) αντιτάσσουν έναντι του βαρυτικού πεδίου συναρτήσει

της ελλιπούς *συνδεσιμότητας (connectivity)*, αποσυντονισμένες (ή αποσυζευγμένες) η μία από την άλλη, αλλά με απώτερη νομοτέλεια την αποκατάσταση (ή ανάταξη, *restoration*) μιας στενότερης συσχέτισής τους με τη μεταβλητή της πληθυσμιακής πυκνότητας (*population density*). Δεδομένης λοιπόν της μηδενικής οριζόντιας συνιστώσας και της ομοιογένειας του κατακόρυφου ανύσματος του πεδίου βαρύτητας (*gravity vector*), την οποία διασφαλίζει η ομοεπίπεδη κατανομή (*coplanar distribution*) όλων των προσκολλημένων κυττάρων σε μονόστοιβο ταπήτιο (*monolayer*), συνάγεται ότι ο προσαρμοστικός αντίκτυπος που είναι ικανή να επιφέρει στη σχηματοποίησή τους η κυτοκίνηση-Β, με την έννοια της μορφολογικής ποικιλοποίησης (*“cell shape and cell size diversity”*), εξαρτάται κυρίως από την αλληλεπίδρασή της με τις παραλλαγές του προτύπου της διακυτταρικής επαφής (*conjugation pattern*), που σε απώτερη ανάλυση αντιπροσωπεύει τη διακύμανση του βαθμού της διακυτταρικής δικτύωσης (*connectivity*).

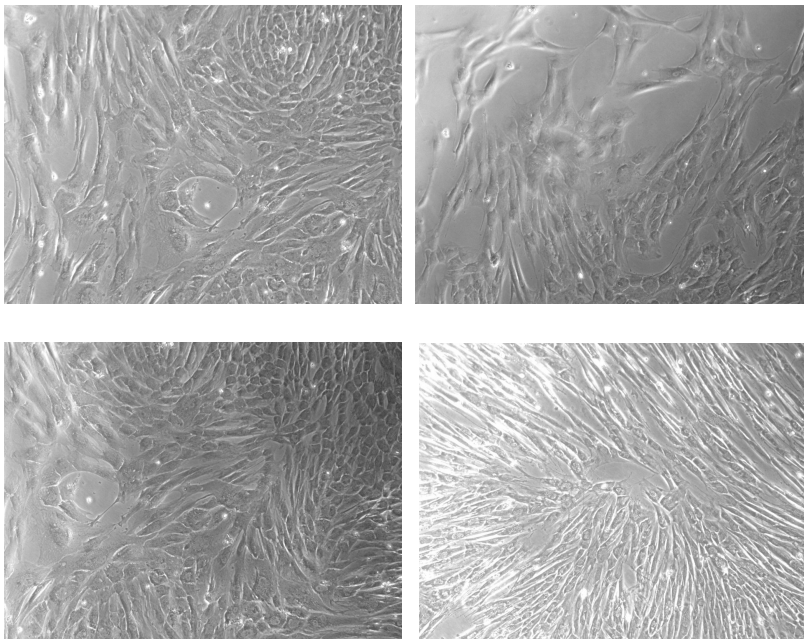
**5.5.1. Οι διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων αποτυπώνουν στα μοτίβα συνάθροισης (*aggregation patterns*) μια τοπογραφική διαβάθμιση για ποικίλους μορφομετρικούς χαρακτήρες, η οποία είναι συνάρτηση της απόστασης από το ιστοτεμάχιο.**

Η συσχέτιση μεταξύ «κυτταρικής γεωμετρίας» και *συνδεσιμότητας (connectivity)* έχει διερευνηθεί διεξοδικά στα αβιοτικά κελλωτά δίκτυα και αξιοποιείται στην εκτίμηση πληθώρας φυσικών, φυσικοχημικών, καθώς και άλλων ιδιοτήτων, ενώ από τοπολογικής τουλάχιστον σκοπιάς, φαίνεται να υποβόσκει και στη μορφογένεση πολλών βιολογικών κελλωτών διατάξεων (όπως για παράδειγμα οι μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) της καταβολής του άκρου σε προνύμφες αμφιβίων, τα μονόστοιβα ζωικά επιθήλια, οι φυτικοί επιθηλιοειδείς ιστοί, κλπ). Οι τοπολογικές ιδιότητες με τις οποίες εμπλουτίζει το μεσεγχυματικό φαινότυπο το καθεστώς της *in vitro* γειτνίασης, γίνονται σταδιακά αναγνωρίσιμες στη διδιάστατη ιστοκαλλιέργεια από τη στερεότυπη ακολουθία των μετασχηματισμών του μοτίβου των διακυτταρικών επαφών (*cell-cell contact transformations*), συναρτήσει της πληθυσμιακής επέκτασης (*expansion*). Όλα τα μεσεγχυματικά κύτταρα που απομονώνονται από τη Βαρτόνια γέλη (*Wharton’s Jelly*) ανθρώπινου ομφάλιου λώρου (*WJ-MSCs*, *UC-MSCs*), κατά τη μετάβαση από το μονήρη (*solitary*) στο συναθροιστικό (*aggregative*) φαινότυπο διανύουν μια περιορισμένη αλληλουχία *in vitro* μορφολογικών προσαρμογών (*adaptations*) που συγκλίνουν μονόδρομα (μη αντιστρεπτά) σε ένα κοινό πρότυπο διευθέτησης (παράλληλης συστοίχισης, *ranking*), το οποίο εξαρτάται από την «τερματική» μορφολογία του ατρακτοειδούς σχήματος («μορφολογία κορεσμού»). Ειδικά για τις μεσεγχυματικές συναθροίσεις που παρατάσσονται σε εγγύτατη γειτνίαση ως προς το ιστοτεμάχιο (*proximal MSC aggregates*), επισημαίνονται οι «μακροσκοπικές διαφορές» τους έναντι των περισσότερο απομακρυσμένων συναθροίσεων (*distal MSC aggregates*), επειδή συνοψίζουν τα ορόσημα (ή «αρχέτυπα») μορφομετρικά χαρακτηριστικά των μεταβατικών μορφολογιών της *in vitro* προσαρμογής, υπό τη μορφή:

- 1] της επίσπευσης του απαιτούμενου χρόνου για κορεσμό της πληθυσμιακής πυκνότητας,
- 2] του υψηλότερου βαθμού ομοιογένειας, όσον αφορά τις παραλλαγές της «τερματικής» μορφολογίας του ατρακτοειδούς σχήματος («μορφολογίας κορεσμού»),
- 3] της ελαχιστοποιημένης διακύμανσης του κυτταρικού μεγέθους,
- 4] του καθεστώτος ελαχιστοποίησης της ετερογένειας διευθέτησης (*orientational disorder minimalization*, **[O-D] minimalization**), η οποία περιορίζεται σε μια στερεότυπη ακτινοσυμμετρική

παράταξη από επάλληλους ομόκεντρους στοίχους, που περικυκλώνουν όλη την περίμετρο του κρασπέδου του ιστοτεμαχίου,

5] της εκλεκτικής μορφογενετικής αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εδρεύουν στις παρυφές του ιστοτεμαχίου, η οποία συμβάλλει στη διαμόρφωση μιας ομοεπίπεδα πολωμένης τοπογραφικής ετερογένειας που εκτείνεται ακτινοσυμμετρικά και σε συνάρτηση με την κλιμακούμενη απόσταση από τη θέση εντοπισμού του ιστοτεμαχίου στο υπόστρωμα του καλλιεργητικού τρυβλίου. Η αύξηση της απόστασης της συνάθροισης (*MSC aggregate*) συμπορεύεται με υποδεέστερη ομοιογένεια στο σχήμα, στο μέγεθος και στο προσανατολισμό διευθέτησης των μεταβατικών μορφολογιών που μεσολαβούν από την πρωιμότερη ασταθή κατάσταση του μονήρους φαινότυπου μέχρι την οψιμότερη οριστική κατάσταση του συναθροιστικού φαινότυπου.



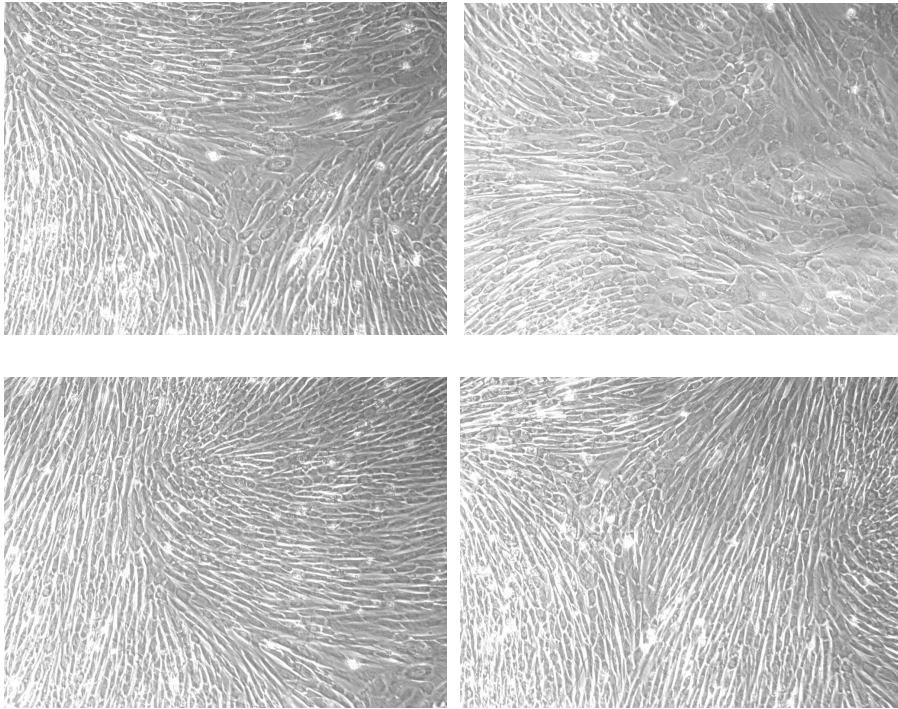
**Εικόνα II.5.49.:** Η ποικιλότητα του προτύπου συνάθροισης (*aggregation pattern*) για τις απώτερες μεσεγχυματικές συναθροίσεις (*distal MSC aggregates*) παράγεται σε σημαντικό ποσοστό από τον ανισοτροπισμό που υπεισέρχεται στο πρότυπο των κυτταρικών διεπαφών (*conjugation pattern*).

#### **5.5.2. Ο παραλληλισμός της τοπολογίας μεταξύ των μεσεγχυματικών συμπυκνώσεων στα φύτρα των άκρων από προνύμφες αμφιβίων (*mesenchymal condensations*) και των μεσεγχυματικών συναθροίσεων (*MSC aggregates*).**

Η εξάρτηση της διδιάστατης (ομοεπίπεδης) πόλωσης της μεσεγχυματικής μορφολογίας από την απόσταση του ιστοτεμαχίου, μπορεί να δικαιολογηθεί ως ένα βαθμό από τις εξειδικευμένες μορφογενετικές ιδιότητες των «καθοδηγούμενων κυτταροδιαιρέσεων» (*oriented mitoses*), οι οποίες αφομοιώνουν «διανυσματικά δεδομένα» (*“vectorial data”*) που ανταλλάσσονται εκλεκτικά μεταξύ των κυττάρων που συναπαρτίζουν τις εγγύτερες μεσεγχυματικές συναθροίσεις (*proximal MSC aggregates*) και μεταξύ των κυττάρων που συμμετέχουν στις απώτερες (*distal MSC aggregates*). Στο βαθμό που μια τέτοια αιτιολόγηση ευσταθεί, η θεώρηση των συναθροίσεων ως κελλωτά δίκτυα, εισηγείται την έννοια της «συνάφειας» (*“cohesion”*) για την τοπολογική αλληλεπίδραση μεταξύ



διαφορετικών προτύπων συνδεσιμότητας (*connectivity*), τα οποία μπορούν να αντικατοπτρίζουν τοπικές γειτονιές που διαφέρουν στο πρότυπο των κυτταρικών διεπαφών (*conjugation pattern*).



**Εικόνα II.5.50.:** οι συνήθεις παραλλαγές του προτύπου των κυτταρικών διεπαφών (*conjugation pattern*) για τις εγγύτατες μεσεγχυματικές συναθροίσεις (*proximal MSC aggregates*) χαρακτηρίζονται από περιορισμένο ανισοτροπισμό.

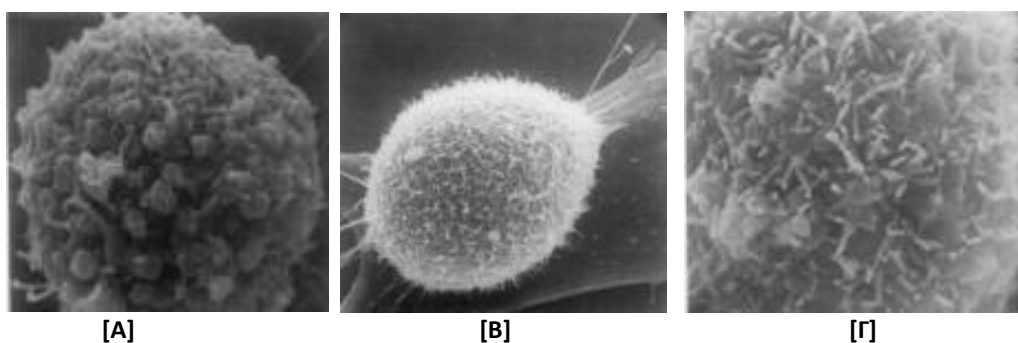
Έτσι, το ασύντακτο πλήθος των μεσεγχυματικών κυττάρων μιας ιστοκαλλιέργειας, στο βαθμό που απέχει χρονικά από το στάδιο του πληθυσμιακού κορεσμού (*confluency*) αντιπροσωπεύει περισσότερο μια αθροιστική συλλογή μεμονωμένων κυτταρικών μονάδων παρά ένα κελλωτό δίκτυο μοναδιαίων κελλιών (*two dimensional cellular solid, "honeycomb"*), επειδή οι μορφογενετικές συνιστώσες της *in vitro* χάραξης σχεδίου (*in vitro pattern formation*) δεν έχουν συμπληρώσει ακόμη το (προκαθορισμένο) διδιάστατο πρότυπο διαβάθμισης (*planar polarity*) για την τοπογραφική ετερογένεια (*anisotropy*) του κυτταρικού συνόλου. Η μορφογενετική αυτή εκκρεμότητα ολοκληρώνεται σποραδικά σε απομονωμένες τοπικές εστίες, με τη μορφή άτακτα σπειροειδούς ή στροβιλώδους παράταξης από μη παράλληλους ολιγομελείς στοίχους (*coplanar ranks*), όσο κλιμακώνεται η απόσταση των διεσπαρμένων κυττάρων από το ιστοτεμάχιο ([**Εικ. II.5.49.**] και [**Εικ. II.5.50.**]). Πιθανώς η μορφογενετική αλληλεπίδραση μεταξύ τέτοιων τοπικών εστιών στις παραμεθόριες παρυφές του πρώιμου ακατάστατου μεσεγχυματικού πληθυσμού, επισπεύδεται από την εγγύτερη γειτνίασή τους στο ιστοτεμάχιο και από την επακόλουθη μείωση της απόστασης που τις διαχωρίζει, με ευνοϊκό αντίκτυπο στην ευόδωση της «περικυκλωτικής MSC συστοίχισης» (ή ομοεπίπεδης εγκόλπωσης, *planar convolution*). Ενώ αντιθέτως, ένας πληθυσμός στη φάση κορεσμού (*confluency*) έχει αφομοιώσει σχεδόν το σύνολο των κυττάρων του στην «αρχέτυπη» διευθέτηση της μεσεγχυματικής συνάθροισης (*mesenchymal aggregation*), οργανωμένης υπό ένα καθεστώς συνδεσιμότητας (*connectivity*) που διέπεται από τις ίδιες τοπολογικές ιδιότητες που υποβόσκουν και στην επέκταση (*expansion*) των αβιοτικών κελλωτών δικτύων (*cellular solids*).

### 5.5.3. Δύο κλάσεις αντιπαραδειγμάτων που αντιβαίνουν στη θερμοδυναμική έκβαση της κυτταρικής σχηματοποίησης και συνηγορούν υπέρ του τοπολογικού υπόβαθρου της

Η παράθεση των επόμενων αντιπαραδειγμάτων αποσκοπεί σε μια επιχειρηματολογία που μέσω της «εις άτοπον απαγωγής» επιδιώκει να επισημάνει το είδος των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της κυτταρικής σχηματοποίησης και της συνάθροισης. Διαφαίνεται ο γεωμετρικός και ο τοπολογικός χαρακτήρας των μεταβλητών που συγκλίνουν στην καθοδήγηση της συγκρότησης της μιτωτικής ατράκτου (*mitotic spindle orientation*) η οποία λαμβάνει χώρα σε συνάρτηση με την προσκολλητική δυναμική του μεσεγχυματικού φαινότυπου καθ' όλη τη διάρκεια της πληθυσμιακής επέκτασής του. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι για την υποτυπώδη μορφογένεση που παρατηρείται στη διδιάστατη ιστοκαλλιέργεια, η χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) που συνοδεύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μεσολαβείται πιθανότατα από μια μορφή «καθοδηγούμενης κυτταροδιαίρεσης» (*oriented mitosis*), η οποία αναγνωρίζεται στη βιβλιογραφία ως κυτοκίνηση-B.

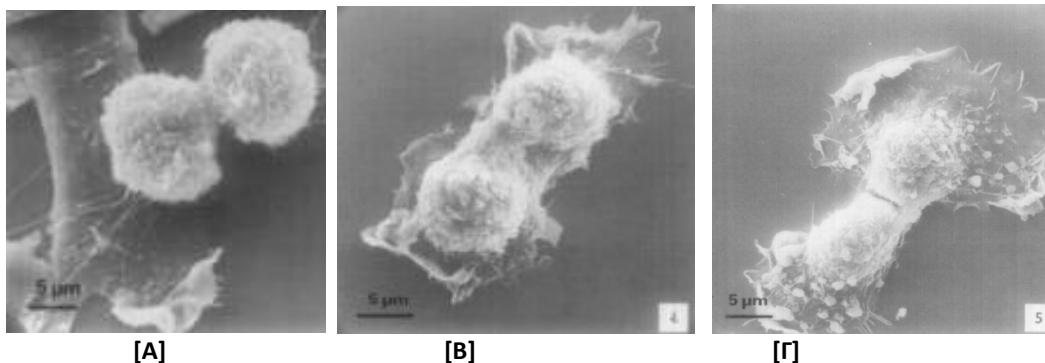
#### 5.5.3.α. Το αντιπαραδείγμα για την «αυθόρμητη» κυτταρική σχηματοποίηση

α] Όσον αφορά τη φάση του μονήρους (απομονωμένου ή μεταναστευτικού, *solitary phenotype*) φαινότυπου, μια αυτόματη σφαιροποίηση του κυτταρικού σχήματος, υποκινούμενη από τη θερμοδυναμική απαίτηση για «αυθόρμητη» ελαχιστοποίηση του κλάσματος της κυτταρικής επιφάνειας που εκτίθεται στο αβιοτικό υπόστρωμα του τρυβλίου και στο ακυτταρικό θρεπτικό υλικό του, θα ήταν περισσότερο αναμενόμενη στις *in vitro* συνθήκες της παντελούς απουσίας διακυτταρικών επαφών. Αντιθέτως, η υιοθέτηση μορφολογιών που αποκλίνουν συστηματικά από τη σφαιρική στερεολογία, ακολουθεί μια αλληλουχία στερεότυπων μετασχηματισμών (μια «πεπατημένη» διαδοχή), που ερμηνεύεται στο πλαίσιο μιας νομοτελειακής αναγκαιότητας για αφομοίωση του μονήρους (νομαδικού ή περιπλανώμενου, *solitary phenotype*) φαινότυπου από τον «τερματικό» φαινότυπο ατρακτοειδούς μορφολογίας, των μεσεγχυματικών συναθροίσεων.



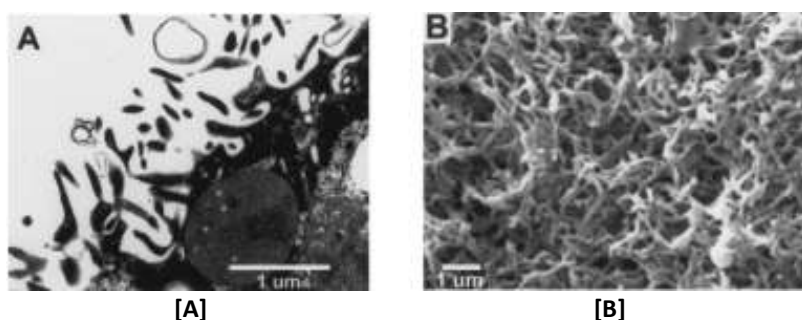
**Εικόνα II.5.51.:** Ηλεκτρονιογραφίες σάρωσης από την κυτταρική σειρά **BHK 21**. **[Α]** απεικονίζεται η υφή της κυτταρικής επιφάνειας **10 min** μετά την επίδραση τρυψίνης (*trypsinization*), προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια (*“passage”*). Είναι ευδιάκριτη η χαρακτηριστική εικόνα της εγκόλπωσης σε όλη την έκτασή της. **[Β]** παρόμοια στερεότυπη εικόνα παρατηρείται επίσης και στην επιφάνεια του μητρικού κυττάρου λίγο πριν την επικείμενη κυτταροδιαίρεση, καθώς και στις επιφάνειες των θυγατρικών κυττάρων, κατά τη διάρκεια της κυτοκίνησης και για ορισμένο χρονικό διάστημα μετά την ολοκλήρωσή της. **[Γ]** η συνολική εγκόλπωση (*convolution*) που είναι συσχετισμένη με την κυτοκίνηση φαίνεται να διέπεται από μεγαλύτερη δομική ετερογένεια (*polydispersity*), καθώς συμπεριλαμβάνει ειδικότερους σχηματισμούς της πλασματικής μεμβράνης (*folds, blebs, microvilli*), οι διαφορές των οποίων αναδεικνύονται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (10000x).

Έτσι, το φάσμα των πρώιμων μορφολογιών φαίνεται να «κυμαίνεται ποικιλόμορφα» σε συνάρτηση με μια «αρχέτυπη μορφολογία» που αντιπροσωπεύει εκείνες που αντιστοιχούν στα απομονωμένα κύτταρα (που είναι φορείς του μεταναστευτικού φαινότυπου) και της οποίας η στατική απεικόνιση συνοψίζεται σ' ένα κυρτό ή κοίλο πολυγωνικό σχήμα, η μεταβλητότητα του οποίου εξαρτάται τοπολογικώς από μια «μέση τιμή σχήματος». Αυτή η «μέση μορφολογία» υποδηλώνει την αντιστοίχιση προς ένα στατιστικό πλήθος ή μια κατανομή που συμπεριλαμβάνει όλο το εύρος των εξαρτημένων μορφολογιών και αντανακλά τον προσαρμοστικό επιτολασμό της προσκολλητικής δυναμικής του μονήρους φαινότυπου, τα αρχικά στάδια του οποίου δεν εκδηλώνουν ακόμα εξάρτηση από τον επικείμενο συναθροιστικό φαινότυπο και την «τερματική» ατρακτοειδή μορφολογία του. Αλλά αντιθέτως, συσχετίζονται στενότερα προς το μεταναστευτικό και βασίζονται αποκλειστικά στη χημειοτακτική αλληλεπίδραση μεταξύ των διεσπαρμένων κυττάρων. Υπό αυτή τη θεώρηση, η εισήγηση του όρου «*in vitro* κυτταρικό σχήμα» συνυπολογίζει οποιαδήποτε μορφολογία απορρέει (εκλύεται) ως προϊόν μιας προσαρμοστικής παρέκκλισης από το σφαιροειδές σχήμα που χαρακτηρίζει γενικότερα τις μορφολογίες των εν'εναιωρήσει καλλιεργούμενων φαινότυπων. Συνοψίζοντας, τα κύτταρα σφαιροειδούς μορφολογίας, στο βαθμό που διατηρούν σε κατάσταση εγκόλπωσης σημαντικό ποσοστό του εμβαδού της πλασματικής μεμβράνης, υστερούν ή και αδυνατούν ακόμη, να συνάψουν λειτουργικές διακυτταρικές επαφές κατά τη γειτνίασή τους, πιθανώς επειδή δε διαθέτουν την κατάλληλη προσαρμοστική εξειδίκευση των επιφανειών τους, η οποία σε άλλη περίπτωση (όπως σε εκείνη των καλλιεργούμενων μεσεγχυματικών κυττάρων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο, WJ-MSCs, UC-MSCs) θα ευνοούσε το καθεστώς της *in vitro* συνδεσιμότητας (*connectivity*). Κατά συνέπεια, στα μοντέλα που εισηγούνται τη δισκοειδή (ή κυκλική) μορφολογία για την υπολογιστική αναπαράσταση του μοναδιαίου κελλιού (όπως π.χ. στην αρχική εκδοχή του «γκρανοκεντρικού μοντέλου»), παραθεωρείται η τοπολογία των κελλωτών δικτύων, καθώς στις συσσωρεύσεις των μοναδιαίων δισκοειδών κελλιών, το γεωμετρικό ισοδύναμο των διακυτταρικών επαφών (*conjugation surface average area*) λαμβάνει την ελάχιστη δυνατή τιμή του, επειδή αντιστοιχεί στους γεωμετρικούς τόπους των τομών μεταξύ παρακείμενων κυκλικών περιγραμμάτων. Άρα η βιογένεση της «μεσεγχυματικής ακμής» και οι μορφογενετικές ιδιότητές της είναι ασύμβατες με τη σφαιροειδή στερεολογία και τη δομολειτουργική εξειδίκευση των εγκολπώσεων της επιφάνειάς της ([VII.5.9.], [VII.5.10.], [VII.5.11.], [VII.5.12.]).



**Εικόνα II.5.52.:** [A] στιγμιότυπο μιας σειράς ηλεκτρονιογραφών μικροσκοπίας σάρωσης από θυγατρικά κύτταρα **BHK 21** που ολοκληρώνουν την κυτοκίνηση. Οι κυτταρικές επιφάνειες είναι διάστικτες από τις δομικές εξειδικεύσεις της πλασματικής μεμβράνης (*folds, blebs, microvilli*), που συνθέτουν τη συνολική εγκόλπωση (*convolution*) και οι οποίες γενικώς απουσιάζουν από την επιφάνεια των προσκολλημένων κυττάρων (*spreading cells*). Ωστόσο είναι εμφανείς οι μεμβρανικές προσεκβολές (*villus-like projections*) που οριοθετούν τις απώτατες παρυφές των ελασματοποδίων τους (*lamellipodia*) (2000x). [B] τα θυγατρικά κύτταρα αρχίζουν να προσκολλώνται στο υπόστρωμα του δοχείου καλλιέργειας περίπου **30 min** μετά την ολοκλήρωση της κυτοκίνησης, ενώ παράλληλα με την επίστροφή τους (*spreading*) παρατηρείται βαθμιαία απώλεια των μεμβρανικών προσεκβολών, με αφετηρία τις απώτατα άκρα των ελασματοποδικών κρασπέδων (2750x). [C] περίπου **60 min** μετά την ολοκλήρωση της κυτταροδιαίρεσης, οι διαστάσεις των μεμβρανικών προσεκβολών έχουν συρρικνωθεί σημαντικά και η τοπογραφική κατανομή τους έχει περιοριστεί στο κλάσμα της κυτταρικής επιφάνειας που οριοθετεί τη θέση του πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο εμβαδόν της μέχρι τις απώτατες παρυφές των ελασματοποδίων (*lamellipodia*) είναι ελεύθερο εγκολπώσεων (2500x).

β] Όσον αφορά τη φάση του συναθροιστικού φαινότυπου, θεωρείται απίθανη η αυτόματη σφαιροποίηση του κυτταρικού σχήματος, υποκινούμενη από τη θερμοδυναμική απαίτηση για «αυθόρμητη» ελαχιστοποίηση του κλάσματος της κυτταρικής επιφάνειας που εκτίθεται στις παρακείμενες, καθώς και στα εκκρινόμενα μακρομόρια που έχουν επιστρώσει στο υπόστρωμα του τρυβλίου καλλιέργειας. Αντιθέτως, η υιοθέτηση κυρτών ή κοίλων πολυγωνικών μορφολογιών, οι οποίες εξ' ορισμού εμπλουτίζουν γεωμετρικώς το εμβαδόν της πλασματικής μεμβράνης, ευνοούν την κλιμάκωση της διακυτταρικής δικτύωσης και κατά συνέπεια την πολυπλοκοποίηση του μορφογενετικού ρόλου της κυτταρικής σχηματοποίησης. Συνοψίζοντας, η κυτοκίνηση-B εξασφαλίζει ευνοϊκό περιορισμό του πλήθους των διαδοχικών μετασχηματισμών που απαιτούνται στο πλαίσιο της νομοτελειακής αναγκαιότητας για αφομοίωση του μονήρους (νομαδικού ή περιπλανώμενου, *solitary phenotype*) φαινότυπου από τον «τερματικό» ατρακτοειδή (*spindle-shape*) φαινότυπο των μεσεγχυματικών συναθροίσεων.



**Εικόνα 11.53.:** [A] ηλεκτρονιογραφία μικροσκοπίας διέλευσης (TEM) και [B] μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), στις οποίες αποτυπώνονται οι λεπτομέρειες της επιφάνειας ωκυττάρου *Xenopus*, που βρίσκεται από μεμβρανικούς σχηματισμούς τύπου microvilli.

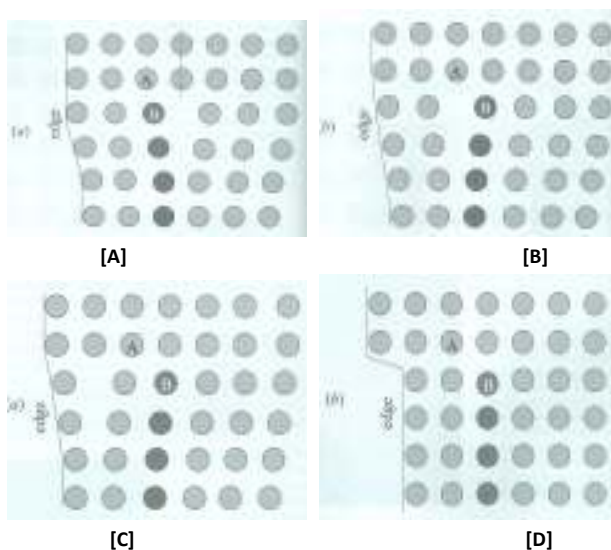
#### **5.5.3.b. Το αντιπαράδειγμα για την «αυθόρμητη» κυτταρική συστοίχιση με τη μορφή της αντιπαράβολής μεταξύ των τοπολογικών και των γεωμετρικών σχηματισμών**

Στις εικόνες που ακολουθούν αναπαρίσταται κάποια όψιμη φάση μιας καλλιέργειας όπου η πληθυσμιακή πυκνότητα έχει προσεγγίσει τιμή κορεσμού, αλλά η μορφολογία των μεσεγχυματικών κυττάρων εικάζεται ότι σχηματοποιήθηκε εντελώς ανεξάρτητα (ή άσχετα) από την προσαρμοστική *in vitro* κυτταροβιολογία του συναθροιστικού φαινότυπου (*aggregative phenotype*). Με άλλα λόγια δεν υιοθέτησε την πολυγωνική σχηματοποίηση του μονήρους φαινότυπου (*solitary phenotype*) ούτε διήλθε την ακολουθία των μετασχηματισμών προς την «τερματική» ατρακτοειδή μορφολογία. Συνεχίζοντας στο πλαίσιο της ίδιας εικασίας, εξετάζεται ο πιθανός μορφογενετικός αντίκτυπος μιας τυχαίας κυτταροδιαίρεσης, που δεν ολοκληρώθηκε με την εκδοχή της κυτοκίνησης-B.

Η απουσία των θυγατρικών κυττάρων από το σχεδιάγραμμα κρίθηκε σκόπιμη για την εποπτικότερη αναπαράσταση της αναγκαστικής μετατόπισης που επέφεραν στα προϋπάρχοντα κύτταρα, ως συνέπεια του αυξημένου τοπικού συνωστισμού. Η τοπική διαταραχή (παραμόρφωση ή απόκλιση, *disorder*, *dislocation*) της στοιχισμένης (*ranked*) διευθέτησης παριστάνεται με τη μορφή του «χάσματος» (ή κενού, *gap*) στο οποίο καταλήγει μία από τις στοιχισμένες γραμμές (*ranks*) και υποδηλώνει τη θέση που κατείχε κανονικά το μητρικό κύτταρο στη στοιχισμένη διάταξη, πριν τη δεδομένη μίτωση. Η σκόπιμη εκκένωση της θέσης αυτής, υπαινίσσεται λοιπόν τον πιθανότερο γεωμετρικό αντίκτυπο που επιφέρει η τοπική είσοδος κυτταρικής μάζας στο επίπεδο δίκτυο, χωρίς

παράλληλη συμμόρφωση με το προϋπάρχον μοτίβο συστοίχισης, αφού τα δισκοειδή κελιά στερούνται των απαραίτητων γεωμετρικών στοιχείων (ακμές, κορυφές, κλπ.) μέσω των οποίων θα συντηρούσαν και θα αναπαρήγαγαν μια προδιαγεγραμμένη τοπολογική συνοχή (ή συνεκτικότητα, *connectivity*) στη διάταξη.

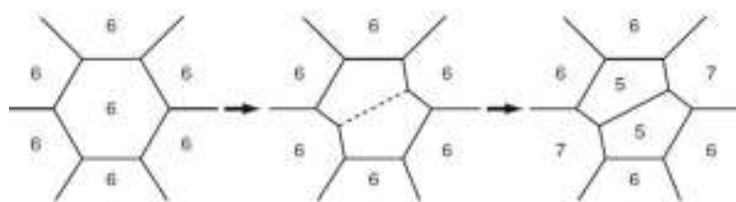
Η ενδεχόμενη αναδιευθέτηση της θέσης του «χάσματος» αυτού που απεικονίζεται στα διαδοχικά στιγμιότυπα, εναπόκειται στη δυνατότητα παθητικής ή ενεργητικής αναδιάταξης των γειτονικών κυττάρων (δισκοειδών κελιών), η οποία θα αντιπροσώπευε την προσαρμοστική απόκριση μιας κυτταρικής συνάθροισης, προικισμένης με μια υποτυπώδη τουλάχιστον ικανότητα διατήρησης του μοτίβου συστοίχισης. Αλλά οπωσδήποτε δεν αντανακλά ακολουθία τοπολογικών μετασχηματισμών, καθώς δεν υπεισέρχεται διακύμανση κάποιας (τοπολογικής) μεταβλητής *συνδεσιμότητας (connectivity)*, η μεταβολή της οποίας εξαρτάται από τη σταθερά Euler. Έτσι, στο συγκεκριμένο «αντιπαράδειγμα», την τοπική αυτή παραμόρφωση που προκαλεί η παρείσφρυση των θυγατρικών κυττάρων στο μοτίβο συστοίχισης, αμβλύνει η παράλληλη αύξηση της περιμέτρου της συνολικής διάταξης μέσω μιας αλληλουχίας αντισταθμιστικών γεωμετρικών μετασχηματισμών, οι οποίοι δεν απορρέουν αποκλειστικά από την προσαρμοστική δυναμική του δικτύου, αλλά αντανakλούν την πιθανή συμβολή και αστάθμητων αβιοτικών παραγόντων (π.χ. φυσικοχημικών, όπως το ιξώδες του θρεπτικού μέσου) ή ακόμη και της τυχαιότητας. Ανακύπτει συνεπώς η ανάγκη στοιχειοθέτησης μιας *in vitro* συνθήκης για την αναγνώριση των μορφογενετικών μετασχηματισμών και στις προϋποθέσεις της προβλέπεται οπωσδήποτε η απαίτηση για διατήρηση της τοπολογικής ταυτότητας των μετασχηματισμών.



**Εικόνα II.5.54.:** Στα **μη κελλωτά** κανονικά (ισοτροπικά) δίκτυα (όπου τα μοναδιαία κελιά είναι για παράδειγμα κυκλικά και ισομεγέθη, ανεξάρτητα αν εφάπτονται ή όχι), στις περιπτώσεις που η παραμόρφωση του μοτίβου διδιάστατης στοίχισης διατηρείται «στατιστικώς αμελητέα» κατά την αφομοίωση μιας τοπικής διαταραχής (*disorder, dislocation*), αυτή η περιοριστική γεωμετρική συνθήκη (ελαχιστοποίησης) εξασφαλίζεται μέσω πεπερασμένου πλήθους μετασχηματισμών, των οποίων η διατεταγμένη ακολουθία επιφέρει στις διαστάσεις (στην περίμετρο και / ή στο εμβαδόν) της συνολικής διάταξης μια μεταβολή, το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από την απόσταση που διαχωρίζει τα κέντρα των μοναδιαίων κελιών (δίσκων).

Στους τοπολογικούς μετασχηματισμούς των *διδιάστατων κελλωτών δικτύων*, όπου εξ'ορισμού τα μοναδιαία κελιά είναι πολυγωνικά και εφάπτονται σε σημαντικό κλάσμα της

περιμέτρου τους (ή σε σημαντική αναλογία του εμβαδού της επιφάνειάς τους), ανεξάρτητα αν είναι ισομεγέθη ή όχι (ανεξάρτητα από τη διακύμανση μεγέθους κελιού), το μοτίβο στοίχισης (*ranking pattern*) το οποίο αντικατοπτρίζει τη μεταβλητή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*), τροποποιείται σε τοπική κλίμακα (στην κλίμακα της γειτονιάς), χωρίς αυτή η εντοπισμένη αλλαγή να συνοδεύεται οπωσδήποτε και από συμμεταβολή στις διαστάσεις της συνολικής διάταξης (στην περίμετρο και / ή στο εμβαδόν της κηρήθρας). Τα τρία επιμέρους στιγμιότυπα του διαγράμματος της επόμενης εικόνας [Εικ. II.5.55.] αναπαριστούν τα βασικά γεωμετρικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά της κυτταροδιαίρεσης που πραγματοποιείται σε κύτταρα, των οποίων η τριδιάστατη μορφολογία, καθώς και η στερεολογία της διακυτταρικής δικτύωσης, μπορούν να αποδοθούν ικανοποιητικά με πολυγωνικά (ομοεπίπεδα) περιγράμματα.



**Εικόνα II.5.55.:** Στην εικόνα παριστάνεται μια διαγραμματική απεικόνιση της *in vivo* κυτταροδιαίρεσης με όρους προβολικής γεωμετρίας, σύμφωνα με τους αλγόριθμους που αξιοποιούνται στα μοντέλα μέγιστης εντροπίας (*maximum entropy methods / statistical inference methods*). Είναι εμφανής η ομοιότητα με μια αντίστοιχη διαγραμματική απεικόνιση της *κυτοκίνησης-B*, η οποία αντιπροσωπεύει τη διδιάστατη εκδοχή της *in vitro* μίτωσης, στο βαθμό που επικεντρώνεται στον *τοπολογικό χαρακτήρα των διακυτταρικών επαφών*.

Στα διαδοχικά στιγμιότυπα του διαγράμματος αποτυπώνονται εποπτικά οι απλοί γεωμετρικοί μετασχηματισμοί που είναι ικανοί να διαμορφώσουν μια *τοπολογική συνθήκη δυναμικής ισορροπίας* (*"equilibrium"*), μέσω παραγωγής *ετερογένειας* (ή *ανισοτροπισμού*) με προδιαγραφές πρόγνωσης της επικείμενης εξέλιξής της. Τα θυγατρικά κύτταρα τείνουν να υιοθετήσουν μορφολογία κελιού με λιγότερες ακμές από όσες διέθετε το μητρικό κύτταρο, καθώς μετατρέπονται σε πενταγωνικά. Παράλληλα, η κυτοκίνηση διαταράσσει την καθεστικυία διευθέτηση, υποβάλλοντας υποχρεωτικά τα παρακείμενα (προϋπάρχοντα) κύτταρα σε προσαρμοστική σχηματοποίηση η οποία τείνει να αυξήσει το πλήθος των ακμών τους, παραμορφώνοντας στην προκειμένη περίπτωση δυο από αυτά σε επταγωνικά. Γενικεύοντας λοιπόν, η πληθυσμιακή επέκταση (*expansion*) *οποιοιδήποτε δικτυωμένων κυττάρων* μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οπωσδήποτε θα αλληλεπιδράσει ποιοτικά και ποσοτικά με το *καθεστώς της δικτύωσης των εφαπτόμενων επιφανειών*.

Ειδικά για τη μίτωση που διχοτομεί το κεντρικό (μητρικό) κύτταρο, επισημαίνεται εποπτικά ο *τοπολογικός της αντίκτυπος*:

α) αφενός στη σχηματοποίηση των θυγατρικών κυττάρων, η οποία ελαττώνει το πλήθος των ακμών τους κατά μία ακμή ανά κύτταρο, μετασχηματίζοντας το εξαγωνικό σχήμα του μητρικού κυττάρου σε δύο πενταγωνικά θυγατρικά και

β) αφετέρου στη σχηματοποίηση των παρακείμενων κυττάρων, των οποίων ο μορφολογικός μετασχηματισμός εξαρτάται άμεσα από το ίδιο αυτό περιστατικό κυτταροδιαίρεσης, εξαιτίας του είδους της γειτνίασης που τα διασυνδέει με τα θυγατρικά, αλλά και που τα συνέδεε με το μητρικό τους κύτταρο. Στη θεωρία κελλωτών δικτύων, αυτή η τοπολογική συνθήκη αντανακλάται στην

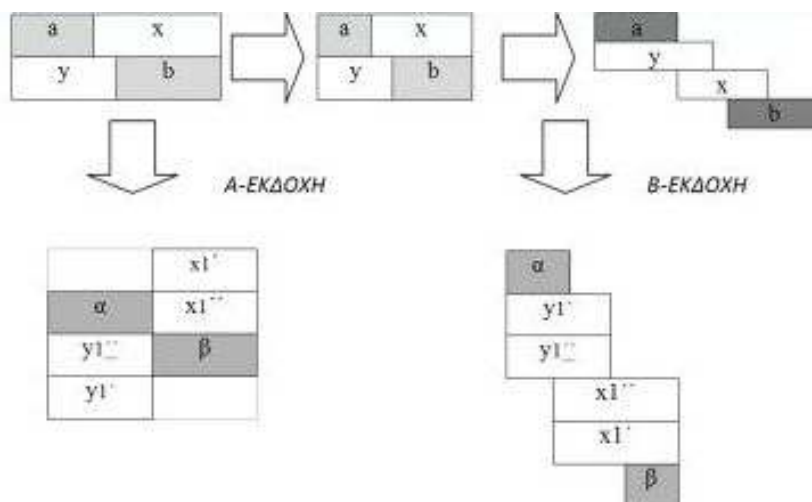


τοπολογική μεταβλητή της *συνδεσιμότητας (connectivity)*, η οποία για να διατηρήσει δικτυωμένα τα κύτταρα που αλληλεπιδρούν βάσει της δεδομένης κυτταροκίνησης, προσαυξάνει κατά μία τον αριθμό των ακμών στα δύο εξαρτημένα κύτταρα, επειδή ένα τέτοιο αποτέλεσμα στην προκειμένη περίπτωση συμβιβάζεται με το νόμο του Euler. Στην πραγματικότητα, η κυτοκίνηση-B (*cytokinesis-B*) αντιπροσωπεύει μια τέτοια μορφή «διατεταγμένης κυτταροδιαίρεσης» (*oriented mitosis*) και γι' αυτό διερευνάται η μορφογόνος δυναμική της κατά τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων που απομονώνονται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (*WJ-MSCs*, *UC-MSCs*).

### 3.6. Οι συνιστώσες του ανισοτροπισμού των κελλωτών διατάξεων συγκλίνουν και αφομοιώνονται από την κυτοκίνηση-B

Στα διαγράμματα που ακολουθούν και τα οποία αναλύονται ξεχωριστά σε τρεις επιμέρους εικόνες ([Εικ. II.5.56.A.], [Εικ. II.5.56.B.] και [Εικ. II.5.56.Γ.]), επιδιώκεται μια εποπτική στοιχειοθέτηση της εξάρτησης του «ανισοτροπισμού προσανατολισμού» [**O-D**] (*orientational disorder*) από το σχήμα των μοναδιαίων κελλιών, στο πλαίσιο της θεώρησης των συναθροίσεων (*aggregations*) στις ιστοκαλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (*WJ-MSCs*, *UC-MSCs*), ως αντιπροσωπευτικές κελλωτές διατάξεις (*cellular solids*).

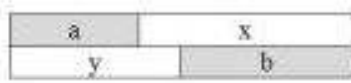
#### 1<sup>η</sup> περίπτωση σχήματος κελλιού:



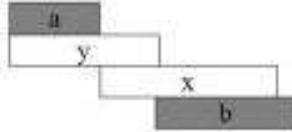
**Εικόνα II.5.56.A.:** Τα σχήματα των κελλιών παριστάνονται επίπεδα, παραθεωρώντας εντελώς την τριδιάστατη εκδοχή της φυσικής μορφολογίας τους επειδή όλα τα θεωρούμενα (τέσσερα) κελλιά συναπαρτίζουν ένα διδιάστατο κελλωτό δίκτυο («κηρήθρας») που απλοποιεί τους σκοπούς της εποπτικής περιγραφής του «ανισοτροπισμού προσανατολισμού». Η Α-εκδοχή πληθυσμιακής επέκτασης της τετράδας κελλιών μέσω διατεταγμένης (κατακόρυφα προσανατολισμένης) κυτταροδιαίρεσης διαφέρει από την αντίστοιχη της Β-εκδοχής, ως προς την αναστροφή κατά  $180^\circ$  του προσανατολισμού της σχετικής διευθέτησης μεταξύ των [x] και [y] κελλιών. Συγχρόνως η διακυτταρική επαφή του [α] με το [γ] και η διακυτταρική επαφή του [β] με το [δ] διατηρούνται κατά την ολοκλήρωση της κυτταροδιαίρεσης του [γ] καθώς και του [x], αντίστοιχα και στις δυο εναλλακτικές εκδοχές προσανατολισμού της σχετικής διευθέτησης της κάθε τετράδας κελλιών.

Παριστάνονται οι δυο εναλλακτικές σχετικές διευθετήσεις μεταξύ [x] και [y] όσον αφορά στον προσανατολισμό τους, για ένα οποιοδήποτε πολυγωνικό σχήμα κελλιού, με εξαίρεση το τριγωνικό. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε το ορθογώνιο σχήμα επειδή αντιπροσωπεύει την ατρακτοειδή μορφολογία στο «Γκρανοκεντρικό [**GC**] μοντέλο» (*GranoCentric Model*), που επανεξετάζει τον κανόνα του Lewis. Κάθε μια από αυτές τις διατάξεις παράγει ένα αντίστοιχο αποτέλεσμα στο μοτίβο της τοπογραφικής διευθέτησης του συνολικού κελλωτού δικτύου, κατά την

κυτταροδιαίρεση που διατάσσει τα θυγατρικά κύτταρα κατά μήκος του  $\{y'y\}$  καρτεσιανού άξονα. Οι δυο τοπογραφικές αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν (ή τροποποιούν) με διαφορετικό μηχανισμό μετασχηματισμών την προϋπάρχουσα διευθέτηση των  $[α]$  και  $[β]$  ως εξής:



Τα  $α, β$  αποκλίνουν το ένα από το άλλο, αργά αλλά σταθερά.  
Τα  $α, β$  δεν εφάπτονται και μέσω τέτοιων μετασχηματισμών η πιθανότητα να γειτνιάσουν ολοένα και μικραίνει.  
Ο ΡΥΘΜΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΠΑΡΑΜΕΝΕΙ Ο ΒΑΣΙΚΟΣ

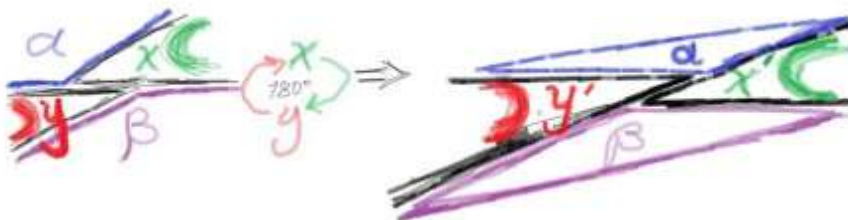


Τα  $α, β$ , αποκλίνουν ολοένα και περισσότερο.  
Τα  $α, β$  δε γειτνιάζουν (δεν εφάπτονται).  
Τα  $α, β$  πρόκειται να διευθετηθούν με τέτοιο τρόπο ώστε η πιθανότητα να γειτνιάσουν ολοένα και λιγοστεύει, κατόπιν μετασχηματισμών «όμοιου» τύπου.  
Ο ΡΥΘΜΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΕΙΝΑΙ ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΟΣ

**Εικόνα II.5.56.Β.:** Τα  $[α]$  και  $[β]$  κελιά μετατοπίζονται έτσι ώστε να απομακρύνονται μεταξύ τους κατά τον  $\{y'y\}$  άξονα καρτεσιανών συντεταγμένων, ως αποτέλεσμα της περιστροφής κατά  $180^\circ$  μεταξύ των  $[x]$  και  $[y]$ . Η απόκλισή τους αυτή όμως δεν εμπεριέχει χαρακτήρα περιστροφικής μετάθεσης του ενός ως προς το άλλο (μεταξύ των  $[α]$  και  $[β]$ ), ούτε ως αποτέλεσμα της περιστροφής κατά  $180^\circ$  μεταξύ των  $[x]$  και  $[y]$ , ούτε ως αποτέλεσμα της κυτταροδιαίρεσης του  $[x]$  και του  $[y]$ .

## 2<sup>η</sup> περίπτωση σχήματος κελιού:

Παριστάνονται οι δυο εναλλακτικές σχετικές διευθετήσεις μεταξύ  $[x]$  και  $[y]$  όσον αφορά στον προσανατολισμό τους, ειδικά για το τριγωνικό σχήμα κελιού. Συγχρόνως με την αναστροφή του προσανατολισμού της μεταξύ τους σχετικής διάταξης κατά  $180^\circ$ , τροποποιούνται και η διακυτταρική επαφή του  $[α]$  με το  $[y]$  και η διακυτταρική επαφή του  $[β]$  με το  $[x]$ , κατά τρόπο που δε διατηρείται η αντίστοιχη «στοίχιση» (ή προσανατολισμός, “ranking” ή “orientation”) η οποία παρατηρείται ευδιάκριτα στην [1<sup>η</sup> περίπτωση σχήματος κελιού]. Εύλογα συνάγεται η πρόγνωση ότι η πιθανότητα διατήρησης της προϋπάρχουσας στοίχισης μεταξύ κελιών τριγωνικού σχήματος, θα περιορίζεται σε συνάρτηση με τη διαδοχή των κυτταροδιαιρέσεων του  $[y]$  καθώς και του  $[x]$ , αντίστοιχα και στις δυο εναλλακτικές εκδοχές προσανατολισμού της σχετικής διευθέτησης της κάθε τετράδας τριγωνικών κελιών.

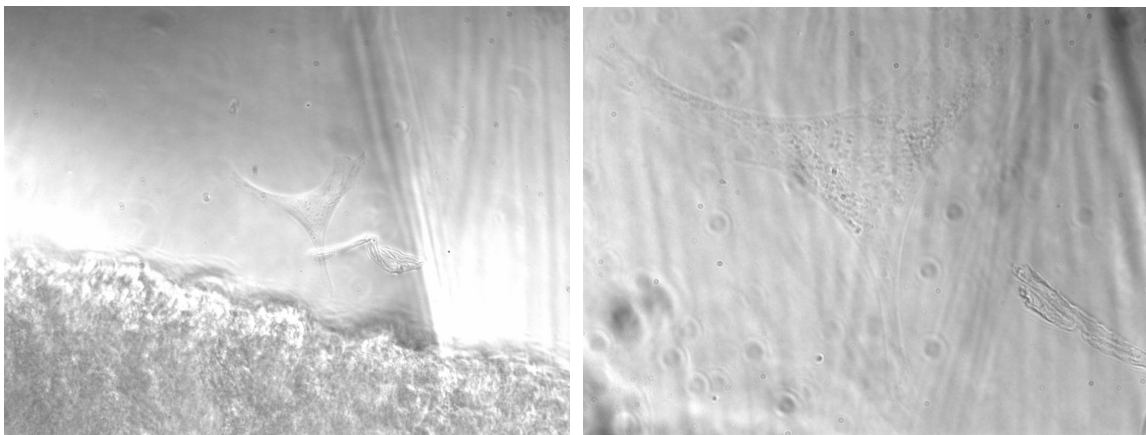


**Εικόνα II.5.56.Γ.:** Στο διάγραμμα της εικόνας αυτής, παριστάνονται το αρχικό και το τελικό στιγμιότυπο της σχετικής μετατόπισης των  $[α]$  και  $[β]$ : το  $[α]$  τείνει να μετατοπιστεί «δεξιότερα» ως προς την αρχική θέση του  $[β]$  (και με «αντίστροφη διατύπωση», το  $[β]$  τείνει να μετατοπιστεί «αριστερότερα» ως προς το  $[α]$ ).

Τα  $[α]$  και  $[β]$  μετατοπίζονται έτσι ώστε να απομακρύνονται μεταξύ τους κατά τον  $\{y'y\}$  άξονα καρτεσιανών συντεταγμένων. Η απόκλισή τους αυτή ωστόσο εμπεριέχει συγχρόνως και το χαρακτήρα της περιστροφικής μετάθεσης του ενός ως προς το άλλο, καθώς συγκλίνουν παράλληλα ως προς τη σχετική μεταξύ τους απόσταση κατά τον  $\{x'x\}$  καρτεσιανό άξονα.

Η διπλή (αποκλίνουσα και περιστροφική) μετατόπιση του [α] και του [β] κελλιού προκύπτει ως άμεση (μονοσταδιακή, μεταβολή σε ένα βήμα μετασχηματισμών) απόρροια της περιστροφής κατά  $180^\circ$  μεταξύ των [x] και [y] κελιών, καθώς και ως συνέπεια της ευνοϊκής διαθεσιμότητας βαθμών ελευθερίας στη σχετική στοίχιση (προσανατολισμό, “*ranking*” ή “*orientation*”) μεταξύ των κελιών της κελλωτής αυτής τετράδας. Η συνισταμένη αυτή μετατόπιση του [α] και του [β] κελλιού, δίνει έμφαση στο μορφογενετικό ρόλο του “*spin*” ή της «ροπής» που υπεισέρχεται στη μεταξύ τους σχέση γειτνίασης, η οποία αντανακλά σε απώτερη ανάλυση και το μορφογενετικό ρόλο της τοπολογικής μεταβλητής της συνδεσιμότητας, που συνοψίζει τη σημασία του σχήματος των μοναδιαίων κελιών για τη διευθέτησή τους σε κελλωτό δίκτυο.

Συνάγεται λοιπόν από τη σχετική μελέτη οργάνωσης των αβιοτικών κελλωτών δικτύων ένα συμπέρασμα που στοιχειοθετεί το ζήτημα της *ιεράρχησης* του μορφογενετικού ρόλου των γεωμετρικών στοιχείων στα κελλωτά στερεά. Αυτό αναφέρεται στην καθοριστική μορφογόνο σημασία που υιοθετούν ειδικά οι μικρότερες ακμές των πολυγωνικών κελιών, πιθανότατα εξαιτίας της ιδιότητάς τους να επικεντρώνουν τις πιθανές διενέξεις και / ή τις συμβολές που προκύπτουν ανάμεσα στις περιοριστικές συνιστώσες που πλαισιώνουν τη σχηματοποιητική (ή παραγωγική) διεργασία που συναρμολογεί το κάθε είδος κελλωτού δικτύου. Το ίδιο αυτό συμπέρασμα επεκτείνεται στις *in vivo* πολυκυτταρικές διευθετήσεις των ιστών καθώς και στις *in vitro* κυτταρικές συναθροίσεις των διδιάστατων κυτταροκαλλιεργειών, όπου οι περιοριστικές συνιστώσες που εμπλέκονται έχουν συχνά γνήσια κυτταροβιολογικό χαρακτήρα. Μια κύρια τέτοια περιοριστική συνιστώσα αναφέρεται στην *in vitro* δυναμική της αντιστρεπτής μετάπτωσης μιας «ακμής» της κυτταρικής επιφάνειας σε «κορυφή» και αντίστροφα και σχετίζεται με τη βιογένεση του ελασματοποδίου (*lamellipodium*).



**Εικόνα II.5.57.:** Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η κύρια μορφογενετική συνιστώσα που υπεισέρχεται στην επέκταση του μεσεγχυματικού πληθυσμού, αντιπροσωπεύεται από την *in vitro* μίτωση («διδιάστατη μίτωση» ή «μίτωση στο επίπεδο», “*coplanar mitosis*”). Στο απλό σχηματικό πρότυπο της [Εικ. II.5.55.] συνοψίζεται περιεκτικά η μορφογόνος δυναμική της, θεωρώντας το εξαγωνικό σχήμα κελλιού ως την περισσότερο προσεγγιστική «μέση μορφολογία» του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου. Στο πλαίσιο της ίδιας αυτής θεώρησης για τη διδιάστατη κυτοκίνηση (ή κυτοκίνηση-B), προβλέπεται ότι είναι εφικτή ακόμη και για μεσεγχυματικά κύτταρα τριγωνικού σχήματος, διότι στην περίπτωση αυτή ο ένας πόλος της μιτωτικής ατράκτου θα τοποθετηθεί «αναγκαστικά» στη μία από τις κορυφές του ισοδύναμου τριγωνικού κελλιού, το οποίο τα αντιπροσωπεύει. Ακόμη και σε μια τέτοια γεωμετρική συνθήκη ακραίας σχηματοποίησης, ο τοπολογικός αντίκτυπος της διδιάστατης μίτωσης θα μοντελοποιηθεί εξίσου καλά με βάση το διάγραμμα της [Εικ. II.5.55.].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ-6<sup>ο</sup>: Θεωρία των «κελλωτών στερεών» (*Cellular Solids Theory*)

### 6.1. Εισαγωγή στην κοινή γεωμετρία του επιθηλιακού και του μεσεγχυματικού φαινότυπου

Η αδρή αρχιτεκτονική οποιουδήποτε επιθηλιακού ιστού, γενικά αντιπροσωπεύεται από μια σχετικώς στερεότυπη κατανομή ομοεπίπεδων κυττάρων, πολυγωνικού σχήματος, που χαρακτηρίζονται όλα από ισχυρό βαθμό διακυτταρικής πρόσφυσης (διασύνδεσης κυττάρου-κυττάρου, *cell-cell conjugation*). Παράγεται ως αποτέλεσμα της συζευγμένης αλληλεπίδρασης μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαμόρφωσης εξειδικευμένων (στενών ή στεγανών) διακυτταρικών επαφών, αντικατοπτρίζοντας την «οριζόντια συνιστώσα» της προσκόλλησης στο υπόστρωμα (*adhesion*), που παρατηρείται στις κυτταροκαλλιέργειες ποικίλων φαινότυπων (και όχι αποκλειστικά του επιθηλιακού). Ωστόσο παραμένει πενιχρή η βαθύτερη γνώση για τη μοριακή υποδομή της επιθηλιακής γεωμετρίας και των εξειδικευμένων χαρακτηριστικών της, όπως είναι για παράδειγμα η «πόλωση στο επίπεδο» (*“planar polarization”, ή “planar polarity”*). Η διαλεύκανση των *in vivo* μορφογενετικών συνιστωσών της ιστογένεσης (*histogenesis*) κρίνεται σκόπιμη ως προπομπός για την ανάλυση των πολυπλοκότερων επιπέδων δόμησης των ζωικών επιθηλίων. Επιπλέον, η πληροφόρηση για την *in vitro* επιθηλιακή (ή «επιθηλιοειδή») μορφογένεση στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες, συμπληρώνει το γνωστικό υπόβαθρο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης με τους άλλους τύπους ιστών που συμμετέχουν στην ιστική αναδόμηση (*“tissue remodelling”*) που συνοδεύει τα αναγεννητικά φαινόμενα. Στην ίδια σκοπιμότητα συγκλίνει η παράλληλη διερεύνηση των τοπολογικών νόμων που υποβόσκουν στη συναρμολόγηση των αβιοτικών «κελλωτών διατάξεων», για τις οποίες θα ακολουθήσει εκτενής ανάλυση στη συνέχεια της παρούσας ενότητας. Η εγκυρότητα του παραλληλισμού μεταξύ της *in vivo* επιθηλιακής μορφογένεσης και της *in vitro* μορφολογικής προσαρμογής του μεσεγχυματικού φαινότυπου, εξαρτάται από την τοπολογική αγκιστεία της μεσεγχυματικής συνάθροισης (*MSC aggregate*) προς τα αβιοτικά κελλωτά δίκτυα (*cellular solids*).

Ο σκοπός της ενότητας αυτής είναι διττός και προσβλέπει, αφενός στην επισήμανση του μορφογόνου ρόλου του μιτωτικού πολλαπλασιασμού στην παραγωγή της *in vivo* ιστοειδικής κυτταρικής γεωμετρίας των επιθηλίων και αφετέρου να στοιχειοθετήσει μια προοπτική επέκτασης (ή γενίκευσης, *extrapolation*) των τοπολογικών μοντέλων που καταστρώθηκαν για τα επιθήλια, ώστε να συμπεριλάβουν και κυτταρικά δίκτυα διαφορετικής φαινοτυπικής ταυτότητας. Οι κυτταρικές συναθροίσεις (*“aggregations”*) που διαμορφώνονται στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες των ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων που απομονώνονται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (**UC-MSCs**), επελέγησαν για αυτό το σκοπό επειδή στο *in vitro* περιβάλλον αναδεικνύουν ενδείξεις ή «κατάλοιπα» μορφογενετικής χάραξης σχεδίου (*in vitro pattern formation*), που απορρέουν από τις σύνθετες προσαρμοστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γεωμετρικών, των τοπολογικών και των εμβιομηχανικών (*biomechanical*) ιδιοτήτων τους.

#### 6.1.α. Η μορφογένεση του *in vivo* επιθηλιακού φαινότυπου

Η μορφογένεση των επιθηλίων αποτελεί για την ανάπτυξη των μεταζώων, αναντικατάστατη συνιστώσα στην ιστογένεση και οργανογένεση, καθώς επίσης και στις ποικίλες παραλλαγές της δευτερογενούς ανάπτυξης που πλαισιώνει σποραδικά ή συστηματικά την οντογένεσή τους. Στην ανατομική οργάνωση όλων των επιθηλίων συμμετέχουν απαρέγκλιτα τρεις αρχιτεκτονικές συνιστώσες, που διασφαλίζουν και τα λειτουργικά τους πλεονεκτήματα:

α] η κορυφο-θασο-πλευρική πόλωση (*“apical-basal polarization”*), σε επίπεδο μονήρους κυττάρου καθώς και σε επίπεδο ιστού (*“epithelial sheet”*),

β] η διάπλαση και εξειδίκευση των διακυτταρικών επαφών (*“cell-cell-junctions”*),

γ] η διαμόρφωση ενός παρακυτταρικού φραγμού διαπερατότητας / διάχυσης (*“paracellular permeability / diffusion barrier”*), που αφορίζει δυο διακριτά ανατομικά διαμερίσματα εκατέρωθεν του επιθηλιακού ελάσματος (*“epithelial sheet”*).

Ωστόσο, οι αντίστοιχοι *αβιοτικοί τοπολογικοί περιορισμοί (topological constraints)* που συνοδεύουν τις βιολογικές συνιστώσες της επιθηλιακής μορφογένεσης, σκιαγραφούνται συνήθως ακροθιγώς και κατ’ επέκταση παραθεωρούνται.

Παρεμπιπτόντως, στην τέχνη *origami* προσφέρεται ένα λιτό αλλά και ισχυρό εποπτικό μοντέλο αισθητοποίησης του τοπολογικού υποβάθρου της επιθηλιακής μορφογένεσης:

Ένας πεπερασμένος αριθμός απλών κανόνων αναδίπλωσης, είναι ικανός να παράγει ένα απεριόριστο πλήθος ξεχωριστών διαμορφώσεων, μολονότι απορρέουν όλες από το ίδιο επίπεδο έλασμα χαρτιού (*planar sheet*), χωρίς να αφαιρεθεί από αυτό ή να προστεθεί σε αυτό, καινούργιο χάρτινο υλικό. Επιπλέον, η ανεξάντλητη ποικιλότητα των κατασκευών αυτών δεν εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης, ή αλλιώς δεν απορρέει από τη διακύμανση των διαστάσεων της. Αυτή η *«μη εξάρτηση από διαστάσεις» (“scale-invariance”, “size-invariance”)*, αποτελεί μια *τοπολογική ιδιότητα* επειδή συνοδεύει *αναλλοίωτη*, όλες τις επάλληλες αναδιπλώσεις του αρχικού χάρτινου φύλλου. Με άλλα λόγια οι μετασχηματισμοί που αυξάνουν σταδιακά τη μορφολογική πολυπλοκότητα της χάρτινης μάζας δε συμμεταβάλλουν παράλληλα και την τιμή που η τοπολογική ιδιότητα έλαβε για το αρχικό, μη διπλωμένο χάρτινο έλασμα (Huzita and Scimemi, 1989, as cited in Nagpal, 2001, 2002).

Αυτή η ίδια τοπολογική ιδιότητα της *«μη εξάρτησης από διαστάσεις»* πλαισιώνει επίσης και τη θεμελιώδη αναπτυξιακή διεργασία της *«χάραξης σχεδίου» (ή διαμόρφωσης προτύπου, προτύπωσης σχεδίου, pattern formation)*. Η μορφογόνος αυτή διεργασία υπεισέρχεται σε όλα τα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης, σε όλα τα οντογενετικά στάδια και σε όλες τις κλίμακες διαστάσεων, με την έννοια ότι μπορεί να παράγει σε διαφορετικά μεγέθη, το ίδιο πρότυπο / μοτίβο (*pattern*). Κατά συνέπεια η προτύπωση σχεδίου μπορεί να καταστρώνεται *απαράλλακτη*, πρακτικώς ανεξάρτητα από το πλήθος των συμβαλλόμενων κυττάρων, με μόνη προϋπόθεση αυτά να συναπαρτίζουν μια στενά αλληλεπιδραστική ομάδα που χαρακτηρίζεται ως *«μορφογενετικό πεδίο» (morphogenetic field)* όταν το προσχέδιο αφορά ένα όργανο ή *«εμβρυακό πεδίο» (embryonic field)*, όταν το προσχέδιο αφορά ολόκληρο τον οργανισμό. Η εγκαθίδρυση ενός πεδίου και η χάραξη σχεδίου είναι πρώιμες αναπτυξιακές διεργασίες (κυρίως κατά τη γαστρίδωση) που συντελούνται κατά την περίοδο του *καθορισμού (determination)* των κυττάρων, όταν είναι ακόμη μορφολογικώς όμοια, αλλά διαφορετικά όσον αφορά τη σύστασή τους σε *«μορφογενετικούς καθοριστές» (morphogenetic determinants)* και ανταλλάσσουν μεταξύ τους πληροφορίες μέσω των οποίων δεσμεύονται για τον προκαθορισμό του *«πεπρωμένου» (prospective fate)* καθενός από αυτά. Κατά το σταδιακό καθορισμό (*determination*) που υφίστανται τα βλαστομερίδια (*blastomeres*) και τα θυγαρικά τους κύτταρα συναποφασίζεται η μορφή και καταστρώνεται με άγνωστο ακόμη μηχανισμό ο *«χάρτης»* της ιεραρχημένης διάπλασης του επικείμενου οργάνου. Πάντως η χάραξη σχεδίου ενεργοποιεί ένα δίκτυο *«τοπικών πληροφοριών» (positional information)*, μέσω των οποίων ρυθμίζεται και ελέγχεται η τοπική και η χρονική διαφοροποίηση (*spatio-temporal differentiation*) καθενός από τα κύτταρα του πεδίου, ανάλογα με την θέση (ανατομικές συντεταγμένες) που φυσιολογικά κατέχει και με την αναπτυξιακή προϋστορία που το εγκατέστησε σε αυτή. Οι τοπικές αυτές πληροφορίες (*positional information*) μπορούν να παρέχονται με τη μορφή:

α] διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων (*cell-cell interactions*), μέσω διαμεμβρανικών μορίων κυτταρικής πρόσφυσης (*cell adhesion molecules, CAMs*)

β] επαγωγής (*induction*), κατά την οποία ένας καθοδηγητικός (*inductive*) ιστός μεταβιβάζει εντολή σε κάποιον άλλο, διαφορετικό αλλά γειτονικό (αποκρινόμενο, *responsive*) ιστό να εγκαινιάσει την παραγωγή ενός οργάνου.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη αρχικώς επισημαίνονται οι τοπολογικές ιδιότητες που υπεισέρχονται στη μορφογένεση των επιθηλιακών ιστών. Περαιτέρω επιδιώκεται μια συγκριτική θεώρηση της *in vivo* μορφογένεσης των επιθηλίων, με τις αντίστοιχες *in vitro* διαδικασίες που σχηματοποιούν το «επιθηλιόμορφο» μονοκυτταρικό ταπήτιο (*monolayer*) που παράγει η πληθυσμιακή επέκταση (*population expansion*) του μεσεγχυματικού φαινότυπου στη διδιάστατη ιστοκαλλιέργεια. Με βάση παρατηρήσεις φωτονικής μικροσκοπίας σε καλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων που απομονώνονται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο, συλλέχθηκαν μορφομετρικά δεδομένα ενδεικτικά της μορφογενετικής επίδρασης που ασκεί η *in vitro* κυτταροδιαίρεση στη διαμόρφωση της πληθυσμιακής πυκνότητας.

### 6.1.b. Η μορφογένεση του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου

Η σύνθετη αυτή έννοια της πληθυσμιακής πυκνότητας σκιαγραφεί το καθεστώς επανατροφοδότησης (*feedback*) που διέπει τη συνάθροιση των μεσεγχυματικών πληθυσμών (*MSC aggregations*) και συνοψίζει την *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ κυτταρικής συνάθροισης (*“aggregation”*) και κυτταρικής σχηματοποίησης (*“cell shape plasticity”*). Η προσαρμοστική σύζευξη μεταξύ συνάθροισης και σχηματοποίησης, αντανakλά έναν αξιοσημείωτο βαθμό χειραφέτησης από το γενετικό προγραμματισμό και αντισταθμίζει την προφανή απουσία μορφογενετικού πεδίου κατά τον «εμβολιασμό» (*“seeding”*) των μεσεγχυματικών κυττάρων και κατά συνέπεια την έλλειψη προϋπάρχουσας τοπικής πληροφορίας στο υπόστρωμα του τρυβλίου καλλιέργειας. Η χαρακτηριστική ταξινότηση του μονοκυτταρικού ταπήτιου σε παράλληλους στοίχους (*MSC aggregates*), αναδεικνύει τον αναπληρωτικό ρόλο της γεωμετρικής / τοπολογικής αλληλεπίδρασης, έναντι της έκπτωσης της βιοτικής συνιστώσας. Η καθολικότητα του επανατροφοδοτικού αυτού καθεστώτος, το οποίο διέπει επίσης και τη σχηματοποίηση των αβιοτικών «κελλωτών δικτύων» απορρέει από αυτό ακριβώς το γεωμετρικό / τοπολογικό υπόβαθρο της αλληλεπίδρασης του μοναδιαίου κελιού με το συνολικό κελλοφόρο δίκτυο.

### 6.2. Η ημιποσοτική εκδοχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ μονήρους / ατομικής κυτταρικής γεωμετρίας (*polygonal cell-packing pattern*) και ιστικής μορφογένεσης (*planar geometry pattern*).

Αναφέρονται χαρακτηριστικά τρία παραδείγματα που υποδεικνύουν ότι οι *μορφολογικοί μετασχηματισμοί* (*morphological transformations*) στο κυτταρικό επίπεδο συμπορεύονται παράλληλα ή συγγραμμικά με αντίστοιχες μορφογενετικές μεταβολές που ολοκληρώνονται σε επίπεδο ιστού (*tissue-level morphogenesis*), κατά την *in vivo* επιθηλιακή μορφογένεση (Baena-Lopez et al., 2005; Gong et al., 2004; Lecuit and Lenne, 2007; O’Brochta and Bryant, 1985; Saburi et al., 2008):

- α] η μαζική και ενορχηστρωμένη διαμερισματοποίηση σώσσωμου του επιθηλιακού ελάσματος σε κορυφαία και βασοπλευρική όψη (*coplanar or coordinated apical constriction*),
- β] η κατευθυνόμενη (προσανατολισμένη ή πολωμένη) κυτταροδιαίρεση (*oriented cell division*),
- γ] ο τοπικός (ή εντοπισμένος) διαφορικός έλεγχος του πολλαπλασιασμού (*localized differential control of cellular proliferation*)

## 6.2.α. Η διδιάστατη πόλωση (*planar polarity*) του *in vivo* επιθηλιακού φαινότυπου

Η μακροσκοπική και η μοριακή εξειδίκευση που εκδηλώνει η επιθηλιακή αρχιτεκτονική σε συνάρτηση με τις διαφορετικές φυλογενετικές βαθμίδες στα μετάρζωα, είναι εφικτό να παραθεωρηθεί, προκειμένου να προτυποποιηθεί (ή μοντελοποιηθεί) ένας αρκούντως αντιπροσωπευτικός επιθηλιακός φαινότυπος. Η πιο ενδεδειγμένη εκδοχή του, παρατηρείται στα απλά κυλινδρικά επιθήλια (*simple columnar epithelia*) που έχουν μελετηθεί επισταμένως στη Δροσόφιλα, επειδή στα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά συγκλίνουν:

α) *εγγενείς επιθηλιακές ιδιότητες (intrinsic properties)*, όπως είναι π.χ. η διαφορική εξειδίκευση της πλασματικής μεμβράνης σε *κορυφαίο (apical domain)* και *βασοπλευρικό διαμέρισμα (baso-lateral domain)* (Terpass et al., 2001), κλπ, καθώς και

β) *εκλυόμενες επιθηλιακές ιδιότητες (emergent properties)*, όπως είναι π.χ. η επίπεδη γεωμετρία που οριοθετεί την πολικότητα ολόκληρου του επιθηλιακού ελάσματος (*epithelial planar pattern geometry*), ή η οριοθέτηση (*establishment*) ενός μέσου εμβαδού για το μοναδιαίο κύτταρο (*average cell area*) που συνθέτει τα διαγράμματα Voronoi κατά τη μοντελοποίηση (υπολογιστική απεικόνιση) των επιθηλίων, κλπ.

Συνεπώς η δομική σκοπιά της κυτταρικής πόλωσης που χαρακτηρίζει γενικότερα τον επιθηλιακό φαινότυπο, καθιερώνει και το λειτουργικό του χαρακτήρα, ο οποίος περιλαμβάνει τη διαμόρφωση του *παρακυτταρικού φραγμού διαπερατότητας ("paracellular permeability barrier")*, την εξειδίκευση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (συστατικών), την *κατευθυνόμενη μεταφορά (έκκριση και απορρόφηση, "directional transport")*, κλπ. Το ιστοειδικό χαρακτηριστικό από το οποίο απορρέουν όλες αυτές οι ιδιότητες, συνίσταται στην ικανότητα εκτενούς *συστοίχισης ("ranking")* των παρακείμενων κυττάρων, ως προς καθένα από αυτά τα διακριτά διαμερίσματα της κυτταρικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα το επιθηλιακό έλασμα να εφοδιάζεται με μια αθροιστική («σφαιρική») ιδιότητα τοπικής (ανατομικής) πολικότητας, σε αντιπαραβολή προς τις ιδιότητες των παρακείμενων ιστών. Η υποκυτταρική δομή που διαφοροποιεί την κυτταρική επιφάνεια στα επιμέρους διαμερίσματά της, την περιβάλλει ολόκληρη κυκλοτερώς ως ζώνη ή δακτύλιος διακυτταρικής πρόσφυσης και ονομάζεται **zonula adherens (ZA)** (Knust and Bossinger, 2002).

Λεπτομερέστερη ανάλυση αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα της δομής, η οποία αφορίζει την *κορυφαία επιφάνεια (apical surface)* μέσω της επονομαζόμενης *συνοριακής ζώνης (marginal zone)*, στα όρια της οποίας κατανέμονται περιμετρικώς όλες οι διακυτταρικές επαφές, σε ένα ύψος τοποθέτησης, υπερκείμενης ως προς τη zonula adherens (ZA) (Terpass et al., 2001). Στη Δροσόφιλα, οι **διαφραγματοσύνδεσμοι (septate junctions, SJs)** κείνται σε μια στάθμη, υποκείμενη ως προς τη zonula adherens (ZA), συναπαρτίζοντας έναν παρακυτταρικό φραγμό διαβατότητας (*"paracellular permeability barrier"*), λειτουργικώς ανάλογο προς τον μεσοκυττάριο αποκλεισμό διέλευσης μορίων που επιβάλλουν οι **στενοσύνδεσμοι (tight junctions, TJs)**, σφραγίζοντας μεταξύ τους τα κύτταρα ενός επιθηλίου (*occluding junctions, zonulae occludens, ZO*) στα σπονδυλόζωα (Bilder, 2001; Genova and Fehon, 2003; Gibson and Perrimon, 2003).

Οι δυο κύριες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που βρέθηκαν να είναι σημαντικές για την ακεραιότητα των στενοσυνδέσμων είναι η *οκλουδίνη (occludin)* και η *κλωδίνη (claudin)*. Το μακρύ καρβοξυτελικό άκρο της οκλουδίνης, συνδέεται με μια πρωτεΐνη που ανήκει σε μια μεγάλη ομάδα ενδοκυττάρων πρωτεϊνών (*ZO-1, ZO-2 και ZO-3*), οι οποίες τελικά συνδέονται μέσω άλλων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και με *ινίδια ακτίνης* (Μαργαρίτης και συν., 2004, Βιολ. Κυττ.782-785). Κατά συνέπεια η διατήρηση της θέσης (εντοπισμός) του στενοσυνδέσμου στην κυτταρική επιφάνεια, πιθανώς υποβοηθείται από κυτταροσκελετικά στοιχεία, μέσω αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν το σύνδεσμο μεταξύ των μορίων της *οκλουδίνης*.

Στη Δροσόφιλα, οι ZO – πρωτεΐνες περιλαμβάνουν την *DE-cadherin*, καθώς και τις scaffold proteins *Armadillo* (το ορθόλογο της *β- catenin* στη Δροσόφιλα), την *Canoe* (ομόλογη της *Afadin* των θηλαστικών) και την *α- catenin* στα θηλαστικά (Lechler and Fuchs, 2005). Οι διαφραγματοσύνδεσμοι



(septate junctions, SJs) περιλαμβάνουν τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη *Neurexin-IV* και την *Fasciclin-III*, καθώς και τις scaffold proteins *Scribble*, *Disks-Large*, *Coracle*, και *Lethal-giant-larvae (Lgl)* (Bilder, 2001; Gibson and Perrimon, 2003; Knust and Bossinger, 2002; Tepass et al., 2001).

Επιπρόσθετες πρωτεΐνες των διαφραγματοσυνδέσμων κωδικοποιούνται από γονίδια όπως τα εξής: *contactin*, *neuroglian*, *gliotactin*, *sinuous*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase*, *lachesin*, and *megatrachea*, *varicose* (Banerjee et al., 2006 ; Wu et al., 2007). Αρκετές από τις SJ – πρωτεΐνες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην πλευρο-βασο-κορυφαία πολικότητα (apical/basal polarity). Χαρακτηριστικά, οι *Scribble*, *Disks-Large*, και *Lethal-giant-larvae* είναι προϊόντα ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μεταλλαγμένα έντομα που στερούνται αυτών των πρωτεϊνών, χάνουν τους διαφραγματοσυνδέσμους και επιπλέον εκδηλώνουν όγκους στον επιθηλιακό ιστό. Συνεπώς αντιπροσωπεύουν πιθανούς συνδετικούς κρίκους μεταξύ της φυσιολογικής ρύθμισης του πολλαπλασιασμού στα επιθηλιακά κύτταρα και της κυτταρικής σχηματοποίησης, μέσω επανατροφοδότησης ενδοκυττάρων σημάτων που προέρχονται από τους διαφραγματοσυνδέσμους (Hariharan and Bilder, 2006).

Η εξάρτηση των ποικίλων πτυχών της μορφογένεσης από πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το ευρύτερο φάσμα των μορίων πρόσφυσης (προσκόλλησης, π.χ. E-cadherin και Canoe), μεσολαβείται ειδικότερα από τους μηχανισμούς προσανατολισμού της μιτωτικής ατράκτου (mitotic spindle orientation) (Le Borgne et al., 2002; Speicher et al., 2008). Στο ίδιο μορφογενετικό μοτίβο κινούνται παραδοσιακά οι *ιντεγκρίνες* για τα θηλαστικά και για τη Δροσόφιλα (Fernandez-Minan et al., 2007; Lechler and Fuchs, 2005), τόσο σε *in vivo* όσο και στις *in vitro* συνθήκες των κυτταροκαλλιεργειών, στις οποίες αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με τις πρωτεΐνες *microtubule plus-end tracking proteins APC* και *EB-1* (Draviam et al., 2006; Green et al., 2005; Lu et al., 2001; Rogers et al., 2002; Yamashita et al., 2003). Στο μοριακό υπόβαθρο της μορφογενετικής διευθέτησης της μιτωτικής ατράκτου στη νωτιαία επιβλάστη στο **zebrafish**, συγκαταλέγονται εξειδικευμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταλλαγμένο φαινότυπο που περιγράφεται με τον όρο (*planar cell polarity, PCP*) και οι οποίες κατ' εξαίρεση του κανόνα, επιβάλλουν την κυτταροδιαίρεση κατά τον βραχύ άξονα ασυμμετρίας των *επιθηλιόμορφων κυττάρων (epithelial-like cells of the epiblast)* (Gong et al., 2004).

#### **6.2.b. Τα ειδοειδικά και ιστοειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά δεν υποβαθμίζουν τη δυνατότητα της υπολογιστικής αναπαράστασης της διδιάστατης πόλωσης (*planar polarity*) του *in vivo* επιθηλιακού φαινότυπου**

Η *προτυποποίηση (μοντελοποίηση)* της κυτταρικής γεωμετρίας στα απλά επιθήλια διευκολύνεται στις περιπτώσεις που μπορεί να παραλληλισθεί με εκείνη που περιγράφει τα μοναδιαία κελιά που συναπαρτίζουν ένα «κελλωτό δίκτυο» (*cellular solid*). Τη συνθήκη αυτή ικανοποιούν τα επιθήλια όταν –υπό ορισμένες συνθήκες- περιορίζουν τη συνολική μηχανική συμπεριφορά τους στην περιμετρική ζώνη των διακυτταρικών επαφών, με συνέπεια ο μεγαλύτερος αντίκτυπος των μηχανικών μεταβολών να συσσωρεύεται εκλεκτικά στην κορυφαία επιφάνεια (*apical surface*) των κυττάρων (Farhadifar et al., 2007). Μολονότι τέτοιες *in vivo* συνθήκες ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών επιθηλίων, δεν αλλοιώνουν ωστόσο ριζικά το διδιάστατο μοτίβο (*pattern*) το οποίο αποτυπώνουν στα ιστολογικά παρασκευάσματα, οι τομές που εφαρμόζονται παράλληλα στο επιθηλιακό έλασμα. Με άλλα λόγια η επίπεδη προβολική απεικόνιση των επιθηλίων, γενικά τείνει να αναπαραστήσει το οικείο στερεότυπο μοτίβο (*pattern*) που αντιπροσωπεύει τη διδιάστατη προβολή μιας μάζας φυσαλίδων σάπωνα.

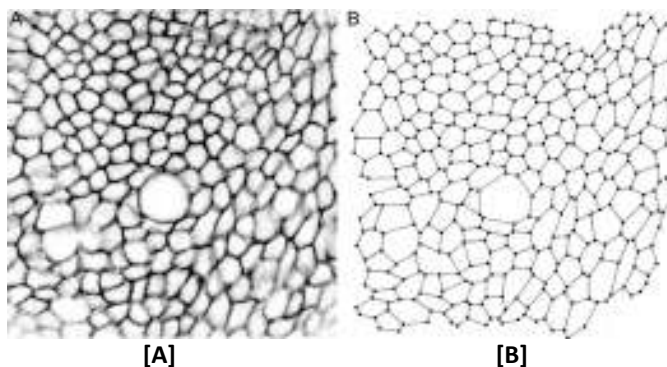
Ο *εμβρυακός δίσκος (wing imaginal disk epithelium)* του φτερού στη Δροσόφιλα, αντιπροσωπεύεται από ένα ψευδοπολύστοιβο επιθήλιο, του οποίου η τριδιάστατη αρχιτεκτονική παρεκκλίνει σημαντικά από την αντίστοιχη, της οποίας η γεωμετρική προβολή συμπίπτει με το διδιάστατο μοτίβο της εικόνας. Επειδή οι βασοπλευρικές επιφάνειες (*baso-lateral surface*) που οριοθετούνται κάτω από το επίπεδο των διαφραγματοσυνδέσμων (*septate junctions, SJs*) δεν

προσφύονται ισχυρά μεταξύ τους, επιφέρουν σημαντική διατάραξη της κυτταρικής διευθέτησης, σε συνδυασμό με τις κατακόρυφες (*along the apical–basal axis*) παλινδρομικές μετατοπίσεις των ευμεγεθών πυρήνων, οι οποίες εξαρτώνται από τον κυτταρικό κύκλο.

Κατά συνέπεια, η μορφολογία κάθε διαιρούμενου κυττάρου γίνεται σφαιροειδής εξαιτίας του εντοπισμού του πυρήνα, ακριβώς κάτω από την κορυφαία επιφάνειά του (*apical surface*), με σημαντικές επιπτώσεις στον αριθμό και στην ισχύ των διακυτταρικών επαφών με τους άμεσους γείτονές του και κατ' επέκταση με παραμορφωτικό αντίκτυπο στην πολυγωνική σχηματοποίηση των κορυφαίων επιφανειών των γειτονικών κυττάρων. Παρόλη όμως την επίδραση εφελκυσμού και σύνθλιψης, που το διαιρούμενο κύτταρο ασκεί στα παρακείμενα, δεν επηρεάζει στον ίδιο βαθμό όλες τις προϋπάρχουσες διακυτταρικές επαφές, με συνέπεια να αποσοβείται (να αμβλύνεται) η *κυτταρική αναδιάταξη (cell rearrangement)* της αρχικής τοπικής διευθέτησης.

Εν κατακλείδι, ο μηχανιστικός αντίκτυπος της *in vivo* κυτταροδιαίρεσης, μολοντί δεν είναι αμελητέος, δεν αλλοιώνει εντέλει την πολυγωνική γεωμετρία της κορυφαίας επιφάνειας (*apical surface*) του επιθηλίου, ακριβώς επειδή εκλύει μια αντισταθμιστική (μορφογόνο) απόκριση σε επίπεδο ιστού, στην οποία συμβάλλουν τα διασυνδεδεμένα κύτταρα σε συνάρτηση προς το είδος και την ισχύ της ιστοειδικής διακυτταρικής πρόσφυσης (Gibson et al., 2006).

Σε παρόμοια συμπεράσματα συγκλίνουν οι μελέτες των γεωμετρικών επιπτώσεων της κυτταροδιαίρεσης στην αρχιτεκτονική των φυτικών επιθηλίων, στα οποία η κυτταρική αναπαράσταση με τη μορφή άκαμπτων πολυγωνικών πρισμάτων, επιβεβαιώνει τον κοινό και κατ' επέκταση οικουμενικό ρόλο της επίπεδης γεωμετρίας στην κυτταρική σχηματοποίηση και στην ιστοική μορφογένεση (Lewis, 1928).



**Εικόνα 11.6.58.:** Στην αριστερή εικόνα **[A]** απεικονίζεται η επιθηλιακή τοπολογία στο επίπεδο των διακυτταρικών επαφών (*cell–cell junctions*). Τα κυτταρικά περιγράμματα στο ψευδοπολύστοιβο επιθήλιο εμβρυικού δίσκου από φτερό δροσόφιλας (*apical cross section through the pseudostratified Drosophila wing disk epithelium*), είναι σημασμένα με αντισώματα για τό **(SJ)** συστατικό, **Disks Large**. Η δεξιά εικόνα **[B]** παριστάνει ένα διάγραμμα **Voronoi**, το οποίο υπολογίστηκε για την απεικόνιση της ομοεπίπεδης γεωμετρικής διευθέτησης των επιθηλιακών κυττάρων της ιστολογικής τομής. Οι συχνότητες της παρουσίας μη εξαγωνικών κελλιών (*nonhexagonal cells*) υπερτερούν χαρακτηριστικά έναντι των αντίστοιχων για τα κανονικά εξαγωνικά. Αυτή η μη ευνοϊκή στατιστική δυσαναλογία εναντίον των κανονικών εξαγωνικών κελλιών (*hexagonal cells*) υποβόσκει στις περισσότερες περιπτώσεις **ανισοτροπισμού (anisotropy)**.

### 6.3. Εισαγωγή στην *in vivo* και *in vitro* κυτταρική τοπολογία

Η *κυτταρική τοπολογία (cellular topology)* αναφέρεται στην *κυτταρική συνδεσιμότητα (connectivity)*, όπως αυτή παρατηρείται γενικά στους ιστούς των πολυκύτταρων οργανισμών. Μια πιο εποπτική όμως αισθητοποίηση της τοπολογικής αυτής ιδιότητας, προκύπτει αν φανταστούμε ότι διατηρούνται αμετάβλητες όλες οι γεωμετρικές σχέσεις γειτνίασης μεταξύ των κυττάρων ενός κοινού επιθηλιακού ιστού, ο οποίος υποβάλλεται σε ένα πεδίο διδιάστατης παραμόρφωσης εφελκυσμού ή σύνθλιψης (*extension / compression*).

Οι επιμέρους αλλαγές σχήματος, καθενός ξεχωριστού κυττάρου, συντελούνται μονάχα στο μορφολογικό επίπεδο και μεταβιβάζονται σε όλα τα κύτταρα του επιθηλίου, χωρίς όμως να τροποποιούν κανένα τοπικό καθεστώς γειτνίασης και κατ' επέκταση χωρίς να μεταβάλλουν την επίπεδη πολυγωνική γεωμετρία που συνέχει ολόκληρο το επιθηλιακό έλασμα. Ωστόσο, διαφορετικές διαδικασίες όπως είναι η πλήρης ή μερική αποσύνδεση μεταξύ γειτονικών κυττάρων, η εξάλειψη (αφαίρεση) ή η προσάρτηση (προσθήκη) κυττάρου και η «συγκλίνουσα διάταση» (*convergent extension*) κατά την οποία καταργούνται προϋπάρχουσες και / ή ενσωματώνονται νέες διακυτταρικές επαφές, αλλοιώνουν την τιμή της επιθηλιακής τοπολογίας (Zallen and Zallen, 2004).

Τέτοιες διαδικασίες, που υπεισέρχονται φυσιολογικά στην ιστική ομοιοστασία και μεταβάλλουν συστηματικά την τοπολογία του επιθηλιακού ιστού, είναι :

α] η κυτταρική διαίρεση (*cell division*),

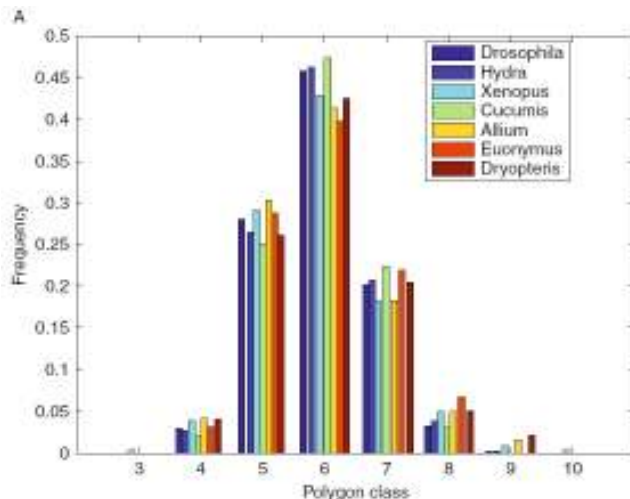
β] η κυτταρική αναδιάταξη (*cell rearrangement*) και

γ] η «απαλοιφή ή εξάλειψη κυττάρου» (*cell disappearance*), η οποία είναι το τοπολογικό ισοδύναμο της κυτταρικής απόπτωσης (Dubertret and Rivier, 1997).

Επιπλέον, στα πλαίσια της *in vivo* ανάπτυξης, οι τοπολογικές ιδιότητες αλληλεπιδρούν μέσω στερεότυπων κανόνων με τις διάφορες γεωμετρικές μεταβλητές, όπως είναι το μέσο εμβαδόν για το μοναδιαίο κύτταρο (*average cell area*) (Rivier and Lissowski, 1982).

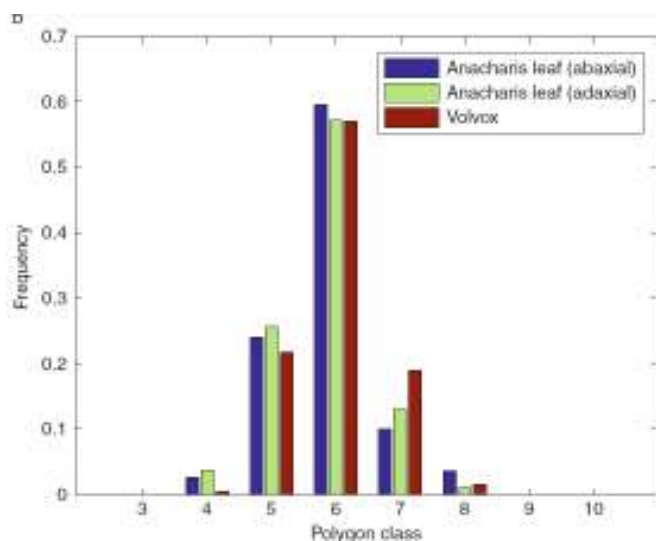
Οι πληθυσμιακές κατανομές των πολυγωνικών κελιών, που καταστρώνονται σε συνάρτηση προς την τοπολογική ιδιότητα της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*) στα διδιάστατα κελλωτά δίκτυα («κρηθήρες») και αντιπροσωπεύουν τα μοναδιαία πρισματικά κύτταρα της φυτικής επιδερμίδας των **Cucumbraceae**, καθώς και τα επιθηλιακά κύτταρα του εμβρυακού δίσκου της πτέρυγας στη Δροσόφιλα (*wing imaginal disk epithelium*), είναι παρόμοιες και συγκλίνουν σε μια κοινή («μέση») πληθυσμιακή συχνότητα για τα εξαγωνικά κελιά που κυμαίνεται σε ποσοστό  **$N = 45 \%$**  (Gibson et al., 2006; Korn and Spalding, 1973; Zallen and Zallen, 2004; Lewis, 1928). Σε παρόμοιες κατανομές συγκλίνουν μελέτες στην επιδερμίδα του κρεμμυδιού, καθώς και σε αντιπροσώπους των περικοφύτων και των κνιδόζων (Gibson et al., 2006; Korn and Spalding, 1973). Τα δεδομένα αυτά, συνηγορούν για έναν «τοπολογικό συντηρητισμό» (*topological conservation*) που εκφράζεται με μια «συνδεσιμότητα (*default state connectivity*) υποβάθρου», η οποία λαμβάνει τη μέση τιμή  **$n = 3$**  η οποία αντιστοιχεί στη γεωμετρία των εξαγωνικών κελιών και αντιπροσωπεύεται στην πλειονότητα των επιθηλίων, χωρίς όμως παραλλήλως να επιβάλλει και μια δυσανάλογη (ασύμμετρη) υπεροχή της πληθυσμιακής τους συχνότητας, μια συνθήκη που θα προκαλούσε απόκλιση προς τιμές, μεγαλύτερες της παρατηρούμενης «μέσης τιμής»  **$N = 0,45$** .

Πάντως λιγοστές -αν και όχι σπάνιες- περιπτώσεις επιθηλίων που χαρακτηρίζονται από ομοιόμορφο *πολλαπλασιασμό* και *αμελητέα κυτταρική αναδιάταξη* (*cell rearrangement*), υπερβαίνουν αξιοσημείωτα αυτή τη «μέση πληθυσμιακή συχνότητα», με το ποσοστό των εξαγωνικών κελιών να προσεγγίζει την τιμή  **$N = 60 \%$**  για το φυτικό είδος **Anacharis [Εικ. II.6.60.]** (Gibson et al., 2006; Korn and Spalding, 1973; Lewis, 1928). Εικάζεται συσχέτιση αυτής της σποραδικής παρέκκλισης ως προς τη «μέση πληθυσμιακή συχνότητα» των εξαγωνικών κελιών, με πιθανές ποιοτικές διαφορές στο μηχανισμό της κυτταροδιαίρεσης (Cowan and Morris, 1988).



**Εικόνα II.6.59.:** Ομαδοποιημένες κατανομές πολυγωνικών κελιών από διαφορετικά ζωικά επιθήλια και από ποικίλες φυτικές επιδερμίδες. Τα επιλεγμένα είδη είναι αντιπροσωπευτικά των αντίστοιχων βασιλείων. Με τον όρο πολυγωνική κλάση υποδηλώνεται η γεωμετρική προβολή στο Ευκλείδειο επίπεδο των αντίστοιχων πολυεδρικών στερεοδιατάξεων, τα οποία υπολογίστηκαν με σύγχρονους αλγόριθμους για την αναπαράσταση της πραγματικής κυτταρικής μορφολογίας. Οι πληθυσμιακές συχνότητες, που μετρήθηκαν για τα πολύγωνα που είναι παραταγμένα βάσει του πλήθους των ακμών τους, υποδηλώνουν πως η εξέλιξη ευνόησε την επικράτηση του εξαγωνικού περιγράμματος έναντι του πενταγωνικού (Gibson et al., 2006)

Αυτές οι παραλλαγές μπορούν να έχουν υπόβαθρο *ειδο-ειδικών διαφοροποιήσεων*, όπως στην περίπτωση του φυτού **Anacharis**, ή να οφείλονται σε *σταδιο-ειδικές διαφοροποιήσεις* του ίδιου βασικού μηχανισμού, όπως στην περίπτωση της οντογένεσης του φτερού στη Δροσόφιλα. Στο στάδιο της *νύμφης (pupal wing morphogenesis)*, τα κύτταρα του εμβρυακού δίσκου (*wing imaginal disk epithelium*) υποβάλλονται σε εκτεταμένες αλλαγές του τοπολογικού προτύπου της μεταξύ τους γειτνίασης και καταλήγουν στη σχηματοποίηση εξαγωνικής γεωμετρίας, σε μια τιμή πληθυσμιακής συχνότητας που προσεγγίζει το **80 %** (Classen et al., 2005; Winter et al., 2001). Αυτή η θεαματική παρέκκλιση στις συχνότητες θεωρείται ότι είναι ο μορφογενετικός αντίκτυπος της *κυτταρικής αναδιάταξης (cell rearrangement)*, που εικάζεται ότι αναπληρώνει την αδυναμία της κυτταροδιαίρεσης να υπερβεί τη «*μέση πληθυσμιακή συχνότητα*»  **$N = 0,45$** , η οποία καθιερώθηκε κατά το προνυφικό (*larval*) στάδιο (Gibson et al., 2006).



**Εικόνα II.6.60.:** Από την προηγούμενη κατανομή επιλέχθηκαν δύο είδη, των οποίων οι πληθυσμιακές συχνότητες αναπαριστούν την προαναφερθείσα διαπίστωση με πρόδηλα εποπτικό τρόπο. Πηγές δεδομένων: *Drosophila*, *Hydra*, *Xenopus* (Gibson et al., 2006), *Cucumis* (Lewis, 1928), *Allium*, *Dryopteris*, *Euonymus*, *Anacharis*, *Volvox* (Korn and Spalding, 1973).

### 6.3.1. Η συμβολή της κυτοκίνησης-B στη μορφογένεση του επιθηλιοειδούς χαρακτήρα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας την κύρια μορφογενετική συνιστώσα που υπεισέρχεται στην επέκταση του μεσεγχυματικού πληθυσμού, αντιπροσωπεύει η *in vitro* *μίτωση* («διδιάστατη μίτωση» ή «μίτωση στο επίπεδο», “*coplanar mitosis*”). Στο απλό σχηματικό πρότυπο της εικόνας [Εικ. II.5.55.] συνοψίζεται περιεκτικά η μορφογόνος δυναμική της, θεωρώντας το εξαγωνικό σχήμα κελιού ως την περισσότερο προσεγγιστική «μέση μορφολογία» του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου. Στο πλαίσιο της ίδιας αυτής θεώρησης για τη διδιάστατη κυτοκίνηση, προβλέπεται ότι είναι εφικτή ακόμη και για μεσεγχυματικά κύτταρα τριγωνικού σχήματος, διότι στην περίπτωση αυτή ο ένας πόλος της μιτωτικής ατράκτου θα τοποθετηθεί «αναγκαστικά» στη μία από τις κορυφές του ισοδύναμου τριγωνικού κελιού, το οποίο τα αντιπροσωπεύει [Εικ. II.5.57.]. Ακόμη και σε μια τέτοια γεωμετρική συνθήκη ακραίας σχηματοποίησης, ο τοπολογικός αντίκτυπος της διδιάστατης μίτωσης θα μοντελοποιηθεί εξίσου καλά με βάση τα διαγράμματα των εικόνων ([Εικ. II.5.56.] και [Εικ. II.5.55.]). Αλλά, η βασική προϋπόθεση εφαρμογής του μοντέλου, είναι τα περιγράμματα των μοναδιαίων κελιών να διασυνδέονται μεταξύ τους, μέσω κάποιας υποτυπώδους τουλάχιστον, φυσικής και / ή βιολογικής σύζευξης. Το κυτταροβιολογικό υπόβαθρο του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου φαίνεται να ανταποκρίνεται στις προδιαγραφές αυτής της απαίτησης για «κυτταρική (ή κελλωτή) δικτύωση». Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το *in vitro* κυτταρικό σύστημα της μεσεγχυματικής συνάθροισης (*MSC aggregation*) σε κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες (*confluent density*) στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες, επειδή παρέχει επαρκείς ενδείξεις ότι οι μορφολογικοί μετασχηματισμοί στο κυτταρικό επίπεδο (“*cellular level morphological transformations*”) συμπορεύονται παράλληλα ή συγγραμμικά με αντίστοιχες μορφογενετικές μεταβολές που ολοκληρώνονται σε επίπεδο κυτταρικής διευθέτησης (“*tissue level morphogenesis*”). Ο παραλληλισμός αυτός βασίστηκε στην παρατήρηση της «διδιάστατης (ή ομοεπίπεδης) συνιστώσας του ανισοτροπισμού» (*planar polarity*) που υπεισέρχεται στερεότυπα στην κυτταρική σχηματοποίηση και γειτνίαση κατά τη διάρκεια των προσαρμοστικών μεταβολών, τις οποίες διέρχονται ξεκινώντας από το στάδιο της προσκόλλησης (*spreading*) και καταλήγοντας στο στάδιο της συνάθροισης (*aggregation*).

Η διδιάστατη κυτταροδιαίρεση με τη μορφή της «καθοδηγούμενης μίτωσης» (*in vitro* *μίτωσης*) μεσολαβεί την «τοπολογική αυτεπιστάσια» της ισοδύναμης κελλωτής διάταξης, την οποία αντιπροσωπεύει μια οποιαδήποτε μεσεγχυματική συνάθροιση (*MSC aggregate*), εξυπηρετώντας τη σύζευξη της παραγωγικής διεργασίας με τη σχηματοποιητική διαδικασία. Στο σχεδιάγραμμα της [Εικόνας 5.50.] συνοψίζονται εποπτικά οι γεωμετρικοί και οι τοπολογικοί συντελεστές αυτής της «αυτεπιστάσιας» (“*proofreading*”):

Η «κυτταρική ακμή» (*mesenchymal edge*) στις διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες και η «κυτταρική έδρα» (*mesenchymal face*) στις τριδιάστατες ιστοκαλλιέργειες αντιπροσωπεύουν το «γεωμετρικό ισοδύναμο» των εφαιπτόμενων πλασματικών μεμβρανών. Το καθεστώς συναρμογής των διακυτταρικών επαφών (*conjugation pattern*) καθιστά την κυτταρική συνάθροιση ικανή να ανταποκρίνεται στην επικείμενη τροποποίησή του, την οποία πάντοτε διακυβεύει η ενσωμάτωση (παρεμβολή ή παρείσφρυση) των θυγατρικών κυττάρων. Το μοτίβο-πρότυπο της δικτύωσης διατηρείται ή μεταβάλλεται διαβαθμισμένα σύμφωνα με τοπολογικούς κανόνες, οι οποίοι υποβόσκουν σε κάθε στιγμιότυπο κυτοκίνησης, στο βαθμό που οι επιφάνειες των μιτωτικών προϊόντων αφομοιώνονται από το προϋπάρχον καθεστώς συνδεσιμότητας, είτε μέσω βαθμιαίων και μακροπρόθεσμων είτε μέσω ασυνεχών και βραχυπρόθεσμων μηχανισμών διευθέτησης (*conjugation pattern plasticity*). Τα «κελλωτά δίκτυα» συνεπώς βάσει της τοπολογίας τους, εφοδιάζονται με μια δυναμική επισκόπησης της δόμησής τους, η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά πάντοτε επανατροφοδοτικά με τη δυναμική της παραγωγικής διεργασίας που διαμορφώνει τα γεωμετρικά στοιχεία των μοναδιαίων κελιών, ήδη από την έναρξη της κελλωτής ταξιθέτησης. Αυτή η δυναμική της αρχιτεκτονικής εποπτείας που εδραιώνουν τα «κελλωτά δίκτυα» συναρτήσει της πληθυσμιακής τους επεκτασιμότητας (*expansioning*), πηγάζει από το κάθε διακριτό καθεστώς δικτύωσης, την οποία και εγκαινιάζει με τη μέγιστη δυνατή «ευαισθησία», με την έννοια

ότι η έκβαση του μετασχηματισμού για κάθε ξεχωριστό *στιγμιότυπο* (*μοτίβο*) *δικτύωσης* εξαρτάται από την οποιαδήποτε εντοπισμένη μεταβολή στη συνδεσιμότητα, τόσο πιο άμεσα (και ντετερμινιστικά) όσο μικρότερο είναι το άθροισμα όλων των μοναδιαίων κελιών του δικτύου. Ο προορισμός της αλληλεξάρτησης αυτής είναι να πολυπλοκοποιείται, όσο περισσότερο αυτή ανατίθεται και διαμερίζεται σε μεγαλύτερο πλήθος μοναδιαίων κελιών, με συνοδό αποτέλεσμα τον προοδευτικό περιορισμό («έκπτωση» ή «άμβλυνση») της αρχικής «ευαισθησίας». Παράλληλα με την κλιμάκωση του στατιστικού χαρακτήρα, όσο μεγαλύτερο πληθυσμιακό κλάσμα συγκλίνει προς το «μέσο σχήμα μοναδιαίου κελιού», τόσο περισσότερο ενισχύεται η «συνοχή» μεταξύ των επιμέρους κελιών και τόσο περισσότερο αμβλύνεται η ετερογένεια (ή ανισοτροπισμός) μεταξύ των τοπικών γειτνιάσεων, μέσω κλιμάκωσης της «συνάφειας» τους. Κατά συνέπεια, η συνισταμένη «*συνεκτικότητα*» (*connectivity*) για το συνολικό δίκτυο που συναπαρτίζει (απειροστικά) μεγάλος αριθμός κελιών, προκύπτει ως στατιστική συνάρτηση που εξαρτάται από τη δυναμική ισορροπία μεταξύ δυο προκαθορισμένων τοπολογικών συνθηκών (ή «τοπολογικών ροπών»):

α] από τη διακύμανση της «*συνοχής*» (ή «*συγκολλητικότητα*», “*adhesion*”) μεταξύ των διαφορετικών σχημάτων που υιοθετούν τα κελιά, καθώς αθροίζονται κατά την πληθυσμιακή επέκταση του δικτύου και παρέχει μέτρο του βαθμού απόκλισης από το «μέσο σχήμα» για το μοναδιαίο κελί,

β] από τη διαβάθμιση της «*συνάφειας*» («*αμοιβαιότητα*» ή «*συμπληρωματικότητα*», “*cohesion*”, “*affinity*”) μεταξύ των τοπικών καθεστώτων συνδεσιμότητας που επικρατούν στις επιμέρους γειτονίες του δικτύου και αντιπροσωπεύει το μέτρο της «*αδράνειας*» (“*inertia*”) με την οποία αποκρίνεται η *συνολική δικτύωση* σε κάθε επιμέρους μεταβολή της *συνισταμένης* (ή «*μέσης*») *συνδεσιμότητάς* της. Η αισθητοποίηση αυτού του όρου που είναι δανεισμένος από τη Νευτώνεια Φυσική, αποδίδει στη *συνολική μάζα* (*m*) που συμμετέχει στην κελωτή ταξιδέτηση, ένα μορφογόνο ρόλο ο οποίος μπορεί να γίνει αντιληπτός και με μια εναλλακτική διατύπωση που εστιάζει στην «*ανοχή*» (“*tolerance*”) με την οποία αποκρίνεται το καθεστώς δικτύωσης (η «*μέση*» *συνδεσιμότητα*) σε διαφορετικές ακολουθίες μετασχηματισμού της. Επισημαίνεται ότι η «*ανοχή*» αυτή επικεντρώνεται στην τοπολογική μεταβλητή της συνδεσιμότητας και δεν εξαρτάται από την ποικιλότητα των διαθέσιμων (πιθανών) προτύπων-μοτίβων δικτύωσης, τα οποία είναι δυνατόν να υιοθετήσει κάθε ξεχωριστό καθεστώς συνδεσιμότητας. Έτσι, ο ρυθμός της κλιμάκωσης ή ο ρυθμός της άμβλυνσης του ανισοτροπισμού τον οποίο επιφέρει σε μια «μεικτή» (ή «ανισοτροπική») κελωτή διάταξη η άθροιση κελιών διαφορετικού σχήματος, ανεξάρτητα από το μηχανισμό παραγωγής τους, αντιπροσωπεύει μια διαφορετική παράμετρο την οποία υπολογίζει η στατιστική μεταβλητή του *συντελεστή μεταβολής* (*coefficient of variance*). Για παράδειγμα, ο τοπολογικός κανόνας επιβάλλει ότι οι τοπικές γειτονίες στις οποίες συσσωρεύονται τα μη κανονικά εξαγωνικά κελιά μιας (μη ισοτροπικής) διδιάστατης κελωτής διευθέτησης (ή «*κηρήθρας*») παράγουν έναν ανισοτροπισμό, ο οποίος είναι ποιοτικά και ποσοτικά υποδεέστερος εκείνου που εγκαθιστούν και διασπείρουν στις (μη ισοτροπικές) κελωτές διατάξεις τους τα μη κανονικά πενταγωνικά κελιά. Παρόμοια τοπολογική συνθήκη ισχύει και για τη σύγκριση του ανισοτροπισμού των εξαγωνικών με τις μη ισοτροπικές «*κηρήθρες*» μη κανονικών επταγωνικών κελιών, αλλά και γενικότερα για οποιαδήποτε σύγκριση μεταξύ μη ισοτροπικών διδιάστατων κελωτών διατάξεων που διατηρούν όμως αμετάβλητο το καθεστώς συνδεσιμότητας των κελιών τους και κατ’επέκταση δεν τροποποιούν το μοναδιαίο σχήμα τους. Δηλαδή όταν σε τυχαία θέση μιας κηρήθρας με σταθερή τιμή συνδεσιμότητας σε όλο το εμβάδόν της, προσαρτηθεί οποιοδήποτε (νέο) κελί με σχήμα όμως που δεν αποκλίνει καθόλου από το σχήμα του μέσου κελιού (ή με άλλα λόγια από εκείνο όλων των υπόλοιπων κελιών), τότε ανεξάρτητα από το ενδεχόμενο ασυμφωνίας (ή διακύμανσης) των διαστάσεών τους, η διατήρηση και αναπαραγωγή της δεδομένης τιμής συνδεσιμότητας ( $Z_e$ ), είναι ικανή να αντισταθμίσει και να εξομαλύνει με τη βέλτιστη δυνατή απόδοση την ετερογένεια που συνοδεύει την επικείμενη τοπολογική αφομοίωση του νέου κελιού, όσο μεγάλος κι αν είναι ο βαθμός της διαταραχής που τείνει να επιφέρει στον προϋπάρχοντα ανισοτροπισμό. Τα

παραδείγματα αυτά στοιχειοθετούν το μορφογόνο ρόλο της δεύτερης «τοπολογικής συνθήκης» που προσδιορίζει τη «συνάφεια γειτνίασης» (ή «υπεργειτνίασης» μεταξύ επιμέρους τοπικών γειτνιάσεων-εστιών) και συνυπολογίζει στο συνολικό ανισοτροπισμό, τη συνιστώσα που προδιαγράφεται από την πρώτη και θεμελιωδέστερη «τοπολογική ροπή» που είναι επικεντρωμένη στη «συνοχή» των μοναδιαίων κελλιών και κατ'επέκταση στην τοπολογική ταυτότητα του σχήματός τους, ανεξάρτητα από την πληθυσμιακή πυκνότητα της κελλωτής διάταξης. Συνοψίζοντας, η «αρχιτεκτονική αυτεπιστασία» των κελλωτών δικτύων απορρέει από την επανατροφοδοτική αλληλεπίδραση μεταξύ της «συνάφειας γειτνίασης» (των γειτονιών-εστιών) και της «συνοχής» (των κελλιών) και συμπορεύεται παράλληλα με την πληθυσμιακή επέκτασή τους σε ένα προκαθορισμένο πλαίσιο κανόνων με προβλέψιμη έκβαση, στο βαθμό που τα μοναδιαία κελλιά τείνουν να διατηρήσουν ή να μεταβάλλουν το καθεστώς της συνδεσιμότητας με την οποία συναρμολογούνται στην αναπτυσσόμενη κελλωτή διευθέτηση.

Συνοψίζοντας, η στατιστική θεώρηση των μεσεγγυματικών συναθροίσεων στις διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες είναι αλληλένδετη με την τοπολογική και ο συνδυασμός τους παραπέμπει στη μορφογενετική δυναμική της *κυτοκίνησης-Β*, οι συνιστώσες της οποίας συγκλίνουν στις προαναφερθείσες τοπολογικές «ροπές», οι οποίες αποτυπώνονται με τη μορφή της ποικιλότητας στη σχετική διευθέτηση του ζεύγους των θυγατρικών κυττάρων («τοπογραφικής συζυγίας μιτωτικών προϊόντων», “*mitotic conjugants pattern*”). Δύο πιθανές εκδοχές εξετάζονται ανά μίτωση, με βάση το σχηματικό υπόδειγμα που ισχύει για την κυτταροδιαίρεση του εξαγωνικού κελλίου της εικόνας [Εικ. II.5.55.]:

1α] Η -κορυφή προς κορυφή- διχοτόμηση του κανονικού εξαγώνου παράγει δύο συμμετρικά τετράπλευρα (τραπέζια), με μηδενικό τοπολογικό αντίκτυπο στη γειτονιά. Αυτή είναι μια «μη-τοπολογική διχοτόμηση», η οποία δεν παρατηρείται στα περισσότερα επιθήλια.

1β] Η -ακμή προς ακμή- διχοτόμηση του κανονικού εξαγώνου παράγει δύο συμμετρικά πεντάγωνα (πεντάπλευρα), με μη-μηδενικό τοπολογικό αντίκτυπο στη γειτονιά. Αυτή είναι μια «τοπολογική διχοτόμηση», η οποία είθισται στα περισσότερα επιθήλια.

Οι φυσικές συνέπειες αυτών των «τοπολογικών ροπών» είναι μικροσκοπικώς παρατηρήσιμες στις διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες και επαληθεύουν:

- αφενός, την αποτροπή του συνωστισμού (σύνθλιψης, *compression*) πολλών μεγάλων κυττάρων σε μια γειτονιά-εστία
- αφετέρου την πρόληψη της υπερέκτασης (εφελκυσμού, *extension*) πολλών μικρών κυττάρων σε μια γειτονιά-εστία

Πιθανολογείται ότι η συσσώρευση τέτοιων εστιών ακραίας (ή ασύμμετρης) τοπολογικής έκβασης (παραγωγή εστιών σύνθλιψης / εφελκυσμού) στη διδιάστατη κυτταρική διευθέτηση θα υπονόμει την ισορροπημένη πληθυσμιακή επέκτασή της (*population expansion*), καθιστώντας την επιρρεπή στην αποσταθεροποίηση των διακυτταρικών επαφών με δυσμενή επίδραση στην προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή ακόμη και στη διατήρηση του αρχικού (μεσεγγυματικού) φαινότυπου.



**6.3.1.α. Οι κυτταρικές συναθροίσεις επισωρεύουν το μορφογόνο αντίκτυπο της κυτταρικής σχηματοποίησης (*cell shape plasticity*) και τον αποτυπώνουν σε διδιάστατα πρότυπα ή μοτίβα ποικιλότητας (*aggregation patterns*).**

Η γεωμετρική πολυπλοκότητα (*geometric complexity*) που συσσωρεύεται (ή κλιμακώνεται) σε οποιαδήποτε διδιάστατη κυτταροκαλλιέργεια όταν προσεγγίζεται από τη σκοπιά του διδιάστατου «κελλωτού στερεού» (ή της «κηρήθρας»), προέρχεται από τρεις βιοτικές συνιστώσες:

- α] μεταβολές κυτταρικού σχήματος (*cell shape plasticity*),
- β] ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές της κυτταρικής πρόσφυσης (*adhesion plasticity*),
- γ] μεταβολές στα διανυσματικά χαρακτηριστικά της «καθοδηγούμενης κυτταροδιαίρεσης» (*mitosis orientation plasticity*).

Εναλλακτικά, οι μεταβολές της κυτταρικής γεωμετρίας είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθούν σε συνάρτηση με την κλίμακα διαστάσεων στην οποία μετρούνται, οπότε συνοψίζονται σε:

- α1] μεταβολές του κυτταρικού σχήματος (*subcellular origin of cell shape plasticity*) σε υποκυτταρική (νανομετρική, *subnanometric & nanometric scale*) κλίμακα (*membrane ruffling, blebs, microvilli, caveola, mitosis dependent surface convolution*),
- α2] μεταβολές του κυτταρικού σχήματος σε κυτταρική κλίμακα (νανομετρική, *nanometric scale*), που αφορούν την ατομική γεωμετρία του μονήρους κυττάρου (*solitary phenotype*), θεωρούμενου απομονωμένου από τα υπόλοιπα της ιστοκαλλιέργειας (*conjugation pattern independent cell shape plasticity*),
- α3] μεταβολές του κυτταρικού σχήματος σε διακυτταρική κλίμακα (μικρομετρική ή «μακροσκοπική», *micrometric scale*), που περιλαμβάνουν τους μορφολογικούς μετασχηματισμούς που διασπείρονται στο εύρος μιας γειτονιάς κυττάρων σε εξάρτηση από το πρότυπο της διακυτταρικής συναρμογής και αποκαλύπτουν τον επανατροφοδοτικό χαρακτήρα της «αλληλεπιδραστικής σχηματοποίησης» (*conjugation pattern dependent cell shape plasticity*), αφενός για την ατομική (ή μεμονωμένη) μορφολογία και αφετέρου για το μοτίβο της κυτταρικής συνάθροισης (*aggregation pattern*).

### **6.3.1.β. Η εξάρτηση της κυτταροδιαίρεσης από την τοπική κυτταρική γεωμετρία**

Από όλες αυτές τις μεταβολές, επιλέχθηκε η «αλληλεπιδραστική σχηματοποίηση» (*conjugation pattern dependent cell shape plasticity*) επειδή αφομοιώνει άμεσα το μορφογόνο αντίκτυπο των «καθοδηγούμενων κυτταροδιαίρεσεων», με την έννοια ότι αντικατοπτρίζει τη διδιάστατη εκδοχή (*planar polarity*) του ανισοτροπισμού που συσχετίζεται με το πεδίο μηχανικών τάσεων στο *in vitro* καλλιεργητικό δοχείο, είτε στο *in vivo* περιβάλλον του ιστού. Από αυτή τη σκοπιά, η εξάρτηση της κυτταροδιαίρεσης από την τοπική κυτταρική γεωμετρία (*local cell geometry*) θεωρείται ο «μηχανισμός υποβάθρου» (*default mechanism*) για τον προσανατολισμό του ισημερινού επιπέδου (*mitotic spindle orientation*) και τον καθορισμό του επιπέδου διαίρεσης (*cleavage plane determination*) που πρόκειται να διαχωρίσει τα επικείμενα θυγατρικά κύτταρα. Αυτές οι βασικές παραδοχές υπαγόρευαν κατά καιρούς τη διατύπωση μιας εκτενούς λίστας «κανόνων», από τη συλλογή των οποίων παρατίθενται ενδεικτικά οι εξής:

- α] τα πολωμένα κύτταρα τείνουν να διαιρούνται εγκάρσια στον επιμήκη άξονά τους (Hofmeister, 1877),
- β] το διαιρούμενο μητρικό φυτικό κύτταρο οργανώνει τα νέα κυτταρικά τοιχώματα κάθετα στα προϋπάρχοντα (**Sach's rule**) (Lynch and Lintilhac, 1997),
- γ] το επίπεδο διαίρεσης (*cleavage plane*) τείνει να ευθυγραμμιστεί με τη «συντομότερη απόσταση» που θα παράξει τα συμμετρικότερα μιτωτικά προϊόντα, πράγμα που επιβεβαιώνεται στα τριχωματικά κύτταρα (*trichome cells*) του φυτού **Venus flytrap** (Dumais et al., 2007; Smith et al., 2001).

Ο κυττοσκελετός του υπομεμβρανικού φλοιού σε κύτταρα του είδους **Nautilocalyx**, καθορίζει τη σχετική θέση της ισημερινής πλάκας με βάση έναν τέτοιο μηχανισμό (Flanders et al., 1990; Goodbody et al., 1991). Για τα φυτικά κύτταρα, η εξάρτηση του καθορισμού της σχετικής θέσης της ισημερινής πλάκας (*cleavage plane determination*) από το πεδίο τάσεων, φαίνεται να αποτελεί τον κανόνα (Lynch and Lintilhac, 1997; Lintilhac and Vesecky, 1984; Hamant et al. 2008). Ο επανατροφοδοτικός μηχανισμός που υπεισέρχεται σε αυτές τις περιπτώσεις χαρακτηρίζεται ως «τασσο-μεταγωγή» (*mechanotransduction*) (Ingber, 2006; Wang et al., 1993). Μολονότι δεν είναι τόσο επισταμένη η αντίστοιχη βιοφυσική γνώση του καθορισμού της σχετικής θέσης του ισημερινού επιπέδου (*division plane orientation*) στα διαιρούμενα ζωικά κύτταρα, η γενική εικόνα συγκλίνει προς παρόμοιους μηχανισμούς (Strauss et al., 2006; Black and Vincent, 1988; Gray et al., 2004; Honda, 1983). Στη διεργασία προσανατολισμού της μιτωτικής ατράκτου (*mitotic spindle orientation*) συμβάλλει επίσης καθοριστικά η ιστοειδική οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (*ECM patterns*) μέσω κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που δεσμεύουν ακτίνη (O'Connell and Wang, 2000; Thery et al., 2005, 2007).

### 6.3.1.c. Κυτταροδιαίρεση χωρίς εξάρτηση από την τοπική κυτταρική γεωμετρία

Γενετικά καθοδηγούμενοι μηχανισμοί προσανατολισμού της μιτωτικής ατράκτου (*genetically driven mitotic spindle orientation*), έχουν επιβεβαιωθεί στο φυτό **Arabidopsis**. Στην περίπτωση αυτή, ο προγνωστικός εντοπισμός της επικείμενης ισημερινής πλάκας προτυπώνεται στον υπομεμβρανικό φλοιό (*cell cortex*) του φυτικού κυττάρου σε θέση, γενετικά προκαθορισμένη με τη μορφή της προ-προφασικής ζώνης (*preprophase band, PPB*), στη συγκρότηση της οποίας συμμετέχει ένας δακτύλιος τουμπουλίνης και η *F-actin* (Jurgens, 2005; Smith, 2001). Στην ίδια επίσης θέση συνδέεται και η πρωτεΐνη *tangled*, ο συνεντοπισμός της οποίας προδιαγράφει τον προσανατολισμό της προσεχούς μιτωτικής ατράκτου με ακόμη μεγαλύτερη πιστότητα (Walker et al., 2007).

Επιπλέον, στο μεταλλαγμένο φαινότυπο *tangled*, ο παρεκκλίνων προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου, παραδόξως δεν καταστρατηγεί τη φυσιολογική μορφογένεση του φυτικού οργάνου, υποδηλώνοντας αφενός το βιοχημικό αναγωγισμό (*redundancy*) που διέπει τη συνολική ρύθμιση του προσανατολισμού της μιτωτικής ατράκτου και αφετέρου το μακροπρόθεσμο χρονικό προκαθορισμό (επιτολασμό) του επιπέδου αυλάκωσης (*cleavage plane*) (Smith et al., 1996).

Μια τέτοια γενετική και κατά συνέπεια μη γεωμετρική, συνιστώσα καθορισμού του επιπέδου συμμετρίας της κυτοκίνησης, συνάγεται (πρωθυστερολογικά) ότι επαυξάνει την πλαστικότητα των μορφογενετικών μετασχηματισμών και κατ'επέκταση εμπλουτίζει το εύρος μορφολογικής ποικιλότητας, το οποίο μπορούν να προσεγγίσουν τα επιθήλια. Πάντως, τέτοιες μη γεωμετρικές συνιστώσες επισημαίνεται ότι δεν αντιπροσωπεύουν κατά κανένα τρόπο τον εικαζόμενο «μηχανισμό υποβάθρου» (*default mechanism*) που υποτίθεται πως διασφαλίζει για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μια υποτυπώδη τουλάχιστον εγγενή ιδιότητα μορφογενετικής νομοτέλειας. Με άλλα λόγια αν ευσταθεί μια τέτοια γενίκευση που προτείνει ότι όντως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αυτός καθ'αυτός παράγει μορφογενετικά αποτελέσματα σε οποιαδήποτε *in vivo* ή *in vitro* κυτταρική συνάθροιση, τότε η ιδιότητα που του αποδίδεται υποδηλώνει ένα πιθανό μη βιολογικό υπόβαθρο που υπεισέρχεται στην κυτταροβιολογία της κυτοκίνησης και το οποίο υπαινίσσεται την τοπολογική αγχιστεία των μεσεγχυματικών συναθροίσεων με τα τυπικά επιθήλια, καθώς επίσης και με τα αβιοτικά κελλωτά δίκτυα.

### 6.3.2. Η συμβολή του οντογενετικού καθορισμού (*determination*) στη μορφογένεση του επιθηλιοειδούς χαρακτήρα του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου

Τα δυο διακριτά φαινόμενα της *in vivo* «φαινοτυπικής μεταστροφής» που αναλύονται στη συνέχεια, καθώς και η περίπτωση της *in vitro* μεταδιαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων,

η οποία παρατηρείται σποραδικά (αυθόρμητα) στις συμβατικές ιστοκαλλιέργειες, επιβεβαιώνουν την αρχή της γενετικής ισοδυναμίας (*genetic equivalence*).

### 6.3.2.α. Ορισμοί.

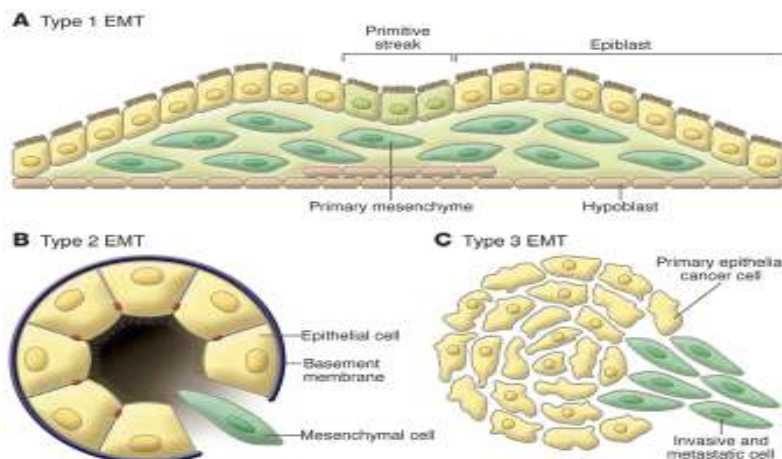
1] *Μεταδιαφοροποίηση (transdifferentiation)* είναι η διαδικασία κατά την οποία ένας δεδομένος κυτταρικός φαινότυπος ολοκληρώνει μια πλήρη ή μερική τουλάχιστον, μετατροπή του προς ένα διαφορετικό κυτταρικό τύπο, με τη μεσολάβηση δυο επιμέρους φάσεων, της *αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation)* του αρχικού φαινότυπου και της *εκ νέου διαφοροποίησης (ή «επαναδιαφοροποίησης», redifferentiation)* προς το διαφορετικό κυτταρικό τύπο. Αντιπροσωπευτικές παραλλαγές του μηχανισμού αυτού «φαινοτυπικής μεταστροφής» υπεισέρχονται στο φαινόμενο της *αναγέννησης (regeneration)* που ενεργοποιείται ως απόκριση στην τραυματική διακοπή της συνέχειας των ιστών, όπως είναι για παράδειγμα :

α] η αναγέννηση του φακού που αφαιρείται χειρουργικά, από τα κύτταρα της ίριδας στον οφθαλμό μιας σαλαμάνδρας (T. Yamada, 1967; DeBoth et al., 1970), μέσω μιας διαδικασίας που δεν ανακεφαλαιώνει τη φυσιολογική οντογένεση του φακού,

β] η αναγέννηση της ουράς στις σαύρες, κατόπιν αυτομίας,

γ] η αναγέννηση των άκρων στα ουροδελή αμφίβια, μετά από ακρωτηριασμό. Στην περίπτωση αυτή, επιδερμικά κύτταρα από τις παρυφές του κολοβώματος διασπείρονται μέσω μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού, σε όλη την επιφάνεια ακρωτηριασμού (*amputation plane*), συγκροτώντας το κορυφαίο επιδερμικό κάλυμμα (*apical ectodermal cap*). Στον ανατομικό χώρο κάτω από αυτό το σχηματισμό, τα κύτταρα όλων των ιστών υποβάλλονται σε μαζική αποδιαφοροποίηση (*dedifferentiation*), κατά την οποία αποδεσμεύονται από την περιβάλλουσα εξωκυττάρια ύλη (*ECM*) και από τις διακυτταρικές επαφές, γίνονται ιστολογικά μη διακρίσιμα και οργανώνουν μια κωνική μάζα μεσεγχυματικών κυττάρων, το αναγεννητικό βλάστημα (*regenerating blastema*). Μετά από μια περίοδο πολλαπλασιασμού και επαναδιαφοροποίησης αυτών των βλαστηματικών κυττάρων (*blastema cells*), όλοι οι προβλεπόμενοι κυτταρικοί τύποι είναι παρόντες στο αναγεννώμενο μέλος (*regenerate*) (Wallace et al., 1974; Namenwirth, 1974).

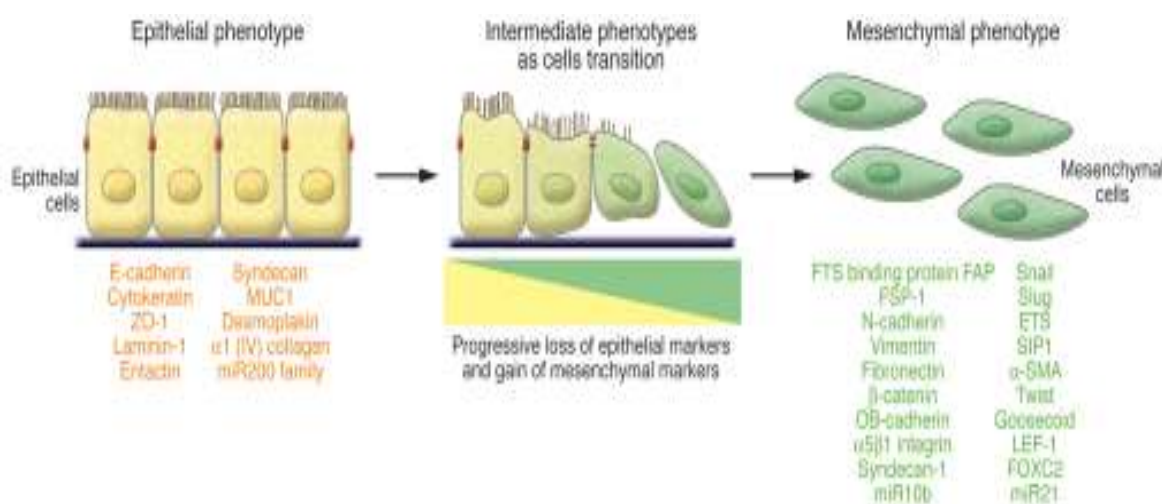
2] Ο «αλληλουχικός πολυμορφισμός» (*sequential polymorphism*) αντιπροσωπεύει μια διαφορετική, φυσιολογική εκδοχή της μεταδιαφοροποίησης, που υπεισέρχεται κανονικά (προγραμματισμένα) στην αναπτυξιακή πορεία δεδομένου κυτταρικού τύπου, χωρίς εξάρτηση από τραυματικά αίτια και επακόλουθη αναγεννητική απόκριση (Kafatos, 1976). Παρατηρείται στην ανάπτυξη της ωοθήκης των δίπτερων εντόμων, όπου τα *θυλακικά κύτταρα (ovarian follicle cells)* συναπαρτίζουν ένα επιθήλιο, κατά την οντογένεση του οποίου υιοθετούν μορφολογίες και λειτουργικότητες, εντελώς διαφορετικές από εκείνες που σχετίζονται με τη μετάβαση από το στάδιο της βιτελλινογένεσης σε εκείνο της χοριογένεσης.



Εικόνα II.6.61.: σύνοψη των τριών τύπων EMT

Η επιθηλιο-μεσεγχυματική μεταστροφή / μετάπτωση (*epithelial-mesenchymal transition, EMT*) αντιπροσωπεύει την εκδοχή της μεταδιαφοροποίησης που εξειδικεύεται για τον επιθηλιακό φαινότυπο και περιλαμβάνει τις εξής μεταβολές:

- α] απώλεια της νωτοκοιλιακής (βασο-(πλευρο-)κορυφαίας) κυτταρικής πόλωσης (*apical-basal polarity*),
  - β] απώλεια της διδιάστατης κυτταρικής πόλωσης (*planar cell polarity*), με την έννοια της απώλειας της φαινοτυπικής ομοιομορφίας που διέπει όλα ανεξαίρετως τα κύτταρα που διευθετούνται στο ίδιο μονοκυτταρικό έλασμα (ή στοιβάδα, *monolayer*) του επιθηλίου,
  - γ] απώλεια της εγγενούς δομικής και λειτουργικής αλληλεπίδρασης της βασικής επιφάνειας του κυττάρου με τη βασική μεμβράνη (*basement membrane, basal lamina*) του επιθηλίου, που κλιμακώνεται ακόμη και μέχρι την αποικοδομητική εξάλειψή της,
  - δ] υιοθέτηση μεταναστευτικού φαινότυπου (*motility*),
  - ε] ικανότητα «ιστικής διαπίδυσης» (ή μεταστατικότητα, *invasiveness*),
  - στ] αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης,
  - ζ] αυξημένη έκκριση εξωκυττάριας ύλης (*ECM*),
  - η] ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, έκφραση πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, έκφραση και αναδιοργάνωση κυτοσκελετικών πρωτεϊνών, έκκριση ενζύμων αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ύλης (*ECM*), μεταβολές στα πρότυπα μεταγραφής συγκεκριμένων *microRNAs*, που συνοψίζονται στην εικόνα [Εικ. II.6.62.].
  - θ] το εύρος της φαινοτυπικής πλαστικότητας που είναι ανεκτό από την επιθηλιο-μεσεγχυματική μεταστροφή (*EMT*) αναδεικνύεται περαιτέρω στο φαινόμενο της μεσεγχυματικής-επιθηλιακής μετάπτωσης (*mesenchymal-epithelial transition, MET*) το οποίο αντιπροσωπεύει μια «εκδοχή αντιστροφής» της αρχικής φαινοτυπικής μεταστροφής και μετατρέπει μεσεγχυματικά κύτταρα σε επιθηλιακούς κυτταρικούς τύπους (*epithelial derivatives*). Ως τυπικό παράδειγμα αναφέρεται η *MET* που σχετίζεται με την οντογένεση του νεφρού που καθοδηγείται από τα προϊόντα γονιδίων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται τα εξής (Lipschutz, J.H. 1998; Rothenpieler, U.W., and Dressler, G.R. 1993; Hogan, B.L., and Kolodziej, P.A. 2002) :
- A] *paired box 2 (Pax2)*,
  - B] *bone morphogenetic protein 7 (Bmp7)*,
  - Γ] *Wilms tumor 1 genes (Wt1)*.



**Εικόνα II.6.62.:** Ένας εποπτικός κατάλογος με τους συνήθεις δείκτες που σηματοδοτούν το φαινόμενο της *EMT*. Συνεντοπισμός μελών από αυτές τις δυο λίστες στο ίδιο κύτταρο, επισημαίνει μεταβατικό φαινότυπο που παράγεται από μια *EMT*, της οποίας η ολοκλήρωση εκκρεμεί. Η ανίχνευση τέτοιων περιπτώσεων σε ένα μεσεγχυματικό πληθυσμό αποκλείει την πιθανότητα αναγνώρισης όλων των μεσεγχυματικών κυττάρων που προέκυψαν από επιθήλια μέσω της διεργασίας της *EMT*, καθώς η τελεσφόρησή της συνήθως εξαλείφει όλους τους επιθηλιακούς δείκτες, με αποτέλεσμα την αδυναμία διάκρισης των αλλαγμένων φαινότυπων από τους ατροποποιημένους μεσεγχυματικούς. (ZO-1, zona occludens 1; MUC1, mucin 1, cell surface associated; miR200, microRNA 200; SIP1, survival of motor neuron protein interacting protein 1; FOXC2, forkhead box C2.)

Αναγνωρίζονται τρεις ξεχωριστές παραλλαγές του φαινομένου της *επιθηλιο-μεσεγχυματικής μεταστροφής (EMT)*:

1] ο *τύπος-1 ("type-1-EMT")*, που συσχετίζεται με την εμφύτευση του εμβρύου, την εμβρυογένεση και την οργανογένεση και στερείται της δυνατότητας πρόκλησης ίνωσης (*fibrosis*) και / ή έκλυσης μεταστατικού φαινότυπου (διασποράς μέσω της συστημικής κυκλοφορίας), π.χ. φαινοτυπική μεταστροφή κυττάρων επιβλάστης σε κύτταρα μεσοδέρματος (*epiblast-mesoderm transition*) και παραγωγή κινητών κυττάρων νευρικής κρηπίδας (*mobile neural crest cells*). Η ιδιαιτερότητα της κατηγορίας αυτής έγκειται στην παραγωγή μεσεγχυματικού φαινότυπου (*πρωτογενούς μεσεγχύματος, primary mesenchyme*) που διατηρεί δυναμική –μέσω της *MET*– παραγωγής *δευτερογενών επιθηλίων (secondary epithelia)*. Τα τελευταία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άλλους επιθηλιακούς φαινότυπους που κι αυτοί διατηρούν τη δυναμική μιας υστερογενούς *EMT* που θα εμπλουτίσει τους ποικίλους ερειστικούς ιστούς με αστροκύτταρα (*astrocytes*), λιποκύτταρα (*adipocytes*), χονδροκύτταρα (*chondrocytes*), οστεοβλάστες (*osteoblasts*) και μυοκύτταρα (*muscle cells*).

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα στον ποντικό αναδεικνύουν μια παραλλαγή της διεργασίας που αποδίδεται με τον όρο *EndMT*, εξειδικευμένη για τον ενδοθηλιακό φαινότυπο που συμμετέχει στη δόμηση των τριχοειδών αγγείων (*microvasculature*) και συμβάλλει στην παραγωγή μεσεγχυματικών κυττάρων στα πλαίσια της ίνωσης (*fibrosis*) (Kalluri R. et al., 2008.). Το μοριακό υπόβαθρο της παθολογικής αυτής διεργασίας αντανακλά πιθανώς την φυσιολογική εκδοχή της ομόλογης *EndMT* που συμβάλλει στην οργανογένεση των καρδιακών βαλβίδων και του ενδοκαρδίου (Zeisberg, E.M. et al., 2007.).

2] ο *τύπος-2 ("type-2-EMT")*, που συσχετίζεται με την παθογένεια της ίνωσης (*organ fibrosis, tissue fibrosis*) και με ποικίλες παραλλαγές της αναγέννησης των ιστών και των οργάνων (*wound healing, tissue regeneration*), καθώς και των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Σε αντιπαράθεση προς τον προηγούμενο τύπο, το χρονικό βεληνεκές της δεν έχει περιορισμό και ευθύνεται για χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις (Hay E.D. et al., 2002, 2005).

3] ο *τύπος-3 ("type-3-EMT")*, που συσχετίζεται με την παθογένεια του καρκινικού μετασχηματισμού από δευτερογενή επιθήλια.

### 6.3.2.b. Συμπεράσματα.

1] Δεδομένου ότι ο *in vitro* μεσεγχυματικός φαινότυπος δεν είναι προϊόν μεταδιαφοροποίησης (επιθηλιομεσεγχυματικής μετάπτωσης), ο χαρακτηρισμός του ως «επιθηλιο-μιμητικός» (*epithelio-mimicking*) είναι ενδεδειγμένος τουλάχιστον από τοπολογικής σκοπιάς, με την έννοια ότι αποτελεί κατά μια έννοια, *φαινοαντίγραφο του επιθηλιακού φαινότυπου (phenocopy)*. Σε αυτή την εικασία συνηγορεί ο συνδυασμός των εξής φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που στερεότυπα υιοθετεί η πλειονότητα των καλλιεργούμενων μεσεγχυματικών κυττάρων:

- α] μονοκυτταρική επίστρωση (μονοστοιβάδα, *monolayer*),
- β] νωτοκυλινδρική (βασοπλευροκορυφαία) κυτταρική πόλωση (*apical-basal-polarity*),
- γ] διδιάστατη κυτταρική πόλωση (*planar polarity*).

2] Η *επιθηλιο-μεσεγχυματική μεταστροφή (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)* είναι ένα βιολογικό φαινόμενο που συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης που αποδίδει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έναν εγγενή «μηχανισμό υποβάθρου» (*default mechanism*) για τη μορφογενετική δυναμική του. Διότι υπαινίσσεται ότι ο επιθηλιακός φαινότυπος δύναται να απεμπολήσει τον αμετάκλητα μη αναστρέψιμο χαρακτήρα της τερματικής διαφοροποίησής του και να υιοθετήσει τον εναλλακτικό οντογενετικό προγραμματισμό του μεσεγχυματικού φαινότυπου για να ανταποκριθεί καταλληλότερα (*fitness, adaptation*) στη νομοτέλεια της αναγέννησης, με την έννοια της οργάνωσης του τραυματικού επιθηλίου.

Στην παρούσα μελέτη λοιπόν, ο μεσεγγυματικός φαινότυπος που εκλύεται σε μια διδιάστατη κυτταροκαλλιέργεια, θεωρούμενος στο σύνολό του ως μια στερεότυπη προσαρμοστική απόκριση στις πιθανές παραλλαγές των *in vitro* συνθηκών, εικάζεται ότι αντιπροσωπεύει ένα «υποσύνολο» από το ευρύτερο πλαίσιο της ιστικής αναγέννησης (*regeneration*). Συνεπώς, είναι το βιώσιμο αποτέλεσμα μια συλλογής από επιμέρους «προγράμματα ή πρωτόκολλα διάσωσης» (*rescue schedule*) που κινητοποιούνται προς αντιστάθμιση (*compensation*) καταστάσεων έκτακτης ανάγκης με οξύ απειλητικό χαρακτήρα για την κυτταρική επιβίωση (*viability*). Επιπλέον, ως τέτοιες θεωρούνται εύλογα και οι *in vivo* συνθήκες που προκύπτουν σε οποιαδήποτε από τις δυο ιστολογικές όψεις του επιπέδου μιας («βαθιάς») χειρουργικής τομής, ή στο επίπεδο (*amputation plane*) της ολικής διατομής ενός άκρου σπονδυλοζώου κατόπιν χειρουργικού ακρωτηριασμού του, με την επιφύλαξη ότι στην επιφάνεια του κολοβώματος διασώζονται όλες οι φυσιολογικές προδιαγραφές για ολοκλήρωση δευτερογενούς ανάπτυξης.

Κατά συνέπεια οι ιστοί που κείνται εγγύτατα και εκατέρωθεν του νοητού επιπέδου που οριοθετεί γεωμετρικά την επιφάνεια διατομής (*amputation plane*) υποβάλλονται βίαια σε ανατομικές συνθήκες που θεωρούνται «ισοδύναμες» από τοπολογικής σκοπιάς. Παρόμοιες ως ένα βαθμό, είναι και οι *in vitro* συνθήκες που ανακύπτουν για ένα ιστοτεμάχιο που απομονώνεται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο καθώς επίσης και για τα μεμονωμένα κύτταρα που εποικίζουν το τρυβλίο μιας συμβατικής ιστοκαλλιέργειας.

#### 6.4. Οι τέσσερις κλάσεις μοντέλων μέγιστης εντροπίας που αξιοποιούνται για την τοπολογική προσέγγιση των *in vivo* επιθηλίων.

##### 6.4.1. Dirichlet models (DM) [Εικ. II.6.63.A.]:

Η εποπτικότερη αισθητοποίηση μιας «επικράτειας Dirichlet» (*Dirichlet domain*) επιτυγχάνεται στις διδιάστατες απεικονίσεις. Για μια δεδομένη συλλογή τυχαία διεσπαρμένων ομοεπίπεδων σημείων, η «επικράτεια Dirichlet» ενός επιλεγμένου σημείου καταλαμβάνει το «γεωμετρικό κλάσμα» των σημείων του Ευκλείδειου Επιπέδου που γειτνιάζουν με το θεωρούμενο σημείο, περισσότερο από ό,τι με οποιοδήποτε άλλο σημείο της συλλογής (Honda, 1978, 1980, 1983; Honda et al., 1984). Η διαδικασία αυτή, συνυπολογίζοντας την απόκλιση του φυσικού σχήματος του επιθηλιακού κυττάρου από την (προκαθορισμένη) κανονικότητα του πιο συμβατού «πρότυπου κυττάρου» (κελλιού), αποσκοπεί:

Να καταστρώσει πολύγωνα, με περιμέτρους τέτοιες ώστε να συναρμολογήσουν πάτερν πολυγώνων, τέτοιας διευθέτησης ώστε το άθροισμα των κυτταρικών περιγραμμάτων-συνόρων (*cells' boundaries*) να λαμβάνει την ελάχιστη από ένα εύρος δυνατών τιμών, στο οποίο θα αντιστοιχίζονταν οι τυχαίες διευθετήσεις των πολυγωνικών κελιών, χωρίς μεταβολές στα εμβαδά των πολυγωνικών κελιών. Κηρήθρες με υψηλό βαθμό εγγενούς κανονικότητας, όπως είναι οι αντίστοιχες που διαπλάθονται από φυσαλλίδες σάπωνα (*soap bubbles*), κατέχουν ήδη τέτοιες (υποδειγματικές, ελαχιστοποιημένες) περιμέτρους, ως απότοκο των φυσικοχημικών αρχών που διέπουν τη σχηματοποίησή τους.

Ωστόσο, τα μοντέλα (*Dirichlet models*) που στοχεύουν να αναπαράγουν τα φυσικά μοτίβα των *in vivo* επιθηλίων, υπολογίζουν για τις περιμέτρους των κυττάρων, θεωρητικές τιμές που υπερβαίνουν τις παρατηρούμενες, επειδή θα αντιστοιχούσαν σε ισοτροπικά κελιά και κατ' επέκταση σε κανονικότητες που κατά κανόνα δε συμβιβάζονται με εκείνες που διέπουν τους ζωικούς και φυτικούς επιθηλιακούς ιστούς. Με άλλα λόγια, αποδίδουν στα πολυγωνικά κελιά ένα βαθμό *ανισοτροπισμού*, ο οποίος υστερεί ως προς την ερμηνεία της ευρείας διακύμανσης στις κανονικότητες που συστηματικά παρατηρούνται στις βιολογικές «κηρήθρες». Παρά τα μειονεκτήματα οι ειδικοί αλγόριθμοι βράχυνσης-περιορισμού του περιγράμματος κελιού (*"boundary shortening" procedure*), προσδίδουν στα μοντέλα Dirichlet αξιοσημείωτη προγνωστική δυναμική, με τη βοήθεια της οποίας αξιολογείται προσεγγιστικά η εκτασιμότητα / συσταλτότητα της κυτταρικής επιφάνειας και συνάγονται συμπεράσματα για το εύρος της μορφολογικής πολυπλοκότητας που υπεισέρχεται στην κυτταρική σχηματοποίηση.

#### 6.4.2. Cellular Potts Model (CPM) [Εικ. II.6.63.B.]:

Παραγωγή μοντέλων προσομοίωσης, βασισμένη σε *συναρτήσεις βέλτιστης ενεργειακής στάθμης (effective energy functions)*. Πλεονεκτούν στο βαθμό που εισηγούνται τις καταλληλότερες *Χαμιλτονιανές απεικονίσεις (Hamiltonians)*, για πρόγνωση της πιθανότητας μετατροπής σε παρόμοιες δομικές διαμορφώσεις, με βάση τις μεταξύ τους ενεργειακές διαφορές. Γενικά, παρέχουν μοντελοποίηση για οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο και οσοσδήποτε βαθμούς πολυπλοκότητας, αρκεί να εξειδικευθεί το κατάλληλο πλαίσιο *απεικόνισης Hamilton* που αντιστοιχεί στο ζητούμενο μορφογενετικό φαινόμενο. Αναφέρονται τρεις υποδειγματικές δημοσιεύσεις:

A] (Mombach et al., 1993): παρέχει μοντελοποίηση για τον πολλαπλασιασμό των επιθηλίων, βασισμένη σε μια *απεικόνιση Hamilton* η οποία προσδιορίζει την ενεργειακή κατανομή για τις κυτταρικές επιφάνειες, σε συνάρτηση με την κυτταροδιαίρεση. Θεωρεί ικανή και αναγκαία, μια γεωμετρική συνθήκη που προϋποθέτει ότι η μίτωση συμβαίνει όταν ο λόγος εμβαδού προς περίμετρο για το υποψήφιο μητρικό κύτταρο, υπερβεί μια ορισμένη κατώφλια τιμή.

B] (Graner and Glazier, 1992, 1993): παρέχει μοντελοποίηση για την κυτταρική συνάντηση δυο ή περισσότερων υποπληθυσμών, βασισμένη στη διαφορική πρόσφυση. Η *απεικόνιση Hamilton* υπολογίζει την απόκλιση των μετρούμενων κυτταρικών διαστάσεων από τις πρότυπες τιμές που διαθέτει το κύτταρο με το ευνοϊκότερο (ή προτιμητέο) μέγεθος, σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της ενεργειακής κατανομής για τις κυτταρικές επιφάνειες.

Γ] (Farhadifar et al., 2007): παρέχει μοντελοποίηση για τον πολλαπλασιασμό και την *κυτταρική αναδιάταξη (cell rearrangement)* των επιθηλίων στον εμβρυακό δίσκο (*wing imaginal disk epithelium*) του φτερού στη Δροσόφιλα. Στην *απεικόνιση Hamilton* που εφάρμοσαν οι Graner και Glazier (1992), συνυπολογίζει επιπλέον και τη μορφογενετική δυναμική της επιφανειακής τάσης για τις πλασματικές μεμβράνες.

#### 6.4.3. Subcellular Element Models (SEM) [Εικ. II.6.63.C.]:

Εισηγείται την απεικόνιση της μοναδιαίας κυτταρικής δομής μέσω μιας γεωμετρικής ή στερεομετρικής συλλογής σημειακών μαζών (*cloud of point masses*) που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (*elastic interactions*) μέσω κατάλληλων στατιστικών συναρτήσεων προκειμένου να συγκλίνουν στην αναπαράσταση της ζητούμενης κυτταρικής ιδιότητας και / ή λειτουργίας που επικεντρώνει το μορφογενετικό ενδιαφέρον (Newman, 2005). Η δυναμική της μοντελοποίησης αυτής επεκτείνεται και στην ερμηνεία των τριδιάστατων οντογενετικών αλληλεπιδράσεων που εμπλέκονται στη μορφογένεση της επιθηλιακής πόλωσης (*epithelial cell polarity, epithelial sheet polarity*).

A] (Ingber, 2006): κάνει εκτενή χρήση των μοντέλων αυτών για έλεγχο της υπόθεσης που αναφέρεται στη μηχανοαισθητική μεταγωγή (*mechanotransduction*).

B] (Newman, 2008): στα πλεονεκτήματά τους συμπεριλαμβάνουν και προγνωστικές δυνατότητες για τις μορφογενετικές επιπτώσεις της κυτταροδιαίρεσης.

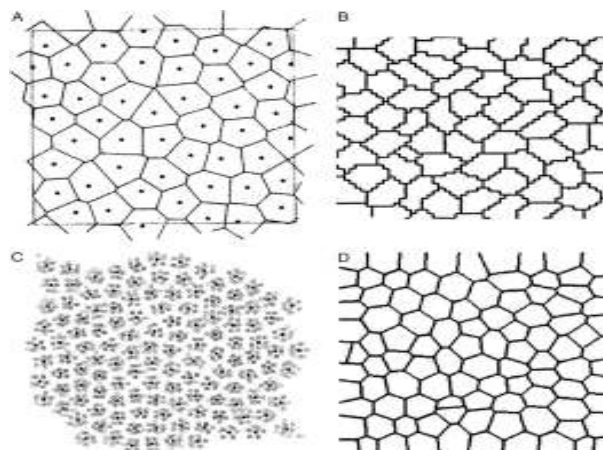
#### 6.4.4. Finite-Element Models (FEM) [Εικ. II.6.63.D.]:

Επεκτείνει και συμπληρώνει στην προαναφερθείσα μοντελοποίηση, επιπρόσθετες βιοφυσικές παραμέτρους (π.χ. ωσμωτική πίεση), καθώς και περιοριστικές συνθήκες για τις αλληλεπιδράσεις των σημειακών μαζών, συγκλίνοντας σε μια αναπαράσταση της μοναδιαίας κυτταρικής δομής που αισθητοποιείται από πολυγωνικά και / ή πολυεδρικά ελαστικά κελιά.

A] (Prusinkiewicz and Lindenmayer, 1990): συμβολή των βιοφυσικών μεταβλητών που ρυθμίζουν το εμβαδόν της κυτταρικής επιφάνειας, στο μορφογόνο ρόλο της κυτταροδιαίρεσης.

B] (Chen and Brodland, 2000; Brodland and Veldhuis, 2002; Brodland, 2006; Brodland and Wiebe, 2004): μορφογόνος ρόλος των κυτταρικών επιφανειών συναρτήσει της κυτταροδιαίρεσης, μορφογόνος ρόλος των ελασματοποδίων (*lamellipodia*) στο φαινόμενο της *convergent extension*.





**Εικόνα II.6.63.:** Εποπτικές απεικονίσεις των τεσσάρων μοντέλων μέγιστης εντροπίας για την αναπαράσταση της κυτταρικής γεωμετρίας στα επιθήλια. (A) **Dirichlet model of space partitioning** (Honda, 1978). (B) **Cellular Potts Model** (Glazier and Graner, 1993). (C) **Subcellular Element Model** (Newman, 2005). (D) **Finite-Element Model** (Brodland and Veldhuis, 2002).

#### 6.4.5. Σύνοψη συμπερασμάτων από τις μεθόδους μέγιστης εντροπίας (*maximum entropy methods / statistical inference methods*)

Στα επιθήλια, τέτοιες μέθοδοι αξιοποιούνται για τον αλγεβρικό υπολογισμό των πιθανότερων διαμορφώσεων για τα πολυγωνικά κελιά, με χρήση μιας περιορισμένης συλλογής από προτάσεις-πορίσματα, από τις οποίες επιλέχθηκαν οι κατωτέρω, για την πληρότητα των περιοριστικών τους γεωμετρικών περιορισμών και για την ευρύτητα της εφαρμογής τους σε ποικιλία αβιοτικών αλλά και βιοτικών κελλωτών δικτύων (Rivier et al., 1995):

1] σε οποιοδήποτε διδιάστατο κελλωτό δίκτυο (κηρήθρα), η πιθανότητα γειτνίασης μεταξύ κελιών με περισσότερες –του μέσου όρου- ακμές και κελιών με λιγότερες, προβλέπεται να είναι μεγαλύτερη από την θεωρητικώς αναμενόμενη βάσει εντελώς τυχαίας γειτνίασής τους (Dubertret and Rivier, 1997; Peshkin et al., 1991).

2] κελιά με περισσότερες –του μέσου όρου- ακμές, προβλέπονται να καταλαμβάνουν μεγαλύτερα εμβαδά, εν’ συγκρίσει προς κελιά με λιγότερες (Lewis, 1928; Rivier and Lissowski, 1982).

3] η διδιάστατη χωροταξική συνδιευθέτηση μεταξύ κελιών με περισσότερες –του μέσου όρου- ακμές και κελιών με λιγότερες, περιορίζει αφενός τη συχνότητα εμφάνισης γειτονιάς όπου συνωστίζονται (συνθλίβονται) πολλά ευμεγέθη κελιά, προκειμένου να χωρέσουν στην κηρήθρα και αφετέρου τη συχνότητα εμφάνισης γειτονιάς όπου υπερεκτείνονται (εφελκούνται) πολλά μικρά κελιά, προκειμένου να παραμείνουν συνδεδεμένα το ένα προς το άλλο, δηλαδή γειτονικά (Gibson et al., 2006)

4] Οι συχνότητες οποιωνδήποτε πολυγωνικών κελιών σε κάθε κηρήθρα, στα εμπειρικά μοντέλα τείνουν συστηματικά προς επιμέρους τιμές που συνάδουν με μια συνολική *τοπολογική συνθήκη ισορροπίας* (*steady-state topological dynamics*) (Gibson et al., 2006; Korn and Spalding, 1973; Lewis, 1928; Dubertret and Rivier, 1997; Miri and Rivier, 2006).

#### 6.4.6. Οι εγγενείς περιορισμοί των μοντέλων μέγιστης εντροπίας

1] Εξ’ορισμού στα τοπολογικά μοντέλα δεν υπεισέρχεται ο ίδιος ο χώρος, ως δυναμική συνιστώσα για την παραγωγή μακροσκοπικών μεταβολών.

2] Δυο δεδομένα όμοια πολύγωνα, αντιστοιχούν σε όμοιες ιδιότητες από τοπολογικής σκοπιάς («αντιστοιχία συνάρτησης»), ανεξάρτητα από τη σχετική θέση (*spatial location*) που καταλαμβάνουν σε ένα διδιάστατο κελλωτό δίκτυο (κηρήθρα). Συνεπώς στα τοπολογικά μοντέλα, δεν είναι προβλέψιμη η αλληλεπίδραση με μεταβλητές που είναι εξαρτημένες από τη γεωμετρία του χώρου, όπως είναι για παράδειγμα η φθίνουσα μεταβολή του ρυθμού διάχυσης μιας ουσίας, συναρτήσει της απόστασης από την πηγή της και ο ρόλος της συνέπειας αυτής στον χημειοτακτικό της αντίκτυπο (Bertet et al., 2004; Blankenship et al., 2006; Rauzi et al., 2008).

Στα μοντέλα χάραξης σχεδίου (*pattern formation*) που βασίζονται στην κλίση συγκέντρωσης μορφογόνου (*morphogen gradient*), υπεισέρχονται συστηματικά τέτοιες μεταβλητές. Θεωρώντας λοιπόν δυο όμοια κύτταρα, εφοδιασμένα με ένα μεταναστευτικό φαινότυπο (*motility*) που αποκρίνεται χημειοτακτικά στην κλίση συγκέντρωσης δεδομένου υποστρώματος, όταν μετατοπίζονται (*translocation*) προς μια κοινή θέση πυκνότερης κατανομής του (για παράδειγμα όταν τείνουν να καταλάβουν την ίδια τη θέση της πηγής του), αναπτύσσουν μεταξύ τους ανταγωνισμό, καθώς το εύρος των διαθέσιμων θέσεων συρρικνώνεται σε ομόκεντρους κύκλους φθίνουσας ακτίνας. Τότε οι πιθανότητες πρόσβασης στον ίδιο μορφογόνο πόρο, διαφοροποιούνται για τα δυο αυτά κύτταρα. Κατά συνέπεια, με τη διεργασία της προσάρτησης περισσότερων του ενός, κυττάρων μέσω του πολλαπλασιασμού, σε δεδομένο τοπολογικό μοτίβο (*pattern*), συμπορεύονται πιθανότατα επιπρόσθετες συνιστώσες που εμπλουτίζουν την ποικιλότητα των μορφογενετικών προτύπων (*patterns*), ως αποτέλεσμα της κλιμάκωσης της βιολογικής πολυπλοκότητας.

3] Οι γεωμετρικές μεταβολές που υπεισέρχονται στις κατευθυνόμενες («καθοδηγούμενες») κυτταροδιαίρεσεις (*oriented cell divisions*), δεν παράγουν ποιοτικώς ανιχνεύσιμη και κατ'επέκταση ούτε και μετρήσιμη αλλαγή στη δυναμική του τοπολογικού μοντέλου ([Εικ. II.5.54.], [Εικ. II.5.55.], [Εικ. II.5.56.]). Στην τοπολογική θεώρηση δεν είναι εφικτή η αναγνώριση της μορφογενετικής προέλευσης (*morphogenetic origin*) του αντίκτυπου στο μοτίβο (*pattern*), με άλλα λόγια κάνει αδύνατη τη διάκριση ενός αντίκτυπου στο μοτίβο που προέρχεται από κατευθυνόμενες κυτταροδιαίρεσεις, σε αντιπαραβολή με τον αντίστοιχο αντίκτυπο που οφείλεται σε μη κατευθυνόμενες κυτταροδιαίρεσεις (*oriented versus nonoriented divisions*) (Baena-Lopez et al., 2005; Gong et al., 2004).

## 6.5. Εισαγωγή στην Τοπολογία των «Κελλωτών Στερεών» (“Cellular Solids” Topology)

### 6.5.1. Ορισμοί

Με την εισήγηση του όρου «Κελλωτό ή Κυψελωτό Στερεό» («Κυψελιδωτό» ή «Κελλοφόρο» ή «Κυτταρικό», “Cellular Solid”, από το λατινικό όρο *Cellarium* για το κελλί), νοείται μια εξειδικευμένη διάταξη («μοτίβο» ή δίκτυο, “pattern”) που οργανώνεται ως αποτέλεσμα συσσωμάτωσης (ή συνάθροισης, “aggregation”, “clustering”) διδιάστατων ή τριδιάστατων δομικών υπομονάδων, οι οποίες αντιπροσωπεύουν ένα ή περισσότερα είδη γεωμετρικών σχημάτων και πληρούν τρεις βασικές προϋποθέσεις :

α) απαρτίζονται από «στερεές» (άκαμπτες) ακμές και / ή έδρες, ένα υποσύνολο των οποίων απαριθμεί γεωμετρικά στοιχεία που είναι κοινά κατά ζεύγη παρακείμενων υπομονάδων και

β) συναθροίζονται σε μια ή περισσότερες διευθετήσεις που αντιπροσωπεύουν το υποσύνολο των πυκνότερων δυνατών συσσωρεύσεων (από ένα σύνολο εναλλακτικών διαθέσιμων διευθετήσεων) και

γ) διατάσσονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να καταλαμβάνουν (“tilling”) κατά συνεχή τρόπο το διαθέσιμο επίπεδο και / ή το χώρο. Δηλαδή η πυκνότητα της διάταξης είναι απαλλαγμένη από «κενές θέσεις-θέσεις ασυνέχειας», καθώς οι δομικές υπομονάδες που συμπληρώνουν το δίκτυο, αλληλοεφάπτονται μεταξύ τους μέσω κοινών κορυφών, ακμών και / ή εδρών, διασυνδέοντας τα γεωμετρικά αυτά στοιχεία σε ένα εκτεταμένο συνεχές και αδιάσπαστο πλέγμα, δίκην «δικτύου από επικαλυπτόμενες κλειστές γραμμές και / ή επιφάνειες».

Ωστόσο, επισημαίνεται ότι η ειδική αυτή ομαδοποίηση του πλήθους των δομικών υπομονάδων δεν ανάγει τα επιμέρους αυτά γεωμετρικά στοιχεία τους σε ένα αθροιστικό σύνολο με τη μορφή «ικρίωματος (“scaffold”) από τεθλασμένες (πολυγωνικές) γραμμές και / ή επιφάνειες». Η ειδοποιός διαφορά της κελλωτής δικτύωσης από ένα ισοδύναμο άθροισμα μιας συλλογής από τα επιμέρους γεωμετρικά στοιχεία των μοναδιαίων κελιών του δικτύου, προέρχεται από το τοπολογικό υπόβαθρό της και αναδεικνύεται στην εκπλήρωση της συνθήκης Euler. Η κελλωτή διευθέτηση απορρέει από ένα διττό καθεστώς που πλαισιώνει την παραγωγική διαδικασία:

α] προκύπτει αφενός ως προϊόν της *συνέχειας* που διέπει τη συνισταμένη μορφογόνο διεργασία που παράγει αδιακρίτως τη δομική («πρώτη») ύλη από την οποία αποτελούνται οι υπομονάδες και

β] αφετέρου προκύπτει ως αποτέλεσμα της δυναμικής της για παράλληλο καταμερισμό σε επιμέρους παραγωγικές συνιστώσες που οριοθετούν τη γεωμετρική αυτοτέλεια της κάθε ξεχωριστής υπομονάδας.

Το ενδιαφέρον στην προκειμένη περίπτωση προσελκύουν οι λιτές μαθηματικές σχέσεις που περιγράφουν τις ποιοτικές και ποσοτικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των υπομονάδων του δικτύου με βάση τα επιμέρους γεωμετρικά αυτά στοιχεία και κατά συνέπεια παραπέμπουν εύκολα και αξιόπιστα στη στατιστική επεξεργασία του συνόλου των υπομονάδων του συστήματος με βάση τις απλές σχέσεις που προσδιορίζουν ένα αποσπασματικό δείγμα ή μια «τοπική γειτονιά» υπομονάδων. Η ετυμολογία της λέξης «**κύτταρο**» (“**cell**”) υπό το συνδυαστικό πρίσμα μιας τέτοιας στατιστικής και τοπολογικής θεώρησης, δε διαφέρει σημαντικά από την οικεία –στο ευρύ κοινό– σημασία της [Εικ. II.6.64.].

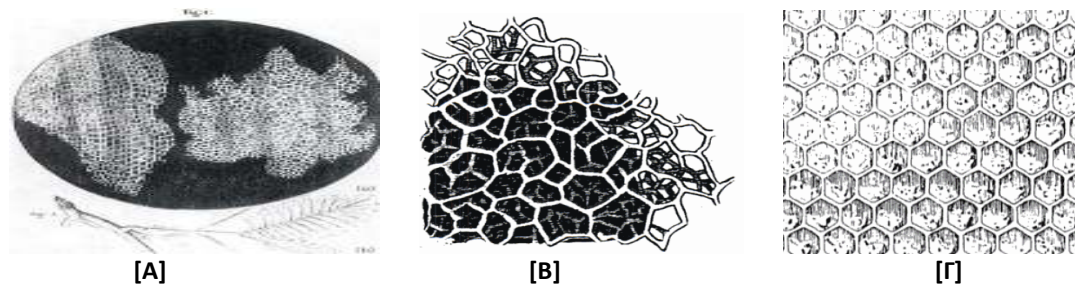
Τέτοια σώματα αφθονούν στο φυσικό περιβάλλον, με αντιπροσωπευτικότερα τα παραδείγματα από τη βιόσφαιρα, το ξύλο, το φελλό, το σπόγγο, το κοράλλι, ενώ από τη σκοπιά της ανόργανης ύλης, συνήθως αναφέρονται τα ορυκτά όπως οι ηφαίστειοι και οι κισηρώδεις τόφφοι (η «ελαφρόπετρα») καθώς και πληθώρα προϊόντων και συνθετικών υλών, παρασκευασμένων βιομηχανικά και / ή εργαστηριακά.

Ωστόσο διευκρινίζεται ότι ο όρος «**κύτταρο**» (“**cell**”) στο πλαίσιο της θεωρίας των **Κελλωτών Στερεών**, αναφέρεται μόνο προσεγγιστικά στη δομολειτουργική μονάδα οργάνωσης της σωματικής υπόστασης των πολυκύτταρων οργανισμών και μόνον υπό τις εξής δυο προϋποθέσεις :

**α]** και για το φυτικό αλλά και για το ζωικό ιστό, θα εκλαμβάνεται συστηματικά ως αμελητέα η παρουσία της εξωκυττάριας ύλης (“*ExtraCellularMatrix*”, “*ECM*”), ενώ στην περίπτωση όπου αφθονεί, θα συνυπολογίζεται ως μια μεταβλητή που συνηγορεί ευνοϊκά υπέρ της ακαμψίας της κυτταρικής επιφάνειας, ή με άλλα λόγια αποτελεί το γεωμετρικό ισοδύναμο μιας φυσικής προέκτασής της. Έτσι στις ειδικές περιπτώσεις των ερειστικών ιστών όπως του οστίτη και του χόνδρου, η παραδοχή αυτή είναι σε αποδεκτό συμβιβασμό με την πληθωρική ιστοειδική παρουσία της, ενώ η περίπτωση της λέμφου και του αίματος, η υδροστατική πίεση σε συνδυασμό με την ασυμπίεστότητα που χαρακτηρίζει το πλάσμα ως υγρό και η εφαρμογή της αρχής μετάδοσης των πιέσεων του Πασκάλ, παρέχει ένα μέτρο των ακραίων τιμών για την ελαστικότητα της πλασματικής μεμβράνης του ερυθροκυττάρου.

**β]** ειδικά για το ζωικό κύτταρο, καθώς στερείται της ερειστικής υποδομής εξειδικευμένου εξωκυττάριου τοιχώματος, η αρνητική συνεισφορά της εγγενούς *ρευστότητας* της πλασματικής μεμβράνης στην «*ακαμψία*» (“*rigidity*”) της κυτταρικής επιφάνειας θα παραθεωρείται, στο βαθμό που ο βιολογικός ρόλος της δεν επηρεάζει τις τοπολογικές ιδιότητες των διακυτταρικών επαφών. Εξάλλου, η δυσμενής συμβολή της στη στερεότητα (“*rigidity*”) της πλασματικής μεμβράνης αντισταθμίζεται από τον υποστηρικτικό ρόλο του υπομεμβρανικού κυτοσκελετού (“*cortex*”) και επιπλέον το «βεληνεκές» της μορφογόνου επίδρασής της στην κυτταρική σχηματοποίηση περιορίζεται στην υποκυτταρική (νανομετρική) κλίμακα διαστάσεων, που είναι λειτουργικώς διαφορετική από εκείνη (μικρομετρική) όπου αποκτούν φυσική σημασία οι μετρήσεις και οι εξισώσεις που πλαισιώνουν τη θεώρηση του ζωικού ιστού ως «*κελλωτού στερεού*». Επιπρόσθετα, η «*ανελαστικότητα*» (“*rigidity*”) της κυτταρικής επιφάνειας νοείται ως μια δυναμική κυτταροβιολογική ιδιότητα που αντανακλά τη συνισταμένη συμβολή των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ λιπιδικής διπλοστοιβάδας, υπομεμβρανικού φλοιού και κυτοσκελετού με την εξωκυττάρια ύλη (“*ECM*”) και τα παρακείμενα (εφαπτόμενα και μη) κύτταρα, στο πλαίσιο της ομοιοστατικής διατήρησης του *κυτταρικού σχήματος* (“*cell shape*”). Τα τυπικά παραδείγματα της πλασμόλυσης του φυτικού κυττάρου (αποκόλλησης της πλασματικής μεμβράνης από την ενδοκυττάρια όψη του κυτταρικού τοιχώματος κατά την εμβάπτιση σε υπέρτονο διάλυμα) και της αιμόλυσης του ερυθροκυττάρου (διάρρηξης της πλασματικής μεμβράνης κατά την εναιώρηση σε υπότονο

διάλυμα), αισθητοποιούν εποπτικά τους φυσιολογικούς όρους που σκιαγραφούν την αναγκαιότητα ομοιοστατικής ρύθμισης του *κυτταρικού σχήματος* (“*cell shaping*”).



**Εικόνα 11.6.64.:** [A] Ακτινικές και εφαπτομενικές διατομές φελλού ιχνογραφημένες με βάση τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις του **Robert Hooke (1664)**. Αποτυπώνουν πιστά την αδρή (μη κανονική) εξαγωνική σχηματοποίηση σε ένα επίπεδο και την πρισματική (κυτιόμορφη, “*box-like shape*”) σε άλλο, κάθετο προς το προηγούμενο. [B] Σκίτσο του κοινού σπόγγου που φιλοτεχνήθηκε από τον ίδιο αποτυπώνοντας λεπτομερειακά την ασυνήθιστη «συνδεσιμότητα». [C] Η κανονική εξαγωνική σχηματοποίηση της μελισσοκομικής «κηρήθρας».

Στην περιληπτική αυτή εισήγηση τεκμηριώνεται αρχικά μια συσχέτιση τυπικών εννοιών που επιστρατεύονται από την οικεία **Ευκλείδεια** γεωμετρία (κορυφές, ακμές-πλευρές, έδρες) με υποτυπώδεις τοπολογικές μεταβλητές (συνδεσιμότητα, *connectivity*). Καταστρώνεται μια κατάλληλη προσαρμογή των νόμων **Euler** και **Aboan-Weaire** στον κανόνα **Lewis (Lewis's Rule)** υπό τη μορφή γραμμικών εξισώσεων, αποσκοπώντας σε μια γενίκευση (“*extrapolation*”) της στατιστικής περιγραφής στην τρίτη διάσταση. Περαιτέρω, με το λιτό αυτό μαθηματικό υπόβαθρο της θεωρίας των **Κελλωτών Στερεών** επιχειρείται ένας αδρός γεωμετρικός παραλληλισμός με τα *in vitro* τοπογραφικά μοτίβα (“*in vitro patterns*”) που επαναλαμβάνουν στερεότυπα οι μεσεγχυματικοί πληθυσμοί όταν ο πολλαπλασιασμός (ή επέκτασή) τους περιορίζεται στις δυο από τις τρεις διαστάσεις του «*ανατομικού χώρου*» τον οποίο φυσιολογικώς εποικίζουν στο *in vivo* περιβάλλον του πολυκύτταρου οργανισμού. Στη συνέχεια η συλλογή των τοπολογικών σχέσεων που καταστρώθηκαν για τα διδιάστατα και τριδιάστατα κελλωτά στερεά αβιοτικού χαρακτήρα, αξιοποιείται για μια ενδεικτική παραμετροποίηση των *in vitro* κυτταροβιολογικών διεργασιών που παρατηρούνται συστηματικά στην εργαστηριακή ρουτίνα των συμβατικών κυτταροκαλλιεργειών και αφορούν στην εγκατάσταση («εμβολιασμό», “*seeding*”) και επίστρωση («επιταπήτωση», “*spreading*”) των κυττάρων καθώς και στον κορεσμό (“*aggregation*”, “*confluency*”) του αναπτυσσόμενου πληθυσμού. Παράλληλα, στα διαθέσιμα ιστολογικά παρασκευάσματα από αναπτυσσόμενα και αναγεννημένα (*regenerates*) άκρα προνυμφών αμφιβίων, επιδιώκεται μια ανάλογη ερμηνεία της ανατομικής στερεολογίας (“*stereology*”) των προχονδροκυττάρων στις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (“*mesenchymal condensations*”), με τη βοήθεια των οικείων γεωμετρικών και τοπολογικών όρων που καταστρώθηκαν για τα αβιοτικά κελλωτά στερεά.

## 6.5.2. Οι δύο τύποι κελλωτών στερεών

### 6.5.2.α Η τοπολογική παράμετρος της «διαστατικότητας» (“*dimensionality*”)

Όλα τα κελλωτά στερεά διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, με κριτήριο την τοπολογική διάσταση (**2η ή 3η**) στην οποία υλοποιούνται οι κύριες διεργασίες σχηματοποίησης των κελλιών και διαμόρφωσης του μεγέθους αυτών. Έτσι αναγνωρίζονται κυψελωτά στερεά δυο διαστάσεων, οι αποκαλούμενες «*κηρήθρες*» (“*honeycombs*”), για τις οποίες οι τιμές των παραμέτρων που οριοθετούν τα μοναδιαία σχήματα σε κάποιο τουλάχιστον από τα δυνατά επίπεδα συμμετρίας του δικτύου είναι παγιωμένες και, δεδομένης της τοπολογικής αλληλεξάρτησης των μοναδιαίων κελλιών, κατά την επέκταση του δικτύου μεταβάλλονται με περιορισμένη διακύμανση, κατά μήκος και πλάτος όλης της διαδίκτυωμένης μάζας του αναπτυσσόμενου συστήματος. Με άλλα λόγια οι

τιμές των μεταβλητών που οριοθετούν τις υπομονάδες επαναλαμβάνονται στερεότυπα ακόμη κι αν θεωρηθεί ότι η επέκταση της μάζας του δικτύου τους καταλαμβάνει και την τρίτη διάσταση του Ευκλείδειου χώρου. Έτσι, οργανώνονται από τοπολογικής άποψης τα κυψελιδωτά στερεά **τριών (3)** διαστάσεων, οι επονομαζόμενοι «**αφρώδεις τύποι**» (ή απλώς «**αφροί**», “**foams**”), για τη σχηματοποίηση των οποίων οι τιμές των παραμέτρων που οριοθετούν τις υπομονάδες συμπληρώνονται χωροπληρωτικά και κυμαίνονται πλέον σε συνάρτηση με την χωροταξική κατανομή της μάζας.

Αυτή η διάκριση γίνεται εποπτικά αντιληπτή, με την εισήγηση της «**σχετικής πυκνότητας**», θεωρούμενης με την τοπολογική σημασία της και η οποία λαμβάνει μόνο μια τιμή για ολόκληρη την έκταση ενός διδιάστατου κυψελωτού, ενώ στην περίπτωση ενός τριδιάστατου κυψελωτού, η στερεομετρική διευθέτησή της ενδέχεται να αναλύεται σε δυο ή περισσότερες διακριτές τιμές (διαφορετικές για κάθε μια από τις αλληλοκάθετες διατομές ή επίπεδα συμμετρίας του συστήματος), πράγμα που εξάλλου αποτελεί τον κανόνα. Ως «**σχετική πυκνότητα**» (“**relative density**”) ορίζεται ο λόγος της (τοπολογικής) πυκνότητας  $\rho^*$  του συνολικού κελλωτού στερεού (που εξαρτάται από τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά του) προς την (φυσικοχημική) πυκνότητα του υλικού  $\rho$  από το οποίο είναι συγκροτημένες οι δομικές υπομονάδες του στερεού (που είναι ανεξάρτητη από τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά του), δηλαδή ισχύει η συνθήκη:

$$0 \leq \frac{\rho^*}{\rho} \leq 1 \quad (6.5.2.1.)$$

#### 6.5.2.b. Η τοπολογική παράμετρος της «συνδεσιμότητας» (“**connectivity**”)

Γενικά η αρχιτεκτονική δομή των κελλωτών στερεών κυμαίνεται από την εύτακτη, σχεδόν τέλεια κανονική διάταξη της μελισσοκομικής κηρήθρας μέχρι την άτακτη τριδιάστατη δικτυώδη διάπλαση των σπόγγων. Με τον όρο «**συνδεσιμότητα**» (“**connectivity**”) νοείται το πλήθος των «πολυπλοκότερων» γεωμετρικών στοιχείων που συγκλίνουν ή αποκλίνουν ως προς ένα «απλούστερο», κατά τρόπο ώστε ο φορέας (διεύθυνσή) τους να αλλάζει επίπεδη γωνία. Συνεπώς αναφέρεται στο πλήθος των εδρών ως προς μια ακμή για τα τριδιάστατα, καθώς και στο πλήθος των ακμών ανά κορυφή για τα διδιάστατα κελλωτά στερεά. Η συσχέτισή της με την (προαναφερθείσα) τοπολογική παράμετρο που αφορά στις διαστάσεις του επιπέδου και / ή του χώρου, αποσαφηνίζει τις δυο εκδοχές του ορισμού της «**συνδεσιμότητας**»:

Ο όρος «**συνδεσιμότητα εδρών**» (*face-connectivity*, **Z<sub>f</sub>**) περιγράφει τον αριθμό των εδρών (*faces*) που τέμνονται σε μια ακμή. Συνήθως ισούται με τρία [**Z<sub>f</sub> = 3**] για «κελλωτά στερεά τύπου αφρού» (“**foams**”) αλλά φτάνει και μέχρι την τιμή έξι [**Z<sub>f</sub> = 6**].

Ο όρος «**συνδεσιμότητα ακμών**» (*edge-connectivity*, **Z<sub>e</sub>**) απαριθμεί το πλήθος των ακμών (*edges*) που διασταυρώνονται σε έναν κόμβο ή κορυφή (*vertex*). Συνήθως ισούται με τρία [**Z<sub>e</sub> = 3**] σε «κελλωτά στερεά τύπου κηρήθρας» (“**honeycombs**”) και τέσσερα [**Z<sub>e</sub> = 4**] σε “**foams**”, αν και τον υπερβαίνει συχνά.

Η εισήγηση της μεταβλητής της «συνδεσιμότητας» επιτρέπει τη σύζευξη των μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στα δυο διακριτά επίπεδα οργάνωσης της κελλωτής διευθέτησης (των μεταβολών στο σύστημα των γραμμών και των μεταβολών στο σύστημα των σχημάτων), υπό τη μορφή μιας συνοπτικής γραμμικής σχέσης. Η χρηστική αξία της θα αποκαλυφθεί στη συνέχεια, κατά την περιγραφή τυπικών διδιάστατων και τριδιάστατων κελλωτών στερεών και κατά την παράθεση των τριών μαθηματικών νόμων που ποσοτικοποιούν τους γεωμετρικούς μετασχηματισμούς που συνοδεύουν την επέκτασή (ή ανάπτυξή) τους ([**Εικ. II.6.67.**], [**Εικ. II.6.69.**], [**Εικ. II.6.73.**], [**Εικ. II.6.75.**], [**Εικ. II.6.79.**])

### 6.5.2.c. Προοπτικές που εγείρει η γεωμετρική θεώρηση των κυψελωτών στερεών

Γενικά, οι φυσικές ιδιότητες οποιουδήποτε κυψελωτού στερεού εξαρτώνται από τον σχετικό καταμερισμό της μάζας του στις ακμές και στις έδρες που σε τελική ανάλυση το συναρμολογούν [**Εικ. 22., Εικ. 23., Εικ. 24.**]. Κατά συνέπεια είναι πρωταρχικής σημασίας η ποσοτικοποίηση της αρχιτεκτονικής της δόμησής του, ώστε να καταστεί δυνατή, κατά πρώτον η μαθηματική διατύπωση των τοπολογικών κανόνων που διέπουν τη σχηματοποίηση των δομικών υπομονάδων και τη διακύμανση των διαστάσεών τους και κατά δεύτερον η στατιστική περιγραφή των «ατομικών μετασχηματισμών» (“transformations”) στους οποίους υποβάλλονται τα μοναδιαία κελιά, όχι απομονωμένα αλλά σε συνάρτηση με τις τοπολογικές ιδιότητες που διέπουν τις «τοπικές γειτονίες» και κατ’επέκταση ολόκληρο το δίκτυο διασύνδεσης. Η πρακτική αξία κάθε τέτοιου τοπολογικού κανόνα έγκειται στα εξής :

**1]** εισαγάγει περιορισμούς στο εύρος διακύμανσης του μεγέθους (“cell size polydispersity”) των κελιών, με την έννοια της οριοθέτησης μέγιστης και ελάχιστης επιτρεπτής τιμής για δεδομένη γεωμετρική μεταβλητή (ακμής ή έδρας) [βλέπε **Εικόνα 4.**]. Η περιοριστική αυτή συνθήκη επιτρέπει την (στατιστική) ποσοτικοποίηση της εξάρτησης των γεωμετρικών παραμέτρων που ελέγχουν τις διαστάσεις των μοναδιαίων κελιών από τις τοπολογικές, που αφορούν το σχήμα τους.

**2]** τυποποιεί υπό τη μορφή απλής εξίσωσης την «ικανή και αναγκαία συνθήκη» που συσχετίζει τις διαστάσεις των κελιών που συναπαρτίζουν μια τοπική ομάδα («γειτονιά») μιας περιορισμένης έκτασης, με εκείνες μιας οποιασδήποτε άλλης ομάδας της συνολικής διάταξης, λιγότερο ή περισσότερο γειτονικής, μέσω των ακέραιων τιμών που προσλαμβάνει η τοπολογική παράμετρος της «συνδεσιμότητας» (“connectivity”) των ακμών και / ή των εδρών. Έτσι σε μια μεμονωμένη τοπική διευθέτηση (μοτίβο) των κελιών ενός τέτοιου δικτύου, αντιστοιχίζονται τιμές «συνδεσιμότητας» που ενδεχομένως δεν επαναλαμβάνονται στο εγγύτερο ή απώτερο περιβάλλον της, επομένως είναι μοναδικές για την εντοπισμένη αυτή γειτονιά, ενώ παράλληλα εξαρτώνται από τις αντίστοιχες τιμές «συνδεσιμότητας» της υπόλοιπης συνάθροισης. Αυτή η συνθήκη αλληλεξάρτησης θεμελιώνεται:

**[2/i]** στο **τοπολογικό καθεστώς των συμμεταβολών** που συμπαρασύρουν σαρωτικά όλα τα γεωμετρικά στοιχεία (κορυφές, ακμές, έδρες) που διασυνδέονται στην κελλωτή διάταξη καθώς και

**[2/ii]** στο **στατιστικό χαρακτήρα** που διέπει το μετασχηματισμό σύσσωμης της κελλωτής διευθέτησης κατά την πληθυσμιακή επέκταση των μοναδιαίων κελιών της και που απορρέει από αυτές ακριβώς τις συμμεταβολές των γεωμετρικών στοιχείων, τα οποία μεσολαβούν ως «συνοριακές ακμές» και «συνοριακές επιφάνειες». Κατά συνέπεια παρέχει τη δυνατότητα αναπαράστασης των μετασχηματισμών που διανύει ένα δεδομένο τοπογραφικό μοτίβο κατά τη μετάπτωσή του σε κάποιο άλλο, υπό μορφή μιας ακολουθίας διακριτών στιγμιότυπων.

Πρόκειται για ένα «καθεστώς επισκόπησης και επανατροφοδότησης» οποιασδήποτε τυχαίας απόκλισης («διαταραχή», *dislocation*) του μεγέθους ή του σχήματος κελλιού από τη μέση τιμή (μεγέθους και σχήματος) της διάταξης, στο εγγύτερο ή απώτερο περιβάλλον (γειτονιά) που πλαισιώνει τη «διαταραχή». Η επανατροφοδότηση αυτή καθοδηγεί περαιτέρω τις αντισταθμιστικές συμμεταβολές που συμμορφώνουν ολόκληρο το περιβάλλον δίκτυο προς την αφομοίωση της διακύμανσης (*dislocation*). Οι γεωμετρικοί μετασχηματισμοί τους οποίους επιβάλλουν οι τοπολογικοί κανόνες (π.χ. η συνθήκη Euler) «αντιπαραβάλλουν» κατά συνεχή τρόπο την τοπική διαταραχή έναντι του συνολικού μοτίβου (“pattern”), με αποτέλεσμα η έκβαση των διαδοχικών μεταπτώσεων του να υιοθετεί στατιστικό (τυχαίο ή πιθανοκρατικό) χαρακτήρα. Συνεπώς, άλλοτε η έκβαση των μετασχηματισμών διατηρεί την αρχική μορφή του μοτίβου, με «ήπιες συμβιβαστικές ανακατατάξεις» (π.χ. με μετατόπιση του τοπικού μοτίβου σε άλλη θέση του δικτύου) κι άλλοτε η έκβαση των μετασχηματισμών αλλοιώνει το μοτίβο εξαιτίας της παγίωσης και διασποράς της διακύμανσης σε όλο το δίκτυο. Επομένως η προκαθορισμένη –από τους τοπολογικούς κανόνες– διαδοχή των μετασχηματισμών ανάγεται σε μια προβλέψιμη ακολουθία πεπερασμένου αριθμού

στιγμιότυπων, της οποίας το πλήθος των μεταβατικών μοτίβων (“*transient patterns*”) εξαρτάται από το είδος της γεωμετρικής μεταβλητής που αλληλεπιδρά με τους τοπολογικούς αυτούς κανόνες:

**[2/α]** αν το είδος της γεωμετρικής μεταβλητής μέσω της οποίας υλοποιείται και παρεισφρύει στο δίκτυο η τοπική διαταραχή (*dislocation*) αφορά την **ακμή** του μοναδιαίου κελλιού, τότε ο μορφογόνος αντίκτυπος που απειλεί να επιφέρει στη συνολική διεύθυνση είναι δυνατόν να αντισταθμιστεί χωρίς μεσολάβηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά μόνο με μεταβολή κάποιας κυτταροβιολογικής μεταβλητής, όπως για παράδειγμα μέσω του ρυθμού μεταβολής του μεγέθους κελλιού εξαιτίας κυτταρικής αύξησης, ή μέσω τροποποίησης του κυτταρικού σχήματος εξαιτίας διαφοροποίησης είτε εξαιτίας μιας ιστοειδικής μορφής κυτταρικής αύξησης (π.χ. υπερτροφικής αύξησης χονδροκυττάρων, λιποκυττάρων, κλπ) ([Εικ. II.5.37.], [Εικ. II.5.38.]).

**[2/β]** αν το είδος της γεωμετρικής μεταβλητής μέσω της οποίας υλοποιείται και παρεισφρύει στο δίκτυο η τοπική διαταραχή (*dislocation*) αφορά την **έδρα** του μοναδιαίου κελλιού, τότε ο μορφογόνος αντίκτυπος που απειλεί να επιφέρει στη συνολική διεύθυνση είναι δυνατόν να αντισταθμιστεί αποκλειστικά με τη μεσολάβηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επειδή θα συνοδεύεται από μορφογόνους μετασχηματισμούς που θα αλλάξουν τις τιμές των τοπολογικών ιδιοτήτων (για παράδειγμα της προϋπάρχουσας τιμής συνδεσιμότητας), προκειμένου να αφομοιωθούν στην καθεστική διεύθυνση και τα νεότερα κύτταρα που επισωρεύουν οι κυτταροδιαιρέσεις.

### 6.5.3. Διαστατικότητα και ιστροπισμός / ανιστροπισμός των μη γεωμετρικών (τοπολογικών) ιδιοτήτων του κυψελωτού στερεού

Η αλληλεπίδραση των τοπολογικών χαρακτηριστικών του κελλωτού στερεού με τη (φυσικοχημική ή βιολογική) μορφογόνο διεργασία που σχηματοποιεί τα μοναδιαία κελλιά του, καθορίζει την ταξινόμηση των φυσικών ιδιοτήτων τους σε δυο κλάσεις:

α) οι ιδιότητες **«ισότροπου»** χαρακτήρα (“*isotropic*”) απορρέουν από τις ισότιμες διαστάσεις και την κανονικότητα των σχημάτων των κελλιών και αντικατοπτρίζουν την ομοιογενή κατανομή της μάζας τους,

β) οι ιδιότητες **«ανισότροπου»** χαρακτήρα (“*anisotropic*”) οφείλουν την προέλευσή τους στη διακύμανση του σχήματος και των διαστάσεων των μοναδιαίων κελλιών, που αντανakλούν ετερογενή καταμερισμό της μάζας τους.

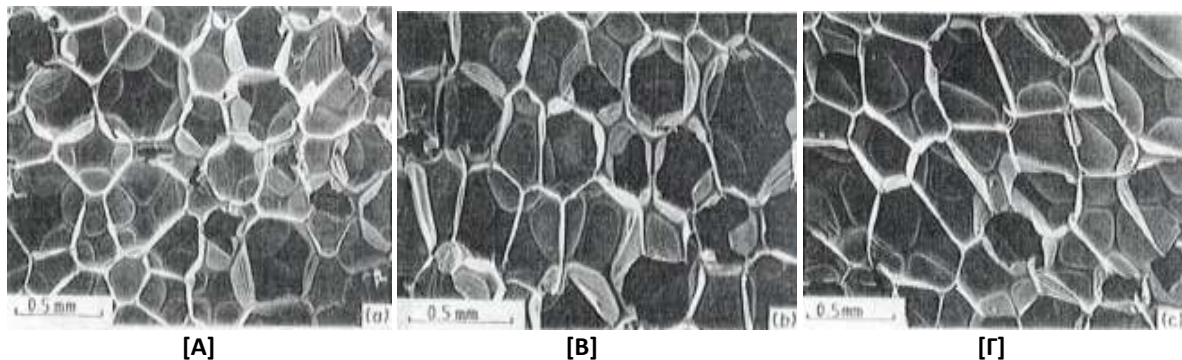
Αυτός ο ειδικός **«ανιστροπισμός μεγέθους»** που εκπορεύεται από τη διακύμανση του μεγέθους του κελλιού (“*cell size dispersity*”), η οποία συνοδεύει την ανισοκατανομή της μάζας που εισαγάγει στο κελλωτό δίκτυο η παραγωγική διεργασία που το επεκτείνει, μπορεί να ποσοτικοποιηθεί αφενός σε συνάρτηση προς τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του κελλιού και αφετέρου σε συνάρτηση με το σχήμα του κελλιού. Την ανάδειξη αυτής της σημαντικής συσχέτισης μεταξύ της γεωμετρίας του μοναδιαίου κελλιού με την τοπολογία του δικτύου στο οποίο συμμετέχει, επιδιώκουν τα παραδείγματα κελλωτών διατάξεων που παρατίθενται [Εικ. II.5.48.].

#### 6.5.3.α. Η αβιοτική εκδοχή κελλωτού στερεού (“*cellular solid*”):

Κατά κανόνα τα τριδιάστατα κυψελωτά στερεά («αφρώδους τύπου», “*foams*”) υπόκεινται σε πολύ μεγαλύτερη διακύμανση όσον αφορά στο μέγεθος και στο σχήμα των κελλιών καθώς και στη συνολική αρχιτεκτονική δομή (“*pattern*”), εν’συνγκρίσει προς ό,τι αφορά στα διδιάστατα κυψελιδωτά («τύπου κηρήθρας», “*honeycombs*”). Ο φελλός και η «ξυλεία μπάλας» συναρμολογούνται από **«κελλιά κλειστής έδρας»** (συμπαγούς επιφάνειας αλλά όχι και συμπαγούς περιεχομένου, “*closed cell*”), τόσο κανονικά διατεταγμένα όσο σχεδόν είθισται για μια «κηρήθρα» με μεγάλο βαθμό κανονικότητας. Ο σπόγγος, καθώς και οι παραλλαγές του σπογγώδους οστού σε κυμαινόμενο βαθμό, δομούνται από **«κελλιά ανοιχτής έδρας»** (διάτρητης επιφάνειας, “*opened*”).



*cell*”), που διαμορφώνουν ένα «ανοιχτό ή αραιό δίκτυο» από δέσμες ύλης με «συνδεσιμότητες (εδρών)» που κυμαίνονται μεταξύ των τιμών τρία [ $Zf = 3$ ], τέσσερα [ $Zf = 3$ ], πέντε [ $Zf = 3$ ], ακόμη κι έξι [ $Zf = 3$ ]. Τα κοράλλια και οι ενδοσκελετοί των κεφαλόποδων μαλακίων (π.χ. «κόκκαλο σουπιάς») είναι έντονα ανισοτροπικά καθώς τα ήδη επιμηκυμένα κελλιά διευθετούνται σε παράλληλες συστοιχίες, πολώνοντας περαιτέρω την ασύμμετρη αρχιτεκτονική. Ο εκλεκτικός προσανατολισμός ενός ασύμμετρου στοιχείου (π.χ. ακμής) προς ορισμένη κατεύθυνση, παράγει ως συνέπεια την έκδηλη εξάρτηση μιας ιδιότητας από τη διεύθυνση (φορέα) της μέτρησής της. Πάντως η πλειονότητα των τριδιάστατων κυψελωτών στερεών διέπονται από εκείνο το είδος ανισοτροπισμού μεγέθους κελλιού που εκπορεύεται από την ασυμμετρία των διαστάσεων του μοναδιαίου κελλιού και σχετίζεται με τις δυσανάλογες διαφορές στα μήκη των ακμών και / ή στα εμβαδά των εδρών, από κελλί σε κελλί.

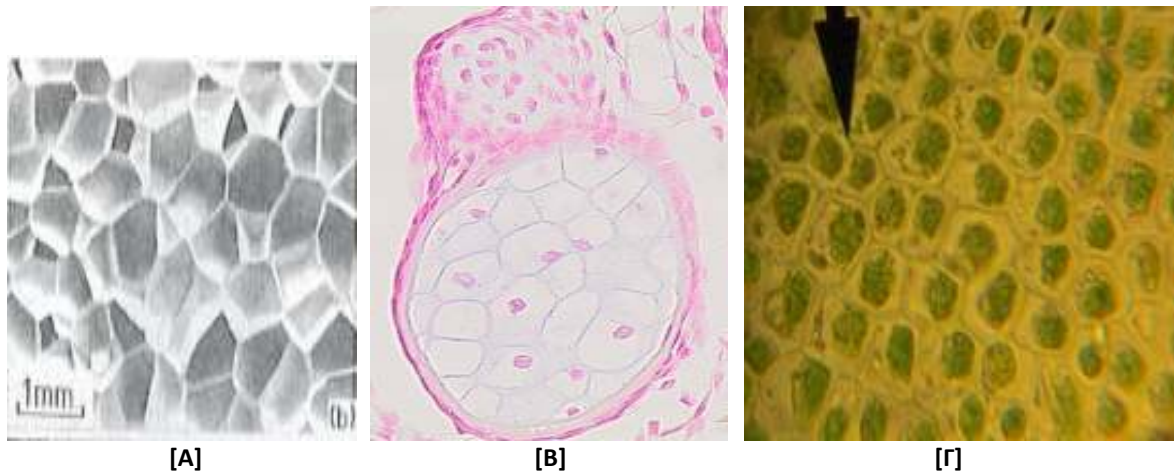


**Εικόνα II.6.65.:** Τρεις αλληλοκάθετες διατομές που αποτυπώνουν την τριδιάστατη κυψελωτή αρχιτεκτονική («τύπου «αφρού») μιας ανισοτροπικής μάζας πολυουρεθάνης. **[A]** Τομή κάθετη στη διεύθυνση έκπτυξης του στερεού. **[B], [C]** Δυο τομές που απεικονίζουν επίπεδα, οβελιαία διατεταγμένα ως προς τη διεύθυνση έκπτυξης του κυψελωτού. Η διατομή **[C]** έχει περιστραφεί κατά  $45^\circ$  περίπου (ως προς τη διεύθυνση έκπτυξης του «αφρού») στην αντικειμενοφόρο τράπεζα του μικροσκοπίου.

#### 6.5.3.b. Η συμμετοχή της διεργασίας σχηματοποίησης στη συσσώρευση των κελιών του κελλωτού στερεού

Η βελτιστοποίηση της χωροπληρωτικής ταξινότησης, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι η μοναδική (ή αποκλειστική) συνιστώσα που καθοδηγεί τη σχηματοποίηση του κελλιού και τη διαμόρφωση του τοπογραφικού μοτίβου (*“pattern”*). Όταν συνδράμουν περισσότεροι περιοριστικοί παράγοντες στη διάπλαση του κελλωτού στερεού, τότε το πραγματικό σχήμα που υιοθετεί η υπομονάδα αποκλίνει από το αρχέτυπο κατά τρόπο ώστε το γεωμετρικό της ισοδύναμο να αντιπροσωπεύεται από περισσότερες της μιας, εναλλακτικές διαμορφώσεις. Προκύπτει συνεπώς ένα φάσμα από διαθέσιμα σχήματα με παραλλαγές στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά, κατάλληλες για την αναπλήρωση ή για τη συμπλήρωση των αποκλίσεων από τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά του αρχέτυπου σχήματος. Η πολλαπλότητα (ή «πλουραλισμός») των δυνατών διαμορφώσεων για το μοναδιαίο κελλί συμβάλλει στον ανισοτροπισμό σχήματος και διαστάσεων των υπομονάδων και κατ’επέκταση στην παραγωγή ποικιλότητας για τα πιθανά τοπογραφικά μοτίβα της κελλωτής διάταξης (*“aggregation pattern”*).

Παραδείγματος χάριν, κατά την οργάνωση ενός τριδιάστατου κελλωτού στερεού (τύπου «αφρού»), αν υποθεθεί ότι η μορφογόνος διεργασία συσσωρεύει συστηματικά τη διαθέσιμη μάζα στις ακμές των κελιών, τότε θα διαμορφώσει ένα τριδιάστατο ικρίωμα από λεπτές και ελαφρές ελασματοειδείς έδρες που πλαισιώνονται από δυσανάλογα βαρύτερες ακμές. Έτσι, αν η επιφανειακή τάση αντιπροσωπεύει την καθοδηγητική συνιστώσα της διεργασίας σχηματοποίησης των κελιών και της δικτύωσής τους, τότε η συνδεσιμότητα στην παραγόμενη στερεοδιάταξη θα ευνοεί μια τοπολογική συνθήκη τέτοια, ώστε τέσσερις ακμές θα διασταυρώνονται υπό μια γωνία  $109,4^\circ$  σε κάθε κορυφή και τρεις έδρες θα τέμνονται σε κάθε ακμή [Εικ. II.6.66.] .

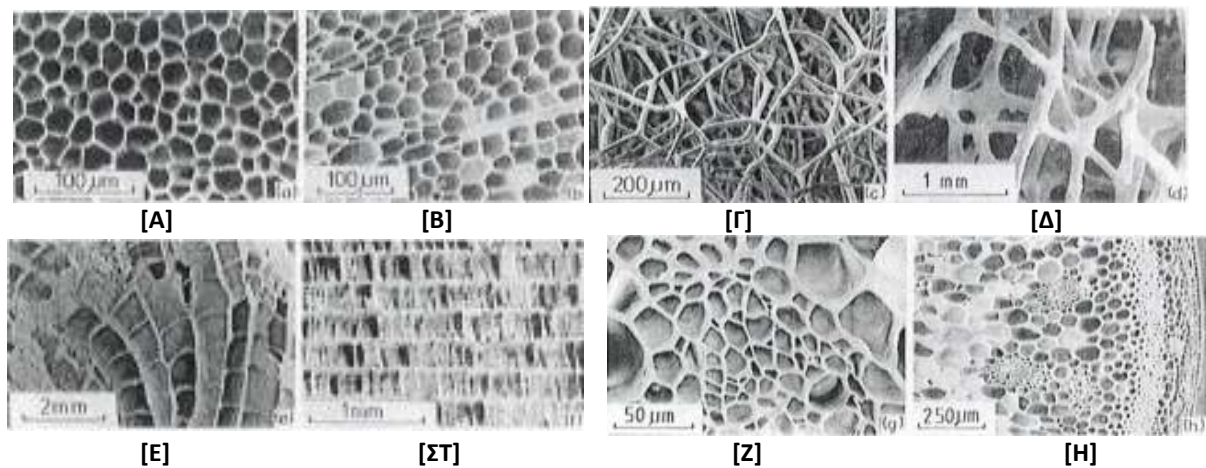


**Εικόνα 6.66.:** [A] Τριδιάστατο κελλωτό στερεό («αφρώδους τύπου») αποτελούμενο από κελιά κλειστής έδρας, παρασκευασμένο από **πολυαιθυλένιο**. [B] Εγκάρσια διατομή μεσεγχυματικής συμπύκνωσης άκρου δακτύλου από προνύμφη του αμφιβίου ***Rana temporaria*** [Γ] Οβελιαία διατομή της επιδερμίδας από νηματώδη θαλλό του υδρόβιου είδους, ***Cladophora sp.p.***

### 6.5.3.c. Η βιοτική εκδοχή του κελλωτού στερεού (“cellular solid”)

Ειδικότερα για τα πολυκυτταρικά συστήματα όπως εκείνα των ζωικών ερειστικών ιστών (π.χ. για τις καταβολές των χόνδρων), επισημαίνεται ότι η βιογένεση των εμβρυικών αξόνων ασυμμετρίας είναι αυτοκαθοριζόμενη διεργασία σε πρώιμη φάση (φάση καθορισμού, *determination*) της οντογένεσης, δηλαδή τελεί υπό την αναπτυξιακή καθοδήγηση του γενετικού προγράμματος. Αλλά μεταγενέστερα, κατά τη διαφοροποίηση (*differentiation*) η εύρυθμη κλιμάκωση του χονδροκυτταρικού πληθυσμού μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η εύτακτη αύξηση της βιομάζας της μεσεγχυματικής συμπύκνωσης (*mesenchymal condensation*) μέσω κυτταρικής υπερτροφίας και συσσώρευσης εξωκυττάριας ύλης (“ECM”), ευοδώνονται υπό καθεστώς επανατροφοδοτικής αλληλεξάρτησης ως προς το πεδίο των μηχανικών τάσεων που αναπτύσσονται στον εμβρυικό ιστό της καταβολής του άκρου (*limb bud*). Το τοπολογικό καθεστώς της δικτύωσης των μεσεγχυματικών κυττάρων επαναλαμβάνεται απaráλλακτο και στην περίπτωση της δευτερογενούς ανάπτυξης (αναγέννησης), όταν τα βλαστηματικά κύτταρα (*blastemal cells*) συναθροίζονται στο αναγεννητικό βλάστημα (*regenerative blastema*) μέσω της αποδιαφοροποίησης (*dedifferentiation*), υποδηλώνοντας ότι η μορφογενετική χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) και στις δυο περιπτώσεις απορρέει από την αξιοσημείωτη πλαστικότητα του προτύπου των διακυτταρικών επαφών (*conjugation pattern plasticity*). Τα χονδροκύτταρα αναδιαμορφώνουν αδιάκοπα τη διεύθυνση των μηχανικών τάσεων που υποδέχονται, συναρτήσκει του αριθμού των παρόντων κυττάρων μέσω μιας διαδικασίας «αναδόμησης» (*remodelling*), η οποία αν και καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό γενετικώς, διατηρεί ωστόσο κλάσμα της προσαρμοστικής πλαστικότητας των πρωιμότερων αναπτυξιακών σταδίων και σε μεταγενέστερες ηλικίες, ενώ επιδέχεται φυσιολογική ή και παθολογική τροποποίηση, σε οψιμότερες (γήρας).

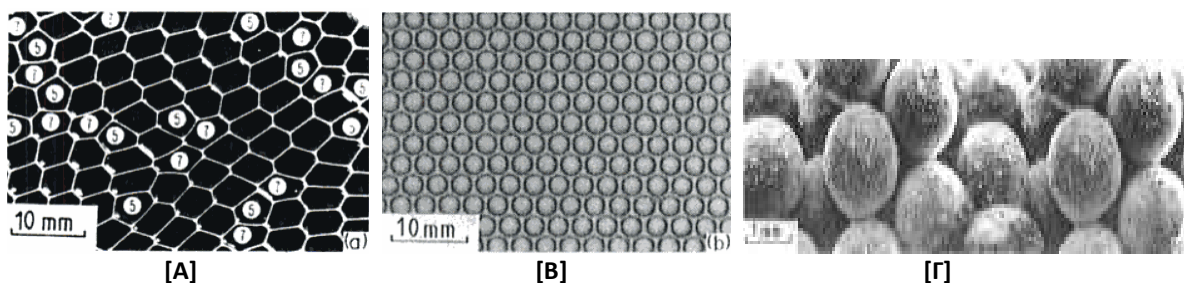
Με άλλα λόγια αρχικά ο καταμερισμός των τάσεων ξεκινά στην πρώιμη μεσεγχυματική συμπύκνωση ως αμελητέα μορφογόνος συνιστώσα εξαιτίας του πρωτοταγούς ρόλου της μίτωσης που διευθετεί το πολυκυτταρικό σύστημα των προχονδροκυττάρων, σε συμμόρφωση με τοπολογικές παραμέτρους, όπως για παράδειγμα εκείνες που επικεντρώνονται στην ελαχιστοποίηση του λόγου της επιφάνειας υποδοχής των τάσεων προς τον όγκο της κελλωτής διάταξης. Αλλά καθώς η «επισκόπηση» του πεδίου τάσεων ανατίθεται προοδευτικά στον έλεγχο της ιστικής ομοιοστασίας, η αρχική διεύθυνση των μεσεγχυματικών κυττάρων αναδιαμορφώνεται επανατροφοδοτικά (“*remodelling*”) για να ανταποκριθεί στις μεταβαλλόμενες αναπτυξιακές προτεραιότητες (π.χ. βιογένεση επιφυσιακής πλάκας μακρού οστού, κλπ).



**Εικόνα II.6.67.:** Τυπικά «κελλωτά στερεά» ευρέως διαδεδομένα στο φυσικό περιβάλλον: **[Α]** φελλός (*cork*), **[Β]** «ξυλεία μπάλα» (*balsa*), **[Γ]** σπόγγος (*sponge*), **[Δ]** σπογγώδες οστό (*cancellous bone*), **[Ε]** κοράλλι (*coral*), **[ΣΤ]** κόκαλο σουπιάς (*cuttlefish bone*), **[Ζ]** φύλλο του φυτού ίριδα (*iris leaf*), **[Η]** φυτικός μίσχος (*stalk of a plant*).

#### 6.5.3.d. Η τεχνητή εκδοχή του κελλωτού στερεού ("cellular solid")

Μια εναλλακτική εκδοχή κελλωτού στερεού ("cellular solid") αντιπροσωπεύουν οι (σφαιροειδείς / ελλειψοειδείς) φυσαλίδες ("bubbles") που είναι δυνατόν να συμπαραταχθούν και να καθιζάνουν υπό μορφή «διασυνδεδεμένου δικτύου χαμηλής σχετικής πυκνότητας» **[Εικ. II.6.68.]**. Ο αφρός του σάπωνα **[Εικ. II.6.68.A.]** και οι επιτεδωμένες «σχεδίες στερεών φυσαλίδων» ("rafts") **[Εικ. II.6.68.B.]**, συνοψίζουν πολλά από τα τοπολογικά χαρακτηριστικά των τριδιάστατων κελλωτών ("foams"). Έτσι, στις δυο διαστάσεις οι φυσαλίδες συναθροίζονται με μεγάλη κανονικότητα, ενώ στις τρεις τείνουν συνήθως να συσσωματώνονται υπό μορφή ακατάστατων συσσωρεύσεων πυκνής διάταξης η οποία όμως καταλαμβάνει μόνο ένα κλάσμα του διαθέσιμου χώρου, με μια τιμή που κυμαίνεται γύρω στην τιμή **0,64** αντί για την τιμή **0,72** που αντιστοιχεί στη θεωρητικώς υπολογιζόμενη διάταξη μέγιστης πυκνότητας. Πάντως η σχετική πυκνότητα για ολόκληρο το σύστημα των φυσαλίδων παραμένει πολύ χαμηλότερη από την προβλεπόμενη αυτή τιμή, αφενός εξαιτίας του αστάθμητου σχήματός τους (ανισοτροπισμός σχήματος), το οποίο δεν πληροί ιδανικά τις (θεωρητικές) προδιαγραφές της κελλωτής διευθέτησης και αφετέρου εξαιτίας του προκαθορισμένου τρόπου διασύνδεσης στα σημεία επαφής των άκαμπτων επιφανειών τους, συναρτήσει των θερμοδυναμικών και των φυσικοχημικών περιοριστικών συνθηκών για τη διεργασία σχηματοποίησης (διάχυση του περιεχόμενου ρευστού).



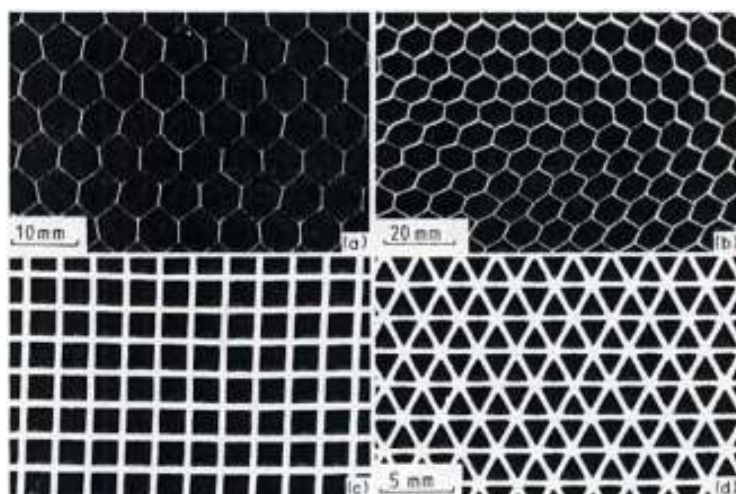
**Εικόνα II.6.68.:** Κελλωτά στερεά φυσαλιδώδους σύστασης: **[Α]** δισδιάστατη «κηρήθρα» αφρισμένου σάπωνα (*two-dimensional soap honeycomb*), **[Β]** «σχεδία φυσαλίδων» (*bubble raft*), **[Γ]** «κατακρημνισμένα σφαιρίδια αλουμινίου» (*hollow sintered aluminium spheres*), (courtesy of Wes Akutagawa, 1985, Jet Propulsion Lab, Pasadena CA).



### 6.5.4. Ανάλυση αντιπροσωπευτικών περιπτώσεων κελλωτών στερεών

#### 6.5.4.α. «Κηρήθρες» (“honeycombs”)

Διδιάστατα κυψελωτά στερεά («τύπου κηρήθρας», “honeycombs”), αποτελούμενα από τετράγωνα και τρίγωνα κελιά, με αντίστοιχες συνδεσιμότητες (“connectivities”) ίσες προς τέσσερα [ $Ze = 4$ ] και έξι [ $Ze = 6$ ], διέπονται από λιγότερη κανονικότητα σε σύγκριση προς την εξαγωνική με συνδεσιμότητα ίση προς τρία [ $Ze = 3$ ]. Επίσης από θερμοδυναμικής άποψης είναι υποδεέστερα της εξαγωνικής διάταξης ως προς την απαίτηση περισσότερης μάζας προκειμένου να οριοθετήσουν το «μοναδιαίο κελλί» και κατ’ επέκταση μεγαλύτερου εμβαδού ώστε να πλαισιώσουν τον ίδιο όγκο κελλιού (βλέπε [Εικ. II.6.64.], για αντιπαραβολή). Εναλλακτικά, κυψελωτά στερεά-«κηρήθρες» μη κανονικής διάταξης, όπως για παράδειγμα του διδιάστατου τύπου που τείνει να σχηματοποιήσει μια ποσότητα αφρού σάπωνα εγκλεισμένη ανάμεσα σε δυο παράλληλες γυάλινες πλάκες αμελητέας απόστασης, απαρτίζονται από μικρότερα κελλιά που φτάνουν τις τρείς ακμές και από μεγαλύτερα με εννέα συνήθως, χωρίς ωστόσο ανώτατο περιορισμό [Εικ. II.6.68.A.].



**Εικόνα II.6.69.:** Διδιάστατα κυψελωτά-κελλωτά στερεά: **[a]** «κηρήθρα» αλουμινίου, **[b]** «κηρήθρα» ειδικά κατεργασμένου χάρτου, **[c]** «κηρήθρα» κεραμικού υλικού από τετραγωνικά κελιά, **[d]** «κηρήθρα» κεραμικού υλικού από τριγωνικά κελιά.

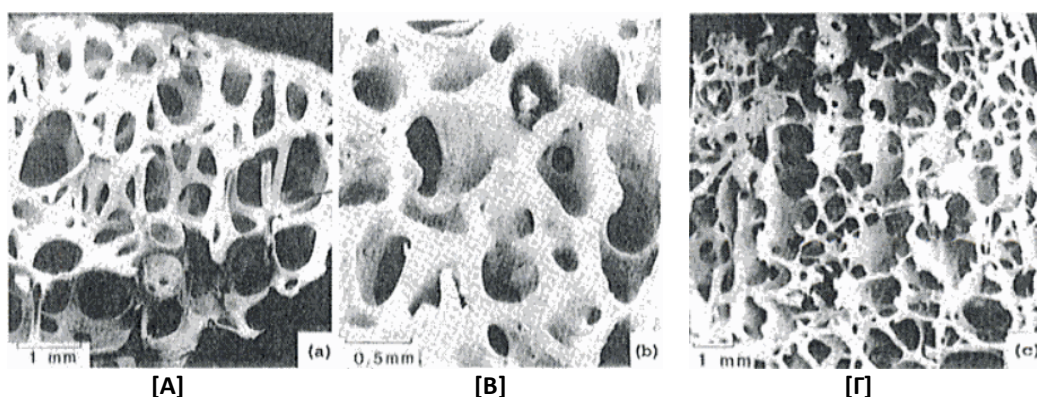
#### 6.5.4.β. «Αφροί» (“foams”) - Η δομή του σπογγώδους οστού

Στα σπονδυλόζωα τα περισσότερα οστά αποτελούν περισπούδαστες κατασκευές που απαρτίζονται από έναν εξώτερο κολεό πυκνού συμπαγούς οστού που εμπερικλείει έναν πυρήνα πορώδους κυψελωτού οστού, σπογγώδους (“cancellous”) «δεσμιδωτής (“trabecular”) υφής» (από τη λατινική λέξη “trabecula” που σημαίνει μικρή δέσμη, δεσμίδα). Η διατήρηση -κατά την εξέλιξη- αυτής της διάπλασης είναι ευρέως παραδεκτό ότι εξασφαλίζει την ελαχιστοποίηση της μάζας του οστού που απαιτείται για παροχή επαρκούς εμβαδού για υποδοχή τάσεων στην αρθρική επιφάνεια. Το πλεονέκτημα της ανατομικής αυτής συνθήκης έγκειται στην ελαχιστοποίηση της επαγόμενης τάσης (καταπόνησης) που εφαρμόζεται τοπικά, μέσω μιας αμβλυμένης («μη εντοπισμένης») κατανομής των ασκούμενων δυνάμεων εξαιτίας της διασποράς τους προς τις διασυνδεδεμένες παρακείμενες επιφάνειες και τις ακμές της ισοδύναμης κυψελωτής διάταξης. Συνεπώς μεταβολές στη δομή και κατ’ επέκταση στις γεωμετρικές ιδιότητές της πιθανότατα επιδρούν και στις βιολογικές, καταργώντας τη φυσιολογικώς προκαθορισμένη κατανομή των τάσεων και διαταράσσοντας για παράδειγμα τη λυπαντική διεργασία που εκλύεται στις αρθρικές επιφάνειες. Τέτοιοι παθογενετικοί μηχανισμοί είναι πιθανό ότι υπεισέρχονται σε νοσήματα όπως η οστεοαρθρίτιδα.

Η κυψελωτή αρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού απεικονίζεται στις εικόνες ([Εικ. II.6.67.d.], [Εικ. II.6.70.]) όπου φαίνεται ότι συγκροτείται από ένα διασυνδεδεμένο δίκτυο δοκίδων και / ή ελασμάτων. Η εκδοχή των δοκίδων διαπλάθει χαμηλής σχετικής πυκνότητας «ανοιχτά κελιά» ενώ αυτή των ελασμάτων, μια διάταξη «κλειστών κελιών» υψηλής πυκνότητας. Προκύπτουν έτσι τιμές σχετικής πυκνότητας που κυμαίνονται μεταξύ **0,05** και **0,7**. Οι χαμηλής μεγέθυνσης μικροφωτογραφίες επιβεβαιώνουν την κυψελωτή διαμόρφωση της μάζας του σπογγώδους οστού, αναδεικνύοντας επισταμένα τις διακυμάνσεις των γεωμετρικών παραμέτρων:

α) στις ζώνες χαμηλότερης πυκνότητας τα κελιά είναι «ανοιχτού τύπου» διαμορφώνοντας ένα ικρίωμα δοκίδων από οστεοκύτταρα και τις αποφυάδες τους.

β) Όμως καθώς η σχετική πυκνότητα κλιμακώνεται συναρτήσει της μεταβαλλόμενης ανατομικής τοπογραφίας, οι οστικές δοκίδες τείνουν σε διαδοχικές διατομές να αποπλάτυνονται και να επιπεδώνονται προς σχήματα, περισσότερο ελασματοειδή, που καταλήγουν να αλληλοσυγχωνεύονται, παράγοντας σχεδόν «κλειστού τύπου» κελιά. Φωτομικρογραφίες στην [Εικ. II.6.70.] αναδεικνύουν την ετερογενή κελλωτή (κυτταρική) δομή του σπογγώδους οστού (Dyson et al., 1970; Whitehouse et al., 1971a, 1971b, 1974, 1975).



**Εικόνα II.6.70.:** Ηλεκτρονιογραφίες σάρωσης από οβελιαίες διατομές κεφαλής μηριαίου οστού που αναδεικνύει τη διττή αρχιτεκτονική που διέπει τη διάπλασή του σε μακροσκοπική κλίμακα διαστάσεων, καθώς και την κυτταρική αρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού. **[Α]** Στο δείγμα αισθητοποιείται η δόμηση χαμηλής πυκνότητας από «ανοιχτού τύπου κελιά» που συγκροτούν ένα σχετικώς αραιότερο ικρίωμα οστικών δοκίδων. **[Β]** Στο δείγμα αισθητοποιείται η δόμηση υψηλής πυκνότητας από «κλειστού τύπου κελιά» που συγκροτούν ένα πυκνότερο ικρίωμα από σχεδόν πρισματικά κελιά με ελασματομόρφα τοιχώματα. **[Γ]** Στο δείγμα αισθητοποιείται η δόμηση ενδιάμεσης πυκνότητας από «μεταβατικού τύπου κελιά» όπου αποτυπώνεται η πολωμένη –κατά τη διεύθυνση των τάσεων– διάταξη των ελασματομόρφων τοιχωμάτων καθώς εναλλάσσεται με τις κάθετα διατεταγμένες οστικές δοκίδες (Gibson, 1985).

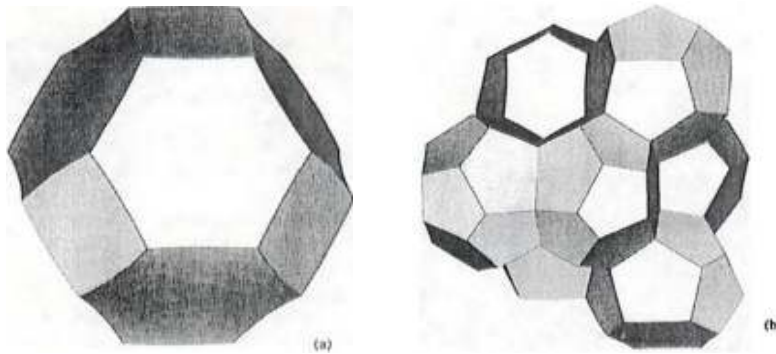
### 6.5.5. Η αμιγώς γεωμετρική σκοπιά της «κελλωτής διάταξης»

#### 6.5.5.α. «Βέλτιστα αποδοτική συσσώρευση»

Μια εποπτικότερη αισθητοποίηση της φυσικής σημασίας των γεωμετρικών μεταβλητών που υπεισέρχονται συστηματικά στη μελέτη κελλωτών στερεών, σκιαγραφείται κατά τη θεώρηση του εξής στερεομετρικού προβλήματος:

Για περισσότερο από έναν αιώνα ήταν αποδεκτό ότι το «μοναδιαίο χωροπληρωτικό κελλί» που καταμερίζει τον Ευκλείδειο χώρο κατά συνεχή τρόπο (*tilling*) και έτσι ώστε το πλήθος και η διάταξη των εδρών του να εξασφαλίζουν το ελάχιστο δυνατό απαιτούμενο εμβαδόν ανά μονάδα όγκου, ήταν το τετρα–και–δεκάεδρο του Κέλβιν (*Kelvin's tetrakaidecahedron*) με ελαφρώς κυρτωμένες τις έδρες του (Kelvin, 1887) [Εικ. II.6.71.a.]. Ωστόσο πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ένα «μοναδιαίο χωροπληρωτικό κελλί» που πληροί την ίδια τοπολογική συνθήκη με βελτιωμένη απόδοση της τάξης του **0,3 %** περίπου, έναντι του προκατόχου του, όσον αφορά στην ελαχιστοποίηση του λόγου του απαιτούμενου εμβαδού ανά μονάδα όγκου (Brakke, 1992; Weaire

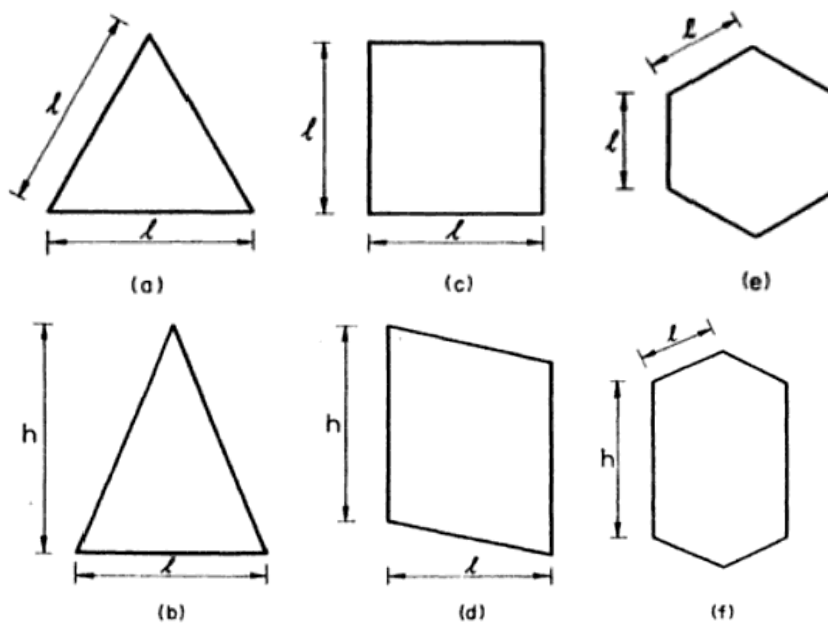
and Phelan, 1994) [Εικ. II.6.71.b.]. Η χωροπληρωτική αυτή υπομονάδα είναι σύνθετη και απαρτίζεται από έξι [6] τετρα-και-δεκάεδρα [14-sided cells] κελλιά με δώδεκα [12] πενταγωνικές και δυο [2] εξαγωνικές έδρες, καθώς και δυο [2] πενταγωνικά δωδεκάεδρα, όλα ισόποσου όγκου. Τα τετρα-και-δεκάεδρα διευθετούνται σε τρεις αλληλοκάθετους άξονες με τα δωδεκαεδρικά κελλιά να καταλαμβάνουν τον παρεμβαλλόμενο –μεταξύ των ορθογώνιων αξόνων– χώρο, συγκροτώντας μια απλή κυβική διάταξη πλέγματος. Μόνο οι εξαγωνικές έδρες είναι επίπεδες, καθώς όλες οι πενταγωνικές είναι κυρτωμένες.



**Εικόνα II.6.71.:** (α) Το τετρα-και-δεκαεδρικό κελλί του Kelvin (*Kelvin's tetra-kai-decahedral cell*), (β) Το μοναδιαίο κελλί κατά Weaire and Phelan (*Weaire and Phelan's unit cell*), συναρμολογούμενο από έξι δεκατετράπλευρα πολύεδρα και δυο δωδεκάπλευρα πολύεδρα (*courtesy of Professor Denis Weaire*).

#### 6.5.5.b. «Επαρκώς αποδοτική συσσώρευση»

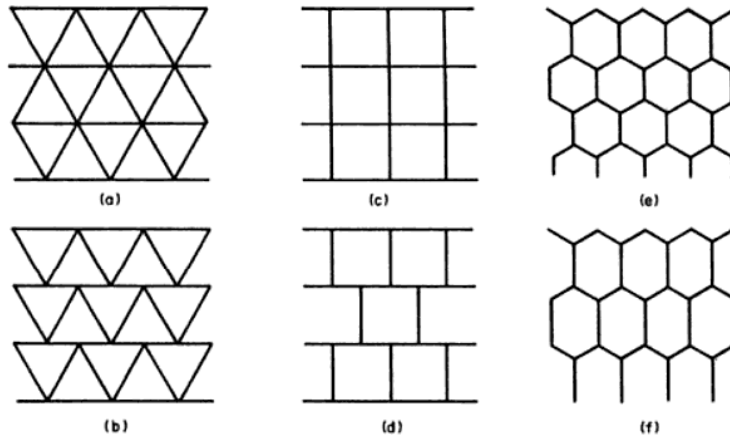
Τα «μοναδιαία κελλιά» που επιστοιβάζονται έτσι ώστε να καταλαμβάνουν το επίπεδο «επαρκώς αποδοτικά», απεικονίζονται διαγραμματικά στην εικόνα [Εικ. II.6.72.] αναδεικνύοντας τα σχήματα που είναι διαθέσιμα και για τα ισότροπα και για τα ανισότροπα κελλωτά στερεά.



**Εικόνα II.6.72.:** Πολύγωνα που απαντώνται σε διδιάστατα κυψελωτά στερεά («κηρήθρες»): [α] ισόπλευρο τρίγωνο, [β] ισοσκελές τρίγωνο, [γ] τετράγωνο, [δ] παραλληλόγραμμο, [ε] κανονικό εξάγωνο, [φ] μη κανονικό εξάγωνο. Επισημαίνεται ότι οποιοδήποτε από τα εξής, τρίγωνο, τετράπλευρο ή εξάγωνο, με κέντρο συμμετρίας είναι εφικτό να καταμερίσει (*tilling*) το διαθέσιμο επίπεδο.

Ακόμη κι όταν τα σχήματα είναι προκαθορισμένα υπάρχει δυνατότητα να επιστοιβάζονται κατά εναλλακτικούς συνδυασμούς που διαφέρουν στην τοπολογική μεταβλητή της

«συνδεσιμότητας ακμών»  $[Ze]$  καθώς και στον αντίκτυπο που επιφέρουν στις υπόλοιπες ιδιότητες της συνολικής διάταξης **[Εικ. II.6.73.]**. Οι περισσότερες συνθετικές κηρήθρες απαρτίζονται από τέτοια κανονικά σχήματα. Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις, τρεις  $[3]$  ακμές διασταυρώνονται σε μια κορυφή, παράγοντας διάταξη από εξάπλευρα κελιά που προσδιορίζεται από την «τιμή συνδεσιμότητας»  $[Ze = 3]$  (**[Εικ. II.6.69.a.]**, **[Εικ. II.6.69.b.]**). Πάντως δε σπανίζουν και οι «τιμές συνδεσιμότητας» που είναι ίσες προς  $[Ze = 4]$  **[Εικ. II.6.69.c.]** και εκείνες που είναι ίσες προς  $[Ze = 6]$  **[Εικ. II.6.69.d.]** παράγοντας διατάξεις τετράπλευρων και τρίπλευρων κελιών, αντίστοιχα.

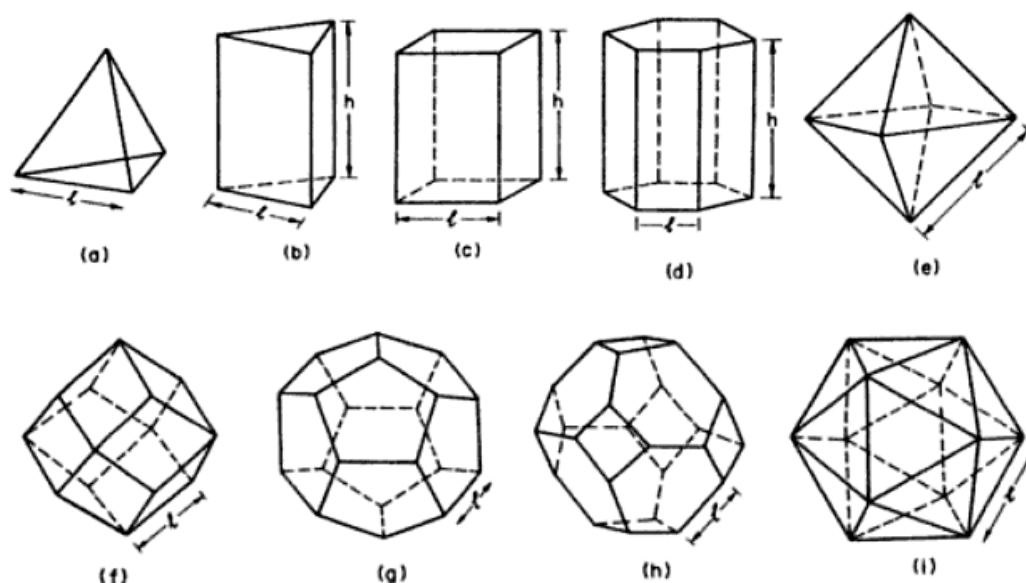


**Εικόνα II.6.73.:** Επιστοιβάξη (συσσώρευση) διδιάστατων κελιών (πολυγώνων) προς πλήρωση (*tilling*) του επιπέδου: **[a]**, **[b]** δυο εναλλακτικές διευθετήσεις από ισόπλευρα τρίγωνα, με αντίστοιχες τιμές συνδεσιμότητας  $[Ze = 6]$  και  $[Ze = 4]$ . Όταν ισχύει η τιμή  $Ze = 4$  τότε τοπολογικά ισχύει επίσης και  $n = 4$ , **[c]**, **[d]** δυο εναλλακτικές διατάξεις από τετράγωνα με αντίστοιχες τιμές συνδεσιμότητας  $[Ze = 4]$  και  $[Ze = 3]$ . Όταν ισχύει η τιμή  $Ze = 3$  τότε τοπολογικά ισχύει επίσης και  $n = 6$ , **[e]** διάταξη κανονικών εξαγώνων, **[f]** διάταξη μη κανονικών εξαγώνων.

Ωστόσο τα φυσικά διδιάστατα κελιά είναι λιγότερο κανονικά, όπως διαπιστώνεται κοινότοπα στον αφρώδη σάπωνα που διατηρείται εγκλωβισμένος μεταξύ δυο παράλληλων γυάλινων πλακών **[Εικ. II.6.68.A.]**, καθώς και στην κυτταροβριθή αρχιτεκτονική του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού. Ακόμη κι η μελισσοκομική κηρήθρα εμφανίζει στοιχεία μη κανονικότητας (τυχαιότητας) που παρατηρούνται ως τετράπλευρα, πεντάπλευρα, επτάπλευρα ακόμη κι οκτάπλευρα κελιά **[Εικ. II.6.68.A.]**, η παρουσία των οποίων επιφέρει στο σύνολο των κελιών του δικτύου μια σημαντική διασπορά των διαστάσεών τους (*“cell size polydispersity”*) (Wyman, 1865).

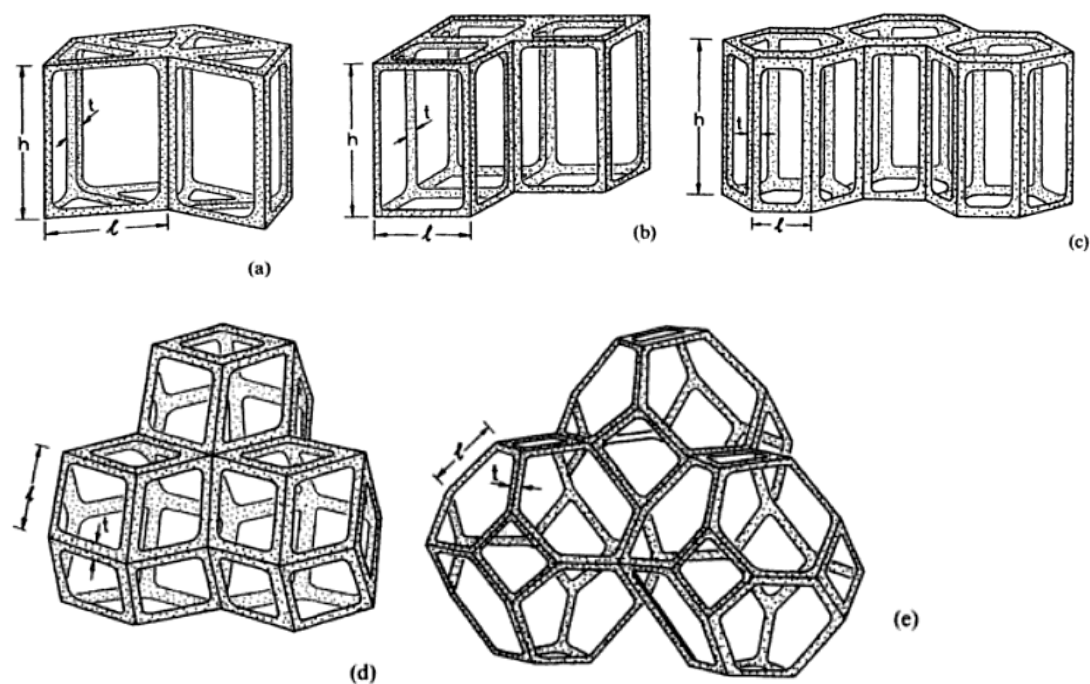
Για τα κελιά με προδιαγραφές χωροπληρωτικής διευθέτησης, είναι εφικτή ακόμη μεγαλύτερη διακύμανση σχημάτων (*“cell shape polydispersity”*) συγκριτικά με εκείνα που είναι προορισμένα για διδιάστατες διατάξεις. Τα αντίστοιχα στερεομετρικά χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στις εικόνες (**[Εικ. VII.5.9.]**, **[Εικ. VII.5.10.]**). Κατά αναλογία προς τα διδιάστατα, έτσι και τα τριδιάστατα κελιά επιστοιβάζονται στο χώρο «αρκούντως αποδοτικά», αλλά δεν πληρούν όλα τις προβλεπόμενες προϋποθέσεις χωρίς να υποστούν κατάλληλη αλλοίωση (διαταραχή) των γεωμετρικών χαρακτηριστικών τους (όπως συμβαίνει για παράδειγμα με την περίπτωση της ελαφράς κύρτωσης των πενταγωνικών εδρών του κελλιού *Weaire - Phelan*) όπως απεικονίζονται στην εικόνα **[Εικ. II.6.71.]**. Αυτά είναι τα τριγωνικά, ρομβικά και εξαγωνικά πρίσματα, το ρομβικό δωδεκάεδρο (*rhombic dodecahedron*, ένα πολυεδρικό σώμα με δώδεκα αδαμαντόμορφες έδρες), το δομικά συγγενικό του, τραπεζο-ρομβικό δωδεκάεδρο (*trapezo-rhombic dodecahedron*, *Ko*, 1965) και το τετρα-και-δεκάεδρον (ένα πολυεδρικό σώμα με έξι τετραγωνικές και οκτώ εξαγωνικές έδρες), (*Plateau*, 1873; *Kelvin*, 1887; *Smith*, 1952; *Thompson*, 1961).





**Εικόνα II.6.74.:** Πολυεδρικά κελιά που απαντώνται σε τριδιάστατα κυψελωτά στερεά («αφρούς»): **[a]** τετράεδρο, **[b]** τριγωνικό πρίσμα, **[c]** τετραγωνικό πρίσμα, **[d]** εξαγωνικό πρίσμα, **[e]** οκτάεδρο, **[f]** ρομβικό δωδεκάεδρο, **[g]** πενταγωνικό δωδεκάεδρο, **[h]** τετρα-και-δεκάεδρο, **[i]** εικοσάεδρο.

Όλα αυτά κατά καιρούς (Rivier, 1983; 1985; 1986; Weaire, 1983; Weaire and Rivier, 1984; Ferro and Fortes, 1985; Rosa and Fortes, 1986; Fortes, 1986a,b) έχουν προταθεί ως εξιδανικευμένες εκδοχές των πραγματικών τριδιάστατων κελιών, τα οποία επιστοιβάζονται χωροπληρωτικά μονάχα κατόπιν διαταραχής του αρχέτυπου σχήματος (Jones and Fesman, 1965; Harding, 1967; Chan and Nakamura, 1969; Menges and Knipschild, 1975; Barma et al., 1978) **[Εικ. II.6.75.]**:



**Εικόνα II.6.75.:** Επιστοιβάξη (συσσώρευση) τριδιάστατων κελιών (πολυέδρων) προς πλήρωση (tilling) του χώρου: **[a]** τριγωνικά πρίσματα, **[b]** τετραγωνικά πρίσματα, **[c]** εξαγωνικά πρίσματα, **[d]** ρομβικά δωδεκάεδρα, **[e]** τετρα-και-δεκάεδρα.

### 6.5.6. Νόμος Euler (“Euler’s law”) - Η αρχιτεκτονική των κελλωτών στερεών διέπεται από οικονομία

Η διατύπωση του νόμου Euler συνοψίζεται αξιολογώντας στην εξής λιτή και απέρριπτη πρόταση:

Ο αριθμός των κορυφών (*vertices*,  $V$ ), των ακμών (*edges*,  $E$ ), των εδρών (*faces*,  $F$ ) και των κελιών (*cells*,  $C$ ), συσχετίζονται μεταξύ τους με τη μαθηματική διατύπωση που ισχύει για μεγάλο πλήθος κελλιών (Euler, 1746; Lakatos, 1976):

$$F - E + V = 2 \quad (\text{two dimensions}) \quad (6.5.6.1.)$$

$$-C + F - E + V = 2 \quad (\text{three dimensions}) \quad (6.5.6.2.)$$

Ένα διδιάστατο κελλωτό στερεό με κανονικά εξαγωνικά κελλιά, είναι πρόδηλο ότι πλαισιώνει κάθε έδρα-κελί του μέσω έξι **[6]** ακμές. Μια άμεση –αλλά όχι και αυταπόδεικτη– συνέπεια του νόμου Euler είναι ότι τόσοι (**ίσος προς 6**) παραμένει ο μέσος όρος των ακμών που περιβάλλουν τα κελλιά-έδρες μιας οποιασδήποτε μη κανονικής «κελλωτής διάταξης» με την ίδια τιμή συνδεσιμότητας **[ $Ze = 3$ ]**. Δηλαδή, οποιαδήποτε παραλλαγή ενός διδιάστατου μη κανονικού δικτύου δεδομένης συνδεσιμότητας, διατηρεί σταθερή (και μάλιστα προκαθορισμένη) μια μέση τιμή για το πλήθος των ακμών του, όση διακύμανση κι αν εμφανίζει το πλήθος τους ή το μέγεθός τους.

Περαιτέρω, διακρίνονται οι εξής περιπτώσεις:

**α]** η «αντικανονική» παρουσία μιας πεντάπλευρης έδρας-κελλιού είναι δυνατή μόνο με την προϋπόθεση της συμπαρουσίας μιας «αντισταθμιστικής» (αντικανονικής) επτάπλευρης. Η εμφάνιση μιας ακόμη αντικανονικής πεντάπλευρης οφείλει να συνοδεύεται από την εμφάνιση κι άλλης μιας επτάπλευρης, κλπ.

**β]** η παρεμβολή μιας τετράπλευρης έδρας-κελλιού, απαιτεί μια συνοδό οκτάπλευρη είτε δυο επτάπλευρες, κ.ο.κ.

Ως συνέπεια, τα περισσότερα κελλιά (έδρες) είναι εξάπλευρα κι όσα δεν είναι, συνοδεύονται οπωσδήποτε από τη συμπαρουσία κελλιών (εδρών) με τα οποία είναι «τοπολογικώς συζευγμένα» ως προς τη διατήρηση σταθερής της μέσης τιμής των ακμών του μη κανονικού δικτύου, (π.χ. η «κρηθήρα» του αφρού του σάπωνα **[Εικόνα 6.68.Α.]**. Με άλλα λόγια ο συνδυασμός (ή συναρμογή) σχημάτων είναι τέτοιος ώστε τα κελλιά (έδρες) να εμφανίζουν αμοιβαία (ή «ισοζυγισμένη») συμπληρωματικότητα ως προς τη μέση τιμή ακμών της μη κανονικής διάταξης. Κατά συνέπεια όλα τα κελλιά (έδρες) που δεν είναι εξάπλευρα, η εφαρμογή του νόμου Euler τα διανέμει σε μια «ισορροπημένη στατιστική κατανομή» όπου το πλήθος των ακμών κυμαίνεται κατά τρόπο που δεν αλλοιώνει τη μέση τιμή τους στο δίκτυο δεδομένης συνδεσιμότητας.

Αυτό το συμπέρασμα συνάγεται εύλογα, παρατηρώντας ότι αν η τιμή συνδεσιμότητας είναι  **$Ze = 3$**  τότε ο λόγος ακμών προς κορυφές (ακμές ανά κορυφή) είναι:

$$\frac{E}{V} = \frac{3}{2} \quad (\text{two dimensions}) \quad (6.5.6.3.)$$

[η ακέραια τιμή **2** στον παρονομαστή δικαιολογείται από το γεγονός ότι μια ακμή, οπωσδήποτε τη μοιράζονται μεταξύ τους ως κοινή, δυο κορυφές].

Αν  **$F_n$**  είναι ο αριθμός των εδρών-κελλιών με  **$n$**  ακμές (πλευρές), τότε το πλήθος των ακμών  **$E$**  υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\Sigma \left[ \frac{nF_n}{2} \right] = E \quad (\text{two dimensions}) \quad (6.5.6.4.)$$

[η ακέραια τιμή **2** στον παρονομαστή αυτού του τύπου δικαιολογείται από το γεγονός ότι μια ακμή, οπωσδήποτε τη συμμερίζονται ως κοινό σύνορο, δυο τουλάχιστον έδρες-κελλιά].

Τότε ο νόμος Euler διατυπώνεται υπό τη μορφή:

$$6 - \Sigma \left[ \frac{nF_n}{F} \right] = \frac{6}{F} \quad (\text{two dimensions}) \quad (6.5.6.5.)$$

[όπου **F** είναι το πλήθος των εδρών].

Καθώς το πλήθος εδρών κλιμακώνεται, τόσο περισσότερο το δεξιό μέλος της ισότητας προσεγγίζει το μηδέν, ενώ ο όρος:

$$\Sigma \left[ \frac{nF_n}{F} \right] \quad (\text{two dimensions}) \quad (6.5.6.6.)$$

εκφράζει το μέσο αριθμό ακμών ανά έδρα (κελλί), που δίνει την τιμή

$$\tilde{n} = 6 \quad (\text{two dimensions}) \quad (6.5.6.7.)$$

ώστε μια έδρα (κελλί) με πέντε ακμές να παρεμβάλλεται κανονικά στο δίκτυο όπου εφαρμόζεται ο νόμος Euler, υπό την προϋπόθεση να συνοδεύει την παρουσία της η συνύπαρξη μιας επτάπλευρης και ούτω καθ'εξής. Αυτά ισχύουν ειδικά για διδιάστατα πλέγματα με τιμή συνδεσιμότητας **Ze = 3**.

Συνεπώς για γενικότερες τιμές συνδεσιμότητας **Ze** οι προηγούμενοι τύποι αναδιατυπώνονται υπό τη μορφή:

$$\tilde{n} = \frac{2Z_e}{Z_e - 2} \quad (\text{two dimensions}) \quad (6.5.6.8.)$$

[που παράγει την τιμή  $\tilde{n} = 6$  όταν **Ze = 3**].

Η απλότητα των τύπων αυτών ενθαρρύνει την προσαρμογή τους στην τρίτη διάσταση, όπου ωστόσο το πρόβλημα εμφανίζεται λιγότερο περιορισμένο εξαιτίας της μεσολάβησης μιας ακόμη μεταβλητής, με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα που είναι δυνατό να συνάγονται να στερούνται γενικότερης ισχύος. Αλλά ένα είναι αξιοσημείωτο:

Για ένα απομονωμένο κελλί (κύτταρο) (**C = 1**) και για τιμή συνδεσιμότητας ακμών (edge-connectivity) πάνω στην επιφάνεια του κελλιού **Ze = 3** (βλέπε **Εικ. 6.74.g.**), ο μέσος αριθμός ακμών ανά έδρα (στην περίπτωση αυτή δεν πρόκειται για το κελλί του δικτύου),  $\tilde{n}$  υπολογίζεται ειδικά από τον τύπο:

$$\tilde{n} = 6 \left( 1 - \frac{2}{f} \right) \quad (\text{three dimensions}) \quad (6.5.6.9.)$$

και γενικότερα (για οποιαδήποτε τιμή συνδεσιμότητας ακμών ("edge-connectivity")) από τον τύπο:

$$\tilde{n} = \left( 1 - \frac{2}{f} \right) \left( \frac{Z_e Z_f}{Z_e - 2} \right) \quad (\text{three dimensions}) \quad (6.5.6.10.)$$

Μια σημαντική συνέπεια προκύπτει από αυτήν τη θεώρηση:

στα περισσότερα τριδιάστατα κελλωτά στερεά, η πλειονότητα των κελιών (κυττάρων) απαρτίζεται από έδρες με πέντε –και όχι έξι– ακμές. Αν για παράδειγμα σε ένα πληθυσμό κελιών (κυττάρων) ο μέσος όρος υιοθετεί το σχήμα του δωδεκάεδρου (**f = 12**), τότε σύμφωνα με όσα επιτάσσουν οι τύποι **(6.5.6.9.)** και **(6.5.6.10.)** ο μέσος αριθμός εδρών θα πλαισιώνεται από ένα μέσο αριθμό ακμών  $\tilde{n} = 5$  ακριβώς. Αν τα κελλιά (κύτταρα) είναι κατά μέσο όρο δεκα-και-τετράεδρα (**f = 14**), η μέση έδρα θα περιβάλλεται από ένα μέσο αριθμό ακμών  $\tilde{n} = 5,14$ . Ακόμη κι αν τα κελλιά (κύτταρα)

είναι κατά μέσο όρο εικοσάεδρα ( $f = 20$ ), η μέση έδρα θα οριοθετείται από ένα μέσο αριθμό ακμών  $\bar{n} = 5,4$ . Συνεπώς υψηλή συχνότητα πεντάπλευρων εδρών σε τριδιάστατα κελλωτά (τύπου «αφρού») **ΔΕΝ** υποδηλώνει ότι τα κελλιά είναι αποκλειστικά πενταγωνικά δωδεκάεδρα (ενδεχομένως να είναι μόνο ένα περιορισμένο πληθυσμιακό κλάσμα). Αμφότερες οι μεταβλητές  $f$  και  $\bar{n}$  εξαρτώνται από τις μορφογόνες διεργασίες που σχηματοποιούν τα μοναδιαία κελλιά καθώς και το χωροπληρωτικό μοτίβο που τα διασυνδέει (Smith, 1952; Weaire and Rivier, 1984; Weaire and Fortes, 1986b).

### 6.5.7. Προέλευση και Επακόλουθα της Διασποράς του Μεγέθους Κελλιού

Πολλές «κρηήθρες» και όλοι οι «αφροί» απαρτίζονται από κελλιά ποικίλων μεγεθών. Η κατανομή των μετρούμενων διαστάσεων είναι δυνατόν να είναι τόσο περιορισμένη όσο η μονότονα κανονική της μελισσοκομικής κρηήθρας, ή τόσο ευρεία όσο μια διαφορά δυο τάξεων μεγέθους. Πάντως αυτή η διακύμανση δεν ταυτίζεται εννοιολογικά με την παράμετρο του *ανισοτροπισμού* (*anisotropy*). Ωστόσο και οι δυο αυτές έννοιες, συσχετίζονται σε απώτερη ανάλυση με τις διεργασίες παραγωγής του κυψελωτού στερεού. Έτσι σε εκείνες κατά τις οποίες μια υπερκορεσμένη αέρια φάση εξαναγκάζεται σε διαχωρισμό από την υγρή, η πυρήνωση (*nucleation, bubble formation*) αρχικά παράγει σφαιρικές φυσαλίδες (*bubbles*) που καθώς διογκώνονται και αλληλεπιδρούν (π.χ. εφάπτονται), μετασχηματίζονται στη συνέχεια σε πολυεδρικούς σχηματισμούς. Αν υποτεθεί ότι:

**[α]** η φυσαλλιοποίηση συντελείται τυχαία (ισοπίθανα) σε οποιοδήποτε σημείο μέσα στην υγρή μάζα ή με άλλα λόγια δεν ευνοείται κάποια εντοπισμένη εστία πυρήνωσης (*nucleation point*) και

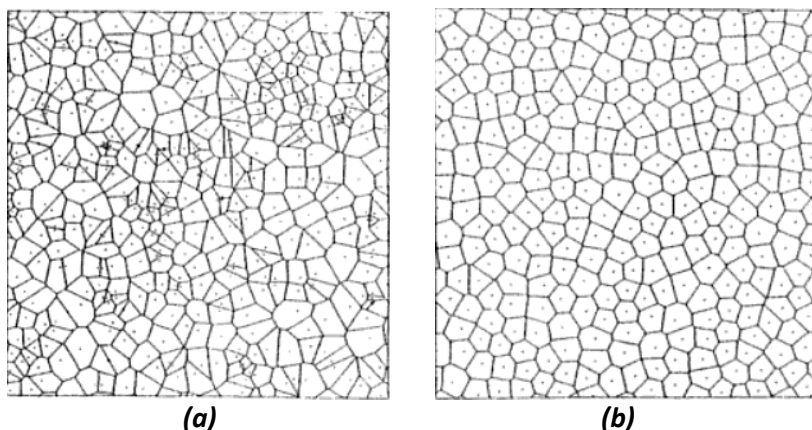
**[β]** η πυρήνωση ξεκινά την ίδια στιγμή για όλες τις φυσαλίδες που πρόκειται να σχηματοποιηθούν καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας και

**[γ]** όλες οι φυσαλίδες διογκώνονται με ίσους ρυθμούς, τότε η διαμόρφωση που θα σταθεροποιηθεί σε πρώτη φάση στις δυο διαστάσεις θα είναι ένα δίκτυο **Voronoi** τύπου «κρηήθρας» (*"Voronoi honeycomb" (two dimensions)*), ενώ στις τρεις ένα δίκτυο **Voronoi** τύπου «αφρού» (*"Voronoi foam" (three dimensions)*). Το μοναδιαίο πολύεδρο του δικτύου είναι το κελλί με κέντρο το σημείο έναρξης της πυρήνωσης και περίγραμμα, τη συνεχή γραμμή που ενώνει όλα τα σημεία που γειτνιάζουν εγγύτερα προς αυτό το κέντρο παρά προς οποιοδήποτε άλλο (Voronoi, 1908). **{{{\*}}}** Είναι αυταπόδεικτο ότι τα κελλιά συμπληρώνουν «πλήρως αποδοτικά» το επίπεδο και / ή το χώρο, με τυχαία τοπογραφία.

Μια «κρηήθρα» που παράγεται με τέτοιο τρόπο φαίνεται σαφώς διαφορετική από τις κανονικές εξαγωνικές αλλά εξακολουθεί να διατηρεί μέσο αριθμό ακμών ανά έδρα-κελλί,  $\bar{n} = 6$  (*two dimensions*), όπως απαιτεί ο νόμος Euler. Είναι αξιοσημείωτο ότι και ένα «αφρώδες δίκτυο» - «αφρός **Voronoi**» (*"Voronoi foam", (three dimensions)*) συγκροτείται περιέργως από γωνιώδη (π.χ. τετραεδρικά, κλπ) κελλιά καθώς και από κελλιά με μέσο όρο **15,54** αλλά όχι **14** έδρες (*faces*) (Meijering, 1953; Rivier, 1982). Έτσι η εξαντλητική μοντελοποίηση τέτοιων δομών παράγει διαφορετικά αποτελέσματα:

για την «κρηήθρα **Voronoi**» (*"Voronoi honeycomb"*) το μέσο εμβαδόν μιας  $v$ -πλευρης έδρας-κελλιού είναι αδρώς ανάλογο του αριθμού των πλευρών  $n$  (Crain, 1972, 1978) και οι κατανομές διακύμανσης για τα εμβαδά των εδρών και για τα μήκη των ακμών, μπορούν να υπολογισθούν επακριβώς (Gilbert, 1962; Meijering, 1953).

**{{{\*}}}** {Η γεωμετρική κατασκευή επιτυγχάνεται αρχικά μέσω διασύνδεσης όλων των τυχαίων κέντρων πυρήνωσης (*random nucleation points*) με ευθύγραμμα τμήματα και ακολούθως αντικατάσταση με τα μεσοκάθετα -προς αυτά- επίπεδα. Ο «φάκελος» που τα συνδέει περιβάλλοντας κάθε κέντρο αποτελεί ένα «κελί Voronoi» (*Voronoi cell*)}.



**Εικόνα 11.6.76.: (a)** «Κηρήθρα Voronoi» μιας συλλογής τυχαίων σημείων (επισημασμένων ως κουκίδες). Αυτό το μοτίβο θα παραγόταν, αν σε ένα μοναδικό στιγμιότυπο της εικαζόμενης παραγωγικής διαδικασίας ήταν δυνατόν να εμφανισθούν σε τυχαία σημεία του επιπέδου όλα τα κέντρα πυρήνωσης (που επρόκειτο να οργανωθούν) και αν όλα τα επικείμενα κελιά Voronoi παράγονταν με ίσους γραμμικούς ρυθμούς αύξησης. **(b)** «Κηρήθρα Voronoi» για μια συλλογή διάσπαρτων σημείων που ξεκινά ως τυχαία διάταξη των κέντρων πυρήνωσης, όπου ακολούθως όλα εκείνα τα σημεία που γειτνιάζουν προς τα αντίστοιχα κέντρα, εγγύτερα από ένα ελάχιστο προκαθορισμένο όριο, απαλείφονται. Αυτό το μοτίβο θα παραγόταν αν τα επικείμενα κελιά Voronoi απαγορευόταν να ξεκινήσουν τη σχηματοποίησή των από κέντρα πυρήνωσης που θα απείχαν λιγότερο από μια ελάχιστη προκαθορισμένη απόσταση και διατηρούσαν ίσους ρυθμούς γραμμικής αύξησης).

Οι δομές που απαντούν στη φύση και μοιάζουν με τα δίκτυα **Voronoi**, περιλαμβάνουν εκτός της μελισσοκομικής κηρήθρας, τα ικρίωματα που παράγουν με ανταγωνιστική αύξηση, κοράλλια και σπόγγοι, καθώς και οι φωλιές σφηκών και μυρμηγκιών. Ωστόσο η μεγάλη κανονικότητα που χαρακτηρίζει τα μοτίβα αυτά και τα διαφοροποιεί αισθητά από εκείνα που τα υπολογιστικά πρότυπα απεικονίζουν, αποδίδεται στη βασική αρχιτεκτονική συνθήκη που υποβόσκει καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας:

για τα περισσότερα άτομα –παραγωγικής ηλικίας- που συνδράμουν, το πεπερασμένο μέγεθός τους είναι λίγο-πολύ παρόμοιο ενώ διατηρείται πρακτικά αμετάβλητο μέχρι το θάνατο του οργανισμού. Συνεπώς αποτελεί σταθερή συνθετική συνιστώσα κατά την κατασκευή δεδομένου πλήθους διαδοχικών αυξητικών ζωνών, αποκλείοντας την πυρήνωση δυο άμεσα γειτονικών κελιών από σημεία εγγύτερα αυτών των διαστάσεων. Τα συνοριακά περιγράμματα των αυξανόμενων κελιών που πρόκειται να έρθουν σε επαφή απέχουν περίπου ίσες αποστάσεις από τα αντίστοιχως γειτονικά κέντρα πυρήνωσης εξαιτίας των ισοταχών παραγωγικών ρυθμών, με αποτέλεσμα την επικράτηση μεγαλύτερης κανονικότητας στο φυσικό δίκτυο σε σύγκριση προς εκείνη της εικόνας **[Εικ. 11.6.76.α.]** (Weaire and Rivier, 1984). Ένα τέτοιο φυσικό παράδειγμα μπορεί να αναπαρασταθεί διαγραμματικά όπως στην εικόνα **[Εικ. 11.6.76.β.]** όπου η διάταξη των σημείων που συνιστούν τα κέντρα πυρήνωσης είναι τυχαία αλλά η διαδικτύωση των επικείμενων συνοριακών γραμμών υπακούει στον περιορισμό να αποκλείεται η πυρήνωση δυο κελιών **Voronoi** από σημεία που απέχουν λιγότερο από μια προκαθορισμένη «**απόσταση αποκλεισμού**». Με άλλα λόγια δεν επιτρέπεται η πυρήνωση των επικείμενων κελιών **Voronoi** από οποιαδήποτε (τυχαία) σημεία του διαθέσιμου περιβάλλοντος. Στην περιοριστική αυτή συνθήκη που επαναλαμβάνεται στερεότυπα σχεδόν σε όλα τα οικοσυστήματα, συμβάλλουν ενδογενείς και εξωγενείς συνιστώσες, βιοτικές και / ή αβιοτικές, των οποίων οι μοναδικοί συνδυασμοί, επιφέρουν ποικιλότητα (ετερογένεια) στα τοπογραφικά μοτίβα (*patterns*) που αναπαριστούν τους *οικολογικούς θώκους* (*ενδιαιτήματα*) των φυσικών πληθυσμών. Ωστόσο η «γωνιώδης υφή / αίσθηση» (*“aliasing”, “coarsening”*) που εξακολουθεί να αποτυπώνεται στο υπολογιστικό διάγραμμα, υποδηλώνει τη σημασία του είδους της μηχανικής (παραγωγικής) διεργασίας που υποβόσκει.

Έτσι η ανταγωνιστική αύξηση (με τη γενικότερη σημασία του όρου) δεν αποτελεί τη μόνη συνιστώσα σχηματοποίησης, καθώς αναδεικνύει τόσο εποπτικά η μορφογόνος επενέργεια της Επιφανειακής Τάσης. Όταν λοιπόν αυτή πρωτοστατεί και επιδρά ισотροπικά (*isotropy*), (δηλαδή τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασής της με την κυψελωτή διάταξη είναι ανεξάρτητα από τη

διεύθυνση εφαρμογής), τότε η συνολική δομή που παράγεται είναι αυτή που εμφανίζει ελαχιστοποιημένο το εμβαδόν επιφανείας για δεδομένο όγκο κελλιού. Σε τέτοια περίπτωση οι ακμές σε (διδιάστατη) δομή «κηρήθρας» και οι έδρες σε (τριδιάστατη) δομή «αφρού» τέμνονται συστηματικά υπό επίπεδη και στερεά, αντίστοιχη γωνία **120°**. Πάντως οι έδρες των τριδιάστατων κελλιών εμφανίζουν μια κυρτότητα, ο βαθμός της οποίας εξαρτάται από τη διαφορά των πιέσεων που επικρατούν στο εσωτερικό των κελλιών που εφάπτονται, καθώς και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας διεπαφής. Η συνθήκη αυτή της παραμόρφωσης των εδρών δικαιολογείται από το γεγονός ότι στα κελλωτά συστήματα όπου η διακύμανση της Επιφανειακής Τάσης επιφέρει μορφογόνο αντίκτυπο στη διευθέτηση των τριδιάστατων κελλιών, στη διεργασία σχηματοποίησης συμμετέχει και η μεταβλητή της πίεσης σύμφωνα με το νόμο **Laplace**:

Επιγραμματικά, αυτή η διαφορά πίεσης  $\Delta p$  όσον αφορά στη δομή «κηρήθρας» συσχετίζεται με την ακτίνα καμπυλότητας  $r$  μέσω της σχέσης:

$$\Delta p \propto \frac{T}{r} \quad (6.5.7.1.)$$

και αναφορικά προς τη δομή «αφρού» με τις κύριες ακτίνες  $r_1$  και  $r_2$  μέσω της σχέσης:

$$\Delta p \propto T \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (6.5.7.2.)$$

όπου  $T$  η Επιφανειακή Τάση.

Όταν τα κελλιά είναι ίδιου μεγέθους και σχήματος (οπότε ισχύει η συνθήκη  $\Delta p \rightarrow 0$ ) τότε οι παραπάνω απαιτήσεις στις δυο διαστάσεις συμβιβάζονται με μια ταξίθεση κανονικών εξαγώνων ( $\tilde{n} = 6$ ) και στις τρεις με μια χωροταξία από τετρα-και-δεκάεδρα ( $f = 14$ ,  $\tilde{n} = 5,14$ ). Στα πλαίσια τέτοιας θεώρησης τα τριδιάστατα κυψελωτά στερεά («αφροί») είναι ενδιαφέροντα για τη στερεοτυπία του μηχανισμού μέσω του οποίου αδροποιούνται (“aliasing”, “coarsening”) καθώς και για τις τοπολογικές συνέπειες. Το σχήμα των κελλιών αδροποιείται (ή «γωνιοποιείται») όσο ευνοείται η διάχυση του περιεχομένου ρευστού διαμέσω των διαχωριστικών επιφανειών (εδρών) που τα διασυνδέουν. Ο ρυθμός αυτής της διάχυσης είναι ανάλογος του γινομένου της Διαφοράς Πίεσης επί το Εμβαδόν της επιφάνειας διεπαφής [Eqn. (6.5.7.1.), (6.5.7.2.)].

Νόμος Αύξησης του von Neumann (von Neumann, 1952; Rivier, 1986; Fortes, 1986a): υπολογίζει το ρυθμό αύξησης του εμβαδού που καταλαμβάνει η επιφάνεια διδιάστατου κελλιού (“honeycomb”), ως σχέση αναλογίας προς το πλήθος των πλευρών του μείον τον ακέραιο αριθμό **έξι** [6]:  $\{\{\{*\}\}\}$

$dA/dt = C1 (n - 6)$  όπου  $A$  το εμβαδόν της επιφάνειας του μεμονωμένου κελλιού στη διάταξη «κηρήθρας»,  $n$  ο αριθμός πλευρών (ακμών) του δεδομένου κελλιού και  $C1$  μια σταθερά.

Η αντίστοιχη τριδιάστατη εκδοχή του ίδιου νόμου διατυπώνεται από τον Rivier (1983) υπό τη μορφή:

$$dV/dt = C2 (f - \tilde{n}) \quad (6.5.7.3.)$$

όπου  $V$  ο όγκος μεμονωμένου κελλιού στη διάταξη «αφρού» (“foam”),  $f$  ο αριθμός εδρών του δεδομένου κελιού και  $\tilde{n}$  ο μέσος αριθμός εδρών ανά κελλί για τη δεδομένη διάταξη «αφρού» που συχνά ισούται προς ( $\tilde{n} = 14$ ) και  $C2$  μια άλλη σταθερά.

Συνάγεται ότι σε δεδομένη κυψελωτή διάταξη, κελλιά με περισσότερες πλευρές τείνουν να αυξάνονται σε μέγεθος ενώ αυτά με λιγότερες, να ελαττώνονται σε μέγεθος. Τα εξάπλευρα κελλιά στις δυο διαστάσεις και τα τετρα-και-δεκάπλευρα κελλιά στις τρεις, παραμένουν αμετάβλητα στο μέγεθος. Οι τοπολογικές επιπτώσεις των προαναφερθέντων συνοψίζονται σε μια ροπή του συνόλου συστήματος προς ολοένα και μεγαλύτερη ετερογένεια (ανισοτροπισμό) στο γενικό αρχιτεκτονικό του μοτίβο (pattern) που μπορεί μακροπρόθεσμα να κλιμακωθεί μέχρι μια υπερβολικά ευρεία διακύμανση του μεγέθους κελλιού (Weaire and Kermode, 1983). Τέτοια μοτίβα σαν κι αυτά που εικονίζονται στην [Εικ. II.6.77.], αποκλίνουν θεαματικά από τα αντίστοιχα θεωρητικώς υπολογιζόμενα τριδιάστατα δίκτυα **Voronoi** εξαιτίας των αυθόρμητων (και κατά συνέπεια



αστάθμητων, υπερβολικά πολύπλοκων) θερμοδυναμικών μετασχηματισμών που καθοδηγούνται από την επιφανειακή τάση. Έτσι στο τριδιάστατο κυψελωτό της [Εικ. II.6.77.] τα μικρότερα κελλιά καταλήγουν να αφομοιώνονται και να συγχωνεύονται στα τοιχώματα των μεγαλύτερων, οργανώνοντας μια τοπογραφική κατανομή πολύ ετερογενούς-ανισοτροπικής διαμόρφωσης (*anisotropic patterning*) και διαβαθμίζοντας μια πολύ αμβλυμένη κλίμακα διαστάσεων (*scaling*) που μπορεί να κυμαίνεται μέχρι και δυο τάξεις μεγέθους (Lakes, 1993).

**\*\*\*** Αν όλες οι ακμές (*edges*) είναι μήκους  $l$  και όλες τέμνονται υπό γωνία  $120^\circ$ , τότε οι ακμές ενός ( $n$ -πλευρου) κελιού με  $n$  ακμές θα κυρτώνονται υπό μια γωνία  $\{a\}$  που υπολογίζεται από τη σχέση:

$$2a = 2 \left( 60 - \frac{360}{n} \right) \quad (6.5.7.4.)$$

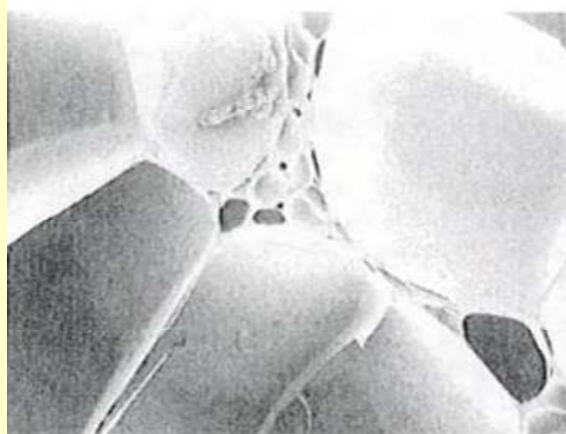
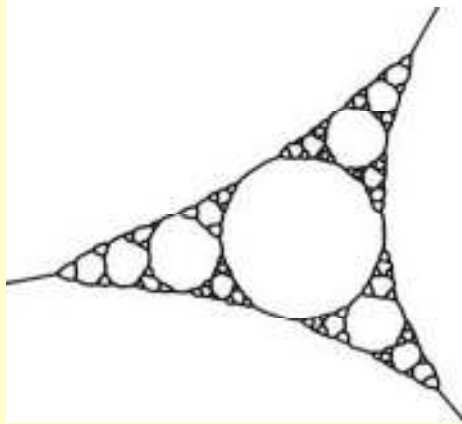
και με μια ακτίνα καμπυλότητας  $\{R\}$  που αποδίδεται από τον τύπο:

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{l} \left( 60 - \frac{360}{n} \right) \quad (6.5.7.5.)$$

Τότε ο ρυθμός μεταβολής του εμβαδού της επιφάνειας κελιού  $\{dA/dt\}$  θα είναι ανάλογος του όρου:  $n \left( 60 - \frac{360}{n} \right)$  είτε θα είναι ανάλογος του όρου:  $(n - 6)$ .

#### **Ανισοτροπισμός σχήματος και μεγέθους κελλιού στα συνθετικά πολυμερή:**

Σχηματική προβολή στο επίπεδο του χαρτιού, μιας διατομής από δείγμα της κελλωτής μάζας του συνθετικού πολυμερούς που εικονίζεται δεξιά. Το σχήμα αποσκοπεί σε μια εποπτικότερη αναπαράσταση της ευρείας διακύμανσης του μεγέθους κελλιού που διαπιστώνεται στα πραγματικά χωροπληρωτικά μοτίβα που παρατηρούνται στα περισσότερα από τα αβιοτικά κελλωτά στερεά που απαντώνται στη φύση.

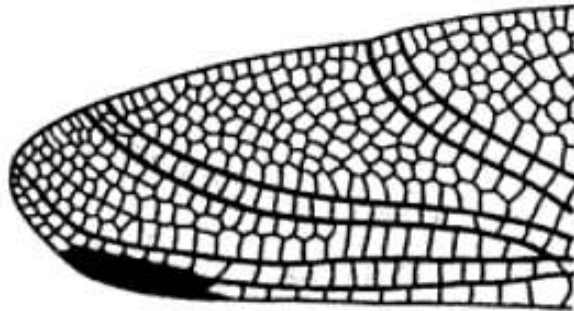


Μικροφωτογραφία κελλωτού πολυμερούς τριδιάστατου τύπου ("foam") όπου αποτυπώνεται η στερεοδιάταξη της ευρείας διασποράς του μεγέθους των κελλιών. Η εικόνα αυτή θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει την εκπλήρωση της υλικής αναπαράστασης όλου του **ανισοτροπισμού** που συνοψίζεται στο αριστερό γεωμετρικό σχήμα (ή ίσως και περισσότερου)!

**Εικόνα II.6.77.:** διακύμανση μεγέθους κελλιού συναρτήσει της διακύμανσης σχήματος κελιού (Weaire and Rivier, 1984)

Στην παραγωγή κυψελωτών στερεών, εκτός των αβιοτικών μορφογόνων παραγόντων της επιφανειακής τάσης, του ιξώδους, κλπ, συντρέχουν και πολλοί άλλοι, ενώ σε εκείνους που υποβάσκουν στις διεργασίες της ιστογένεσης, της αναγέννησης, κλπ, κατά την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών συνδράμουν και ποικίλοι βιοτικοί που διαμορφώνουν το κυτταρικό σχήμα συναρτήσει των πεδίων τάσεων όπου υποβάλλεται η δεδομένη ανατομική δομή (Currey, 1984):

- 1] π.χ. στα σπογγώδη οστά η ανατομική τοπογραφία των οστεοκυττάρων αποτυπώνει τις διευθύνσεις των κύριων τάσεων όπου υποβάλλεται ολόκληρη η ανατομική δομή,
- 2] εξωγενείς και ενδογενείς μηχανικές παράμετροι καθορίζουν τον προσανατολισμό των κυττάρων στο ξύλο (Dinwoodie, 1981), την τοπογραφική κατανομή εξωκυτταρικών υλικών και πιθανότατα τη μορφογένεση των φυτικών οργάνων,
- 3] στο σκαρίφημα της πτέρυγας λιβελούλας στην εικόνα [Εικ. II.6.78.], επισημαίνεται η χαρακτηριστική διάταξη των «νεύρων» ίσου πάχους που διασταυρώνονται υπό γωνία  $120^\circ$  σχηματοποιώντας ένα υποτυπώδες, αδρό εξαγωνικό δίκτυο, καθώς επίσης διακρίνεται και η διαφορετική διευθέτηση την οποία ακολουθούν τα «νεύρα» μικρότερου πάχους που τέμνονται με τα παχύτερα, υπό γωνίες  $90^\circ$  περίπου, πιθανότατα επειδή έτσι μεγιστοποιείται ο λόγος ακαμψίας προς βάρος (*stiffness-to-weight ratio*) ολόκληρης της πτέρυγας. Συνεπώς είναι η ειδική –κατά περίπτωση– μηχανική απόδοση (*“mechanical efficiency”*) κι όχι η ελαχιστοποίηση του μήκους ή του εμβαδού, που σχηματοποιεί τη δεδομένη δομή.



**Εικόνα II.6.78.:** Μακροσκοπικώς ορατά «μοναδιαία κελλιά» στην πτέρυγα λιβελούλας. Οι ακμές -ίσου πάχους- τέμνονται μεταξύ τους υπό γωνίες  $120^\circ$  σε περιοχές ομοιογενούς μοτίβου, αλλά οι λεπτότερες ακμές διασταυρώνονται με τις παχύτερες υπό γωνίες  $90^\circ$  (Thompson, 1961).

#### 6.5.8. Νόμος Aboan-Weaire (*“Aboan-Weaire's law”*)

Είναι γενικός ο κανόνας που επιβάλλει στα κελλιά (κύτταρα, *cells*) με πλήθος ακμών, μεγαλύτερο του μέσου όρου που αναλογεί για το δεδομένο κελλωτό δίκτυο όπου ανήκουν (ή συμμετέχουν), να συνυπάρχουν (*sensu lato*) ή και να γειτονεύουν ακόμη (*sensu stricto*) με άλλα, για τα οποία το άθροισμα των ακμών τους οφείλει να είναι οπωσδήποτε μικρότερο της μέσης αυτής τιμής. Ενώ στην «αντίθετη» περίπτωση, η ίδια τοπολογική συνθήκη πλαισιώνει –είτε σε εγγύτερη είτε σε απώτερη γειτνίαση– το κελλί που φέρει πλήθος ακμών, μικρότερο του μέσου όρου που αντιστοιχεί στο δίκτυο, με κελλιά που το σύνολο των ακμών τους είναι οπωσδήποτε μεγαλύτερο της μέσης αυτής τιμής. Η πιο σύγχρονη επιβεβαίωση της τοπολογικής αυτής συσχέτισης (ή γειτνίασης) μεταξύ κελλιών διαφορετικών σχημάτων, που διευθετούνται σε ποικίλα είδη αβιοτικών κελλωτών στερεών, έχει τις απαρχές της στις καινοτόμες μελέτες του **Smith** που επικεντρώθηκαν κυρίως σε «κηρήθρες» σάπωνα (Smith (1952, 1964)) και συστηματοποιήθηκε στις εργασίες των **Aboan** και **Weaire**, αποκρυσταλλώνοντας το γνωστό νόμο των **Aboan** και **Weaire** (**Aboan, 1970, 1980; Weaire, 1974**), ο οποίος αποτελεί γενίκευση μιας μαθηματικής σχέσης που αναφέρεται στα κελλωτά στερεά δυο διαστάσεων και αποδίδεται με τον εξής τύπο:

$$\bar{m} = 5 + \frac{6}{n} \quad (6.5.8.1.)$$

όπου  $n$  ο αριθμός ακμών του ζητούμενου κελλιού (ή άγνωστου κελλιού, του οποίου το πλήθος ακμών ζητείται) και  $\tilde{m}$  ο μέσος αριθμός ακμών των  $n$  γειτονικών του κελλιών (Weaire and Rivier, 1984).

Η φυσική σημασία της στατιστικής αυτής σχέσης διατυπώνεται περιφραστικά ως εξής:  
«όσο περισσότερες ακμές προσλαμβάνει ένα κελλί τόσο λιγότερες –κατά μέσο όρο– καταλαμβάνουν εκείνα που το περιβάλλουν σε εγγύτατη γειτνίαση (που γειτονεύουν με αυτό)».

Η εύλογη αναδιατύπωση της σχέσης αυτής στις τρεις διαστάσεις του Ευκλείδειου χώρου λαμβάνει τη μορφή:

$$\tilde{g} = 13 + \frac{14}{f} \quad (6.5.8.2.)$$

όπου  $f$  ο αριθμός εδρών του ζητούμενου κελλιού (με το άγνωστο πλήθος εδρών) και  $\tilde{g}$  ο μέσος αριθμός εδρών των  $n$  γειτονικών του κελλιών.

Ενώ η φυσική ερμηνεία της επισημαίνει ότι «όσο περισσότερες έδρες προσλαμβάνει ένα κελλί τόσο λιγότερες –κατά μέσο όρο– καταλαμβάνουν εκείνα που συνορεύουν με αυτό».

Υπολογισμοί από τον Fortes επαληθεύουν την εξίσωση για μέσο αριθμό εδρών  $\tilde{g} = 14$  (Fortes M., 1995).

### 6.5.9. Ο «κανόνας του Lewis» (“Lewis’s rule”)

#### 6.5.9.α. Βασικές γνώσεις

Ο Lewis (Lewis F. T., 1923, 1928, 1930, 1931, 1943), εξετάζοντας ποικιλότητα διδιάστατων κελλωτών στερεών βιολογικής προέλευσης παρατήρησε ότι το εμβαδόν της κυτταρικής επιφάνειας μεταβάλλεται γραμμικά συναρτήσει του πλήθους ακμών του κυτταρικού περιγράμματος:

$$\frac{A(n)}{A(\tilde{n})} = \frac{n - n^o}{\tilde{n} - n^o} \quad (6.5.9.1.)$$

όπου  $A(n)$  το εμβαδόν κυττάρου με  $n$  ακμές και  $A(\tilde{n})$  το εμβαδόν κυττάρου με αριθμό ακμών ίσο προς το μέσο πλήθος πλευρών  $\tilde{n}$  και  $n^o$  μια σταθερά την οποία ο Lewis υπολόγισε ίση προς την ακέραια τιμή **έξι [6]**.

Η σχέση επαληθεύεται για δίκτυα **Voronoi** ενώ ο Lewis την επιβεβαιώνει και για τα περισσότερα άλλα διδιάστατα κελλωτά δίκτυα (Rivier and Lessowski, 1982). Η γενικευμένη διατύπωσή της για τρεις διαστάσεις είναι (Rivier, 1982):

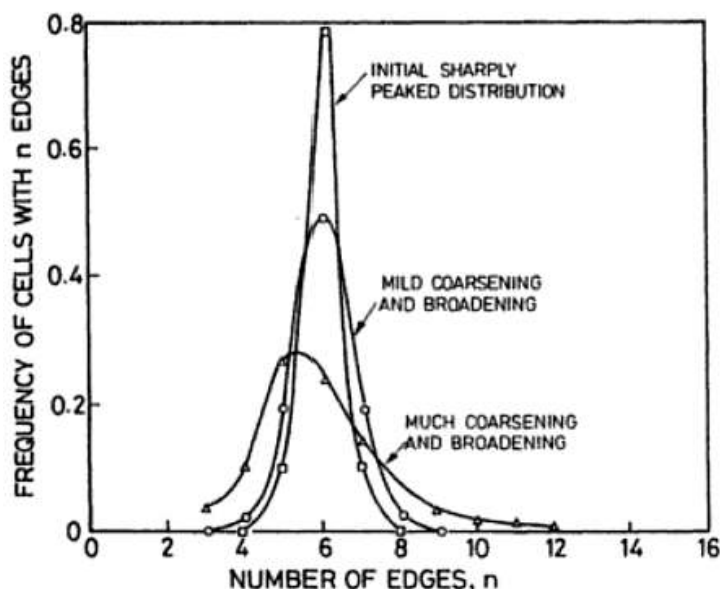
$$\frac{V(f)}{V(\tilde{F})} = \frac{f - f^o}{\tilde{F} - f^o} \quad (6.5.9.2.)$$

όπου  $V(f)$  ο όγκος πολυεδρικού κυττάρου με  $f$  έδρες και  $V(\tilde{F})$  ο όγκος πολυεδρικού κυττάρου με αριθμό εδρών ίσο προς το μέσο πλήθος εδρών  $\tilde{F}$  και  $f^o$  μια σταθερά που ισούται περίπου προς την ακέραια τιμή **τρία [3]**.

### 6.5.9.b. Ο ανισοτροπισμός των κελλωτών δικτύων αντικατοπτρίζει το μορφογόνο αντίκτυπο των τοπολογικών νόμων

Αυτά τα αποτελέσματα αποσαφηνίζουν περαιτέρω τις τοπολογικές συνέπειες της «αδροποίησης» («γωνιοποίησης», “aliasing”, “coarsening”) του κυτταρικού σχήματος (“cell shape”) και της συνάθροισης (“aggregate”) σε κελλωτά δίκτυα, δηλαδή της μετάπτωσής του προς περισσότερο «γωνιώδη μορφολογία» καθώς και του μετασχηματισμού του τοπογραφικού μοτίβου προς περισσότερο ετερογενή-ανισοτροπική διαμόρφωση (*anisotropic patterning*). Δηλαδή η εικόνα του κελλωτού στερεού αντιπροσωπεύει πολύ εμφατικά μια διαμόρφωση που κανονικά αντιστοιχεί σε αβιοτικό δίκτυο κελλιών (όχι κυττάρων) όπου έχει επικρατήσει το πληθυσμιακό κλάσμα εκείνων με το μικρότερο αριθμό ακμών.

Οι σχέσεις αυτές παραμετροποιούν τη στερεότυπη γεωμετρική συνθήκη κατά την οποία ένα κελλί (κύτταρο), μεγαλύτερο του μέσου μεγέθους του δικτύου, πλαισιώνεται από έναν αριθμό γειτόνων, των οποίων το μέγεθος είναι οπωσδήποτε μικρότερο της μέσης αυτής τιμής. Η διαφορά πίεσης μεταξύ παρακείμενων κελλιών είναι ανάλογη της διαφοράς μεγέθους των εφαιπόμενων κελλιών και συμβαίνει συχνά στα αβιοτικά κελλωτά στερεά να είναι αυτή καθεαυτή η διαφορά της πίεσης εκείνη η σχηματοποιητική διεργασία που «αδροποιεί» (“aliasing”, “coarsening”) το μοτίβο της κελλωτής διευθέτησης. Όταν λοιπόν είναι η διάχυση του περιεχομένου ρευστού -μέσω των επιφανειών διεπαφής- που «γωνιοποιεί» το σχήμα κελλιού και το συνολικό τοπογραφικό μοτίβο, τότε ο ρυθμός της διαδικασίας αυτής σε τοπική κλίμακα τείνει να επιταχύνεται με το πέρασμα του χρόνου μέχρι τα μικρότερα και συνεχώς συρρικνούμενα κελλιά να εξαλειφθούν ολοσχερώς, γεγονός που ισοδυναμεί την «ισοζυγισμένη» τροφοδότηση των γεωμετρικών στοιχείων τους στα αντίστοιχα των μεγαλύτερων παρακείμενων κελλιών. Η ευόδωση της διεργασίας αδροποίησης συνοδεύεται παράλληλα από κλιμάκωση της διακύμανσης των διαστάσεων των κελλιών, πράγμα που αναπαριστάνει εποπτικά το διάγραμμα της εικόνας [Εικ. II.6.79.] που βασίζεται εν μέρει στις μελέτες του Aboan (Aboan, 1980) επί της εργασίας του Smith (Smith, 1952).



**Εικόνα II.6.79.:** Διαγραμματική απεικόνιση της πληθυσμιακής κατανομής των κελλιών που σχηματοποιεί ο αφρός σάπωνα, συναρτήσει της διακύμανσης στις διαστάσεις τους, καθώς το μέγεθος των κελλιών μεταβάλλεται εξαιτίας της διάχυσης του περιεχομένου αερίου με κατεύθυνση από τα μικρότερα, υψηλότερης πίεσης κελλιά προς τα μεγαλύτερα, χαμηλότερης πίεσης. Η σταδιακή αυθόρμητη μεταβολή του μεγέθους των κελλιών συνοδεύεται από μια συμμεταβολή του σχήματός τους εκλύοντας μια κλιμακούμενη διακύμανση (διασπορά, “dispersion”) στις διαστάσεις και στο σχήμα (Aboan, 1980)

Οι τοπολογικές ιδιότητες που συνοδεύουν την πολυκυτταρική οργάνωση της έμβιας ύλης σε διδιάστατα (*honeycombs*) και / ή τριδιάστατα (*foams*) κυτταρικά («κελλωτά») δίκτυα (*cellular solids*) επικεντρώνονται στη μεταβλητή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*). Η χρηστική αξία της στη στατιστική μελέτη των κελλωτών δικτύων δεν περιορίζεται μόνο σε εκείνα που οργανώνουν οι επιθηλιόμορφοι φαινότυποι, αλλά επεκτείνεται επιτυχημένα ακόμη και στις περιπτώσεις άφθονης παρουσίας *Εξωκυττάριας Θεμέλιας Ουσίας* («ΕΘΟ», *ECM*), όπως είναι –για παράδειγμα- εκείνες που σχετίζονται με το διαφοροποιημένο χόνδρινο ιστό στο στάδιο οργάνωσης των *ισογενικών ομάδων* (*isogenic groups*), καθώς και οι διδιάστατες καλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων. Η μόνη προϋπόθεση που απαιτείται για να μην καταλύεται η τοπολογική έννοια της *γεινιάσης* (*neighborhood*), είναι να διέπεται από ένα καθεστώς συνέχειας, η μεσοκυττάρια φάση που παρεμβάλλεται μεταξύ των κυτταρικών (ή κελλωτών) υπομονάδων (μοναδιαίων κελλιών). Δεδομένης αυτής της συνθήκης, υπάρχουν τρεις στατιστικές μέθοδοι οριοθέτησης του *μοναδιαίου κελλίου* (*unit cell*):

[α] *Voronoi tessellation*: η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για μοναδιαία κελλιά οποιουδήποτε πολυγωνικού σχήματος (Okabe A., Boots B., Sugihara K. and Chiu S. N., 2009),

[β] *Laguerre tessellation* (Lyckegaard A., Lauridsen E. M., Ludwig W., Fonda R. W. and Poulsen H. F., 2011) και [γ] *navigational map* (Richard P., Oger L., Troadec J. and Gervois A., 2001; Clusel M., Corwin E. I., Siemens A. O. N. and Brujic J., 2009): οι μέθοδοι αυτές είναι ειδικές για μοναδιαία κελλιά δισκοειδούς σχήματος, των οποίων οι διαστάσεις κυμαίνονται σύμφωνα με κάποια στατιστική κατανομή. Υπάρχει σήμερα μια ευρεία συλλογή από αλγόριθμους που διατίθενται για την έγκριτη οριοθέτηση συνοριακών γραμμών και / ή ακμών μεταξύ παρακείμενων δισκοειδών κελλιών που εμφανίζουν ανισοτροπισμό σχήματος, δηλαδή έναν κυμαινόμενο βαθμό παραμόρφωσης του αρχέτυπου κυκλικού σχήματος εξαιτίας της κατάλληλης διευθέτησής τους για διαμόρφωση μιας «κελλωτής διάταξης».

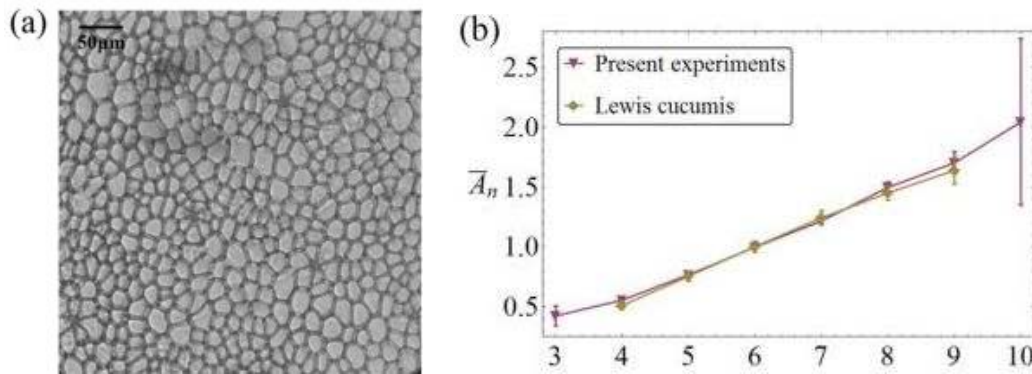
#### **6.5.9.c. Η επιθηλιακή οργάνωση των ζωικών και φυτικών ιστών παρέχει πληροφόρηση για την *in vivo* μορφογένεση του ανισοτροπισμού των κελλωτών δικτύων**

Επειδή ο νόμος Lewis (*Lewis' law*) έχει διατυπωθεί για βιολογικά κελλιά (κύτταρα) κρίθηκε σκόπιμο η φυσική σημασία της εξίσωσής του να αποδοθεί με περιφραστικό τρόπο:

1] Για τις διδιάστατες ανισοτροπικές κελλωτές διατάξεις («κηρήθρες»), ισχύει μια συνθήκη για τη διακύμανση του μεγέθους κελλίου, που ορίζει ότι κελλιά με ίδιο πλήθος γειτόνων, υιοθετούν εμβαδόν που μεταβάλλεται γραμμικά συναρτήσει του πλήθους αυτού.

2] Μεταξύ δυο κυττάρων, το μεγαλύτερο είναι εκείνο που συνορεύει με τους περισσότερους γείτονες (*neighbors*) και αντιστρόφως, οι διαστάσεις ενός κυττάρου είναι τόσο μεγαλύτερες, όσο περισσότεροι είναι οι γείτονες με τους οποίους συνορεύει.

3] Ένα κύτταρο που γειτονεύει με περισσότερους γείτονες, συγκριτικά προς ένα άλλο, τείνει να υιοθετήσει τη μορφολογία με τις μεγαλύτερες διαστάσεις και κατά συνέπεια την «πολυγωνικότερη» αναποτελεί δομική υπομονάδα «κελλωτού δικτύου».



**Εικόνα 11.6.80.: (α)** Μικροφωτογραφία που απεικονίζει την «κελλωτή διάταξη» 360 περίπου κυττάρων σε μια διατομή φυτικής επιδερμίδας, από έρευνες που πραγματοποίησε ο Lewis. Οι σχέσεις γειτνίασης μπορούν να εκτιμηθούν με τη στατιστική θεώρηση που εφαρμόζεται στα αβιοτικά «κελλωτά στερεά» και αναδεικνύουν το σημαντικό ανισοτροπισμό (*anisotropy, polydispersity*) του βιολογικού δείγματος που αποδίδεται κυρίως στο επιμηκυμένο σχήμα των περισσότερων κυττάρων. **(β)** Διαγραμματική παράσταση της εξάρτησης του «μέσου εμβαδού κελιού»  $\{\bar{A}_n\}$  από το «πλήθος γειτόνων»  $\{n\}$ .

(Kim S., Cai M., και Hilgenfeldt S., 2014)

Η μαθηματική διατύπωση του νόμου Lewis (*Lewis' law*) υποδεικνύει συνοπτικά ότι:

Το «μέσο εμβαδόν κελιών με  $n$  γείτονες»  $\{\bar{A}_n\}$  μεταβάλλεται γραμμικά με την τοπολογική παράμετρο του «πλήθους γειτόνων»  $\{n\}$ , δηλαδή ισχύει η σχέση:

$$\{\bar{A}_n\} = \kappa * n \quad (6.5.9.3.)$$

Δεδομένου όμως ότι το Πεδίο Τιμών της τοπολογικής παραμέτρου  $\{n\}$  αντλεί τιμές από το Σύνολο των Φυσικών Αριθμών  $\{\mathbb{N}\}$ , η μέση τιμή του εμβαδού  $\{\bar{A}_n\}$  ανά κελί με  $n$  γείτονες, είναι εύλογο να υπολογίζεται ξεχωριστά για κάθε διακριτή τιμή πλήθους γειτόνων  $\{n\}$ .

Το «Γκρανοκεντρικό μοντέλο» (*Granocentric Model (GM)*) αξιοποιήθηκε για τη στατιστική ερμηνεία της γειτνίασης σε τριδιάστατες διευθετήσεις και χωροπληρωτικές διατάξεις κόκκων και φυσαλίδων (Bruijic J. et al., 2009, 2010, 2011). Πρόσφατα οι Kim και Hilgenfeldt (2014), κατέστρωσαν μια παραλλαγμένη εκδοχή του Γκρανοκεντρικού μοντέλου, διασκευασμένη για διδιάστατες ανισοτροπικές κελλωτές διατάξεις («κρηθρές») αποσκοπώντας στον προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ τοπολογίας και μεγέθους κελιού (*size-topology correlations*) (Miklius M. P. and Hilgenfeldt S., 2012; Bruijic J. et al., 2012; Hilgenfeldt S., 2013).

Μια στατιστική συλλογή από δισκοειδή κελιά με κατανομή μεγέθους (*size distribution with probability  $P(A)$ , mean size  $\bar{A} = 1$* ) χρησιμοποιήθηκε για να προμηθεύσει δίσκους κυμαινόμενων διαστάσεων προκειμένου να συμπληρώσουν μια εγγύτατη γειτονιά κελιών, εφαπτόμενων σε κεντρικό δίσκο (σταθερού) εμβαδού (**Ac**).

Επαναλαμβάνουμε τη διευθέτηση για κεντρικό δίσκο με διαφορετική τιμή εμβαδού (**Ac!**).

Δηλαδή το πείραμα έγκειται σε μια διευθέτηση, στην εγγύτατη γειτονιά κεντρικού δίσκου μεταβλητού εμβαδού (**Ac**), (ανισοτροπικών) κελιών με εμβαδά που κυμαίνονται ως προς μια μέση τιμή  $\bar{A} = 1$  άρα και με περιμέτρους που κυμαίνονται ως προς μια μέση περίμετρο  $\hat{S} = f(1)$ .

Τόσο είναι συνεπώς και το κλάσμα της περιφέρειας του κεντρικού δίσκου που καταλαμβάνει κάθε γειτονικό του (εφαπτόμενο) κελλί. Καθώς όμως περιβάλλεται από  $n$  τέτοια κελιά, συναθροίζουν

$$\text{για την περιφέρειά του την τιμή } S_n \approx n * \hat{S}. \quad (6.5.9.4.)$$

Δεδομένης της εκθετικής σχέσης κλιμάκωσης του εμβαδού συναρτήσει της περιμέτρου, το εμβαδόν του κεντρικού δίσκου αναμένεται να αποτελεί εκθετική συνάρτηση του πλήθους γειτόνων, δηλαδή

$$\text{να ισχύει η σχέση: } Ac = A_n \approx n^2 \quad (6.5.9.5.)$$

Αλλά αν στο εμβαδόν ( $A_c = A_n$ ) του κεντρικού δίσκου, αντιπροσωπεύεται το μέσο εμβαδόν  $\{\bar{A}_n\}$  των κελιών με  $n$  γείτονες, τότε είτε υπεισέρχεται αντίφαση στο νόμο Lewis, είτε υπεισέρχεται ένας μη προφανής παράγοντας, που διασφαλίζει την ισχύ της γραμμικής σχέσης την οποία προτάσσει.

Η παραλλαγμένη εκδοχή του Γκρανοκεντρικού μοντέλου, διασκευασμένη από τους Kim και Hilgenfeldt (2014), για διδιάστατες ισοτροπικές (*non polydisperse*) κελλωτές διατάξεις («κηρήθρες») διατείνεται ότι:

1] Τα επαπτόμενα κελιά της εγγύτατης γειτονιάς διατάσσονται σε γωνίες  $\phi$  ως προς τη θέση του κεντρικού δίσκου και, δεδομένης της προαναφερθείσας κατανομής πιθανότητας  $P(A)$  (*size distribution with probability  $P(A)$ , mean size  $\bar{A} = 1$* ), είναι εφικτός ο ορισμός της δεσμευμένης πιθανότητας (*conditional probability*):

$P(\phi | A_c)$  για τον υπολογισμό της γωνίας  $\phi$  και κατ'επέκταση ορίζεται και η πιθανότητα να περιβάλλεται από  $n$  γείτονες, ο κεντρικός δίσκος:  $P(n | A_c)$ .

2] Αν ο κεντρικός δίσκος δε διαφέρει από οποιονδήποτε άλλο στην ισοτροπική (*non polydisperse*) διάταξη, τότε ορίζεται η μη δεσμευμένη πιθανότητα (*unconditional probability*) γειτνίασης με  $n$  γείτονες:  $P_n = \int P(n | A_c) P(A_c) dA_c$  (6.5.9.6.)

3] Για μια επιπεδοπληρωτική (*non polydisperse*) διευθέτηση μοναδιαίων κελιών που υιοθετούν ισοτροπικά (ή κανονικά) πολυγωνικά σχήματα, είναι επιβεβλημένο να πληρούν τη συνθήκη του θεωρήματος Euler (*Euler's theorem*) που προβλέπει για άπειρο πλήθος κελιών, μέση τιμή γειτόνων  $\bar{n} = 6$ . Στα πλαίσια του παραλλαγμένου Γκρανοκεντρικού μοντέλου η συνθήκη ικανοποιείται είτε με την εισήγηση μιας εγγύτατης γειτονιάς από επαπτόμενους και μη επαπτόμενους, ισοτροπικούς (*non polydisperse*) δίσκους, είτε με την εισήγηση ενός γενικού συντελεστή για τη μέγιστη πιθανή γωνία (ως προς τον κεντρικό δίσκο) που μπορεί να καταληφθεί από οποιοδήποτε επαπτόμενο κελί της εγγύτατης γειτονιάς του κεντρικού δίσκου. Με άλλα λόγια ο συντελεστής αυτός αντικατοπτρίζει τη μαθηματική εκδοχή της «παρεμβαλλόμενης απόστασης» μεταξύ των επιφανειών των παρακείμενων κελιών (*stand-off distance*) (Miklius M. P. and Hilgenfeldt S., 2012).

4] Η παραλλαγμένη αυτή εκδοχή πέτυχε την ερμηνεία προγενέστερων εμπειρικών σχέσεων για τις κατανομές των  $P(A)$  και  $P_n$ :

(i) μέσω της εισήγησης συντελεστή μεταβολής για τα  $cA$  και  $c_n$  των κατανομών

(ii) μέσω της εφαρμογής του θεωρήματος Bayes (*Bayes' theorem*) υπολογίστηκε το  $P(n|A_c)$  παρέχοντας μια αναλογία προς τον κανόνα Lewis (δηλαδή τη συσχέτιση  $\bar{A}_n$  versus  $n$ ) που όμως υποδηλώνει μη γραμμική μεταβολή συναρτήσεως του  $n$

δηλαδή αναλογία προς τη συσχέτιση ( $\bar{A}_n \sim n^2$ )

Ωστόσο η αναπροσαρμογή σε ένα μεγαλύτερο εύρος κατανομής  $c_n$  για τη δεδομένη τιμή  $cA$  προσδίδει στη σχέση Lewis περισσότερο γραμμικό χαρακτήρα (*linearity*). Συνεπώς, ο μη προφανής παράγοντας που κατοχυρώνει τη γραμμικότητα της συσχέτισης που υποδεικνύει ο νόμος Lewis, έγκειται στην ύπαρξη ενός ολόκληρου φάσματος από περισσότερο διευρυμένες (ή ανισοτροπικές) κατανομές γειτόνων, με βάση κάποια από τις εκφάνσεις ανισοτροπισμού που παρατηρούνται στα ιστολογικά παρασκευάσματα».

#### 6.5.9.d. Οι μεσεγχυματικές συναθροίσεις (*MSC aggregates*) στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες παρέχουν πληροφόρηση για την *in vitro* μορφογένεση του ανισοτροπισμού των κελλωτών δικτύων

Ο μη ισοτροπικός χαρακτήρας (*anisotropy*) των μοναδιαίων επικρατειών-κελλιών (*unit cells*), είναι πιθανότατα ο μη προφανής παράγοντας που συνοψίζει όλες τις πηγές των αποκλίσεων (*deviations*) που παρατηρούνται στα RVP κελλωτά συστήματα (*random Voronoi tilings, Random*



*Voronoi Polygons (RVP)*), όπως παραδείγματος χάριν διαπιστώνονται στις δυσανάλογα (ή ασύμμετρα) άνισες (π.χ. επιμηκυσμένες) ακμές που οριοθετούν τα φυσικά πολυγωνικά / πολυεδρικά κελλιά, οι οποίες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις αντίστοιχες ακμές που υπολογίζουν και πλαισιώνουν γύρω από τις κυκλοτερείς περιμέτρους των δισκοειδών κελλιών, οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται στη χαρτογράφηση *navigational map* και κατά την *Laguerre tessellation*. Στα *RVP κελλωτά δίκτυα (random Voronoi tilings, Random Voronoi Polygons (RVP))*, οι μοναδιαίες επικράτειες (*unit cells*), καταστρώνονται υπολογιστικά (*calculating*) χωρίς συσχέτιση με φυσικοχημικές μεταβλητές, ενώ αντιθέτως στις φυσαλίδες σάπωνα [Εικ. II.6.68.] υπεισέρχονται περιοριστικές συνθήκες ενεργειακών κατανομών οι οποίες καθοδηγούν τη σχηματοποίηση των μοναδιαίων κελλιών και των δικτύων τους βάσει θερμοδυναμικών αρχών, όπως εκείνης που περιορίζει την επιφανειακή κατανομή ενέργειας μέσω ελαχιστοποίησης του λόγου επιφάνειας προς όγκο (*energy minimization to assume isotropic shapes of aspect ratios near one and without favored directions*) (Miklius M. P. and Hilgenfeldt S., 2012; Weaire D. and Rivier N., 1984; Weaire D. L. and Hutzler S., 1999; Flament C. et al., 2000; Warren W. E., 1999; Stone H. A., 2001; Sullivan J. M., 2004; Tsai J.-C., 2008).

Η εναλλακτική υπόθεση εργασίας που αντιπαρέρχεται την αστοχία του αναβαθμισμένου –για ιστροπικούς (*non polydisperse*) δίσκους- μοντέλου να επαληθεύσει το νόμο Lewis (*Lewis' law*), αντιπροτείνει ότι η μορφολογία και η διευθέτηση που υιοθετούν οι ανισοτροπικές (*polydisperse*) επικράτειες-κελλιά συνοψίζουν το μη προφανή παράγοντα που εξασφαλίζει τη γραμμικότητα της σχέσης που διατυπώνεται στο νόμο Lewis για δεδομένη διασπορά εμβαδού κελλιού (*for a given polydispersity of areas*). Διότι η ετερογένεια (*anisotropy*) σχηματοποίησης και διευθέτησης διευρύνει την ποικιλότητα των προτύπων-μοτίβων γειτνίασης (*cell-cell conjugation pattern*), σε συνάρτηση με τον περιορισμό των βαθμών ελευθερίας που αφομοιώνουν στο σχετικό προσανατολισμό (*relative positioning and orientation*) κατά την επαφή τους με το «κεντρικό κελλί» της γειτνίασης.

Κατά συνέπεια τα μικρότερα κελλιά επιφυλάσσουν περισσότερους βαθμούς ελευθερίας για το σχετικό προσανατολισμό της διεπαφής με ένα ευμεγεθέστερο κεντρικό κελλί. Κατ'επέκταση ο ανισοτροπικός χαρακτήρας που υλοποιούν επικεντρώνεται εκλεκτικά στις βραχείες ακμές με τις οποίες εφάπτονται στο κεντρικό κελλί. Και αντιστρόφως, το τοπολογικό καθεστώς γειτνίασης στο βαθμό που περιορίζει και διατηρεί περιορισμένο το μήκος των ακμών, ευνοεί τη γειτνίαση του κεντρικού κελλιού με σχήματα εναλλακτικών μορφολογιών που συμβιβάζονται με τη συρρίκνωση των διαστάσεων τους [Εικ. II.6.79.]. Αυτή η συνθήκη ανισοτροπισμού επιβεβαιώνεται στις περιπτώσεις που τα κύτταρα σχηματοποιούνται προς ατρακτόμορφες διαμορφώσεις, όπως εκείνες που παρατηρούνται κατά κόρον στις διδιάστατες μεσεγχυματικές κυτταροκαλλιέργειες [Εικ. II.5.46.]. Έτσι, στοιχειοθετείται επαγωγικά μια εναλλακτική συνιστώσα ανισοτροπισμού, εξαρτημένη από το σχετικό προσανατολισμό (*relative orientation, orientation disorder*) των κυτταρικών διεπαφών. Επιπρόσθετα, παραπέμπει εύλογα και στις υπόλοιπες συνιστώσες του ανισοτροπισμού, που εξαρτώνται από τη διεύθυνση διάταξης (*relative positioning, positioning disorder*) των παρακείμενων κυττάρων στην εγγύτερη γειτονιά του θεωρούμενου «κεντρικού κυττάρου» και απορρέουν από τη διακύμανση των διαστάσεων (*size disorder*) και του σχήματος (*cell shape disorder*) των εφαπτόμενων κυττάρων. Παράλληλα, εξασφαλίζεται η δυνατότητα διατήρησης αμετάβλητου του λόγου αναλογίας των βραχύτερων προς τις μακρύτερες ακμές (*aspect ratio  $\alpha$* ) μέσω αντισταθμιστικών μεταβολών για τις άλλες συνιστώσες του ανισοτροπισμού. (*Εναλλακτικά, η στατιστική προσέγγιση θα μπορούσε να εισηγηθεί μια συνεχή κατανομή για τον aspect ratio  $\alpha$  (continuous aspect ratio distribution), περιπλέκοντας όμως τους υπολογισμούς εξαιτίας της επιπρόσθετης μεταβλητής για ολοκλήρωση*). Υπό αυτή τη θεώρηση η προαναφερθείσα συνιστώσα (*orientation disorder, [O-D]*) συμπεριλαμβάνεται ως υποσύνολο και συστεγάζεται στον όρο που συνοψίζει τον ανισοτροπισμό σχήματος (*cell shape disorder, [CS-D]*), που υπεισέρχεται στα κελλωτά εκείνα δίκτυα για τα οποία υποβόσκει μια γραμμική εκδοχή του νόμου Lewis.

**6.5.10. Η *in vitro* προσαρμοστική αλληλεπίδραση μεταξύ της «τερματικής» ατρακτοειδούς μορφογένεσης και της μεσεγχυματικής συνάθροισης (*MSC aggregation*), παρέχει ένα υπόδειγμα παραλληλισμού προς την τοπολογική αλληλεξάρτηση μεταξύ της πλαστικότητας των κυτταρικών σχημάτων (*cell shape plasticity*), της διακύμανσης των διαστάσεών τους (*domain size polydispersity*) και της συνδεσιμότητάς τους, με στατιστικούς όρους (*neighbor number statistics*)**

Σε αντιπαράθεση προς τους περιορισμούς που διαπιστώνονται στα ιστροπικά διδιάστατα κελλωτά δίκτυα, στα μη ιστροπικά πλεονάζουν οι δυνατότητες αντιστάθμισης (*compensation, accomodation, tolerance*) των τοπολογικών διενέξεων που συνοδεύουν τη διευθέτηση κελλιών που για τον οποιονδήποτε λόγο, αποκλίνουν από το «μέσο μοναδιαίο κελλί» (ή τη «μέση μορφολογία») και κατ'επέκταση εισαγάγουν στην κελλωτή διάταξη κάποια μορφή ανισοτροπισμού προσανατολισμού (*orientation disorder, [O-D]*). Αν την τοπολογική αλληλεπίδραση μεταξύ ανισοτροπισμού μεγέθους και σχήματος, μονοπωλούσε αποκλειστικά ο **νόμος Aboav – Weaire**, τότε κατά τη μορφογένεση των κελλωτών διατάξεων, ένα ευμεγεθέστερο «κεντρικό κύτταρο» θα έτεινε να πλαισιώνεται από περισσότερους γείτονες ( $n > 6$ ) και συγχρόνως μικρότερους και με λιγότερες ακμές, δρομολογώντας έτσι μια άμβλυνση (ή διασπορά) στο εύρος της κατανομής του μεγέθους κελλιού, που γρήγορα θα κλιμακωνόταν σε υπερθετικό βαθμό. Αλλά συνυπολογίζοντας και την τοπολογία που υποβόσκει στον κανόνα Lewis, αποκαλύπτεται ο μορφογόνος αντίκτυπος του ανισοτροπισμού προσανατολισμού (ή συναρμογής), ο οποίος εμπλουτίζει τους βαθμούς ελευθερίας για «προσαρμοστική συναρμογή» (*“adaptive assemblance”*), επιτρέποντας κατάλληλη αντισταθμιστική κλιμάκωση του μέσου εμβαδού  $\bar{A}_n$  για τα κελλιά που περιβάλλουν το κεντρικό, το οποίο κατ'αυτόν τον τρόπο μπορεί εν'κατακλείδι να εφάπτεται με μικρότερο πλήθος γειτόνων ( $n < 6$ ). Το καθεστώς αυτό της αλληλεξάρτησης των προαναφερθέντων τοπολογικών νόμων, στο βαθμό που συγκλίνει στη συνιστώσα του προσανατολισμού διευθέτησης (*orientational disorder, [O-D]*) και τροφοδοτεί (ή καθοδηγεί) την προσαρμοστική πλαστικότητα της σχηματοποίησης των μοναδιαίων κελλιών (*cell shape plasticity*), δικαιολογεί επιπλέον και γιατί η εξάρτηση της μεταβολής του εμβαδού  $A_c$  του «κεντρικού κυττάρου» της εστίας γειτνίασης, από το πλήθος γειτόνων  $n$  είναι υποδεέστερη της εκθετικής (*“less than quadratic”*). Περαιτέρω, ακυρώνει και την ανάγκη εισήγησης της υποτιθέμενης «μέσης γειτνίασης» (ή «μέσου πλήθους γειτόνων») στην αρχική υπόθεση εργασίας.

Η αναβαθμισμένη εκδοχή του «γκρανοκεντρικού μοντέλου» συνοψίζει μια σειρά πλεονεκτημάτων σε σύγκριση προς την αρχική του μορφή:

α) βάσει της εφαρμογής του θεωρήματος Euler, εισηγείται μια μοναδική παράμετρο, στη γειτνίαση του κεντρικού κελλιού με τα παρακείμενα, διασφαλίζοντας τη συμβατότητα της στατιστικής δυναμικής του δεδομένου τοπικού προτύπου διευθέτησης, για επιτεδοπληρωτική επίστρωση (*plane-filling tilings*),

β) ερμηνεία πολλών στατιστικών ιδιοτήτων της επιτεδοπληρωτικής επίστρωσης (*plane-filling ensemble*) βάσει του τοπικού προτύπου διευθέτησης (*local template of neighboring cells*),

γ) βάσει του σχήματος των μοναδιαίων κελλιών, εικάζεται η διαθεσιμότητα μιας «συλλογής από επιμέρους νόμους (συναρτήσεις) Lewis» (*“range of Lewis' laws”*), για τη μεσολάβηση της παρεμβολής (*interpolation*) από τη μη γραμμική στη γραμμική εκδοχή του. Συνεπώς, παρέχει τη δυνατότητα επιλογής της «καταλληλότερης συνάρτησης» για το φάσμα των πιθανών κυτταροβιολογικών παραγόντων του ανισοτροπισμού, από τους οποίους αναφέρονται ενδεικτικά, η προσαρμοστική πλαστικότητα του κυτταροσκελετού (Gordon R. and Brodland G. W., 1987), η μορφογενετική δυναμική της πλασματικής μεμβράνης (Taiz L., 1984), η ρευστοδυναμική της κυτταροπλασματικής ροής (Caille N., Thoumine O., Tardy Y. and Meister J.-J., 2002), η κυτταρική πρόσφυση (Schoetz E.-M. et al., 2010; Carthew R. et al., 2008; Hilgenfeldt S. et al., 2011), η ιστική ομοιοστασία (Brodland G. W., Conte V., Cranston P. G., Veldhuis J., Narasimhan S., Hutson M. S., Jacinto A., Ulrich F., Baum B. and Miodownik M., 2010; Kim S., Cai M., and Hilgenfeldt S., 2014)





**B-ΜΕΡΟΣ: ΣΥΣΚΕΥΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΥΛΙΚΑ****ΕΝΟΤΗΤΑ-III: Συσκευές – Αντιδραστήρια – Υλικά για ανθρώπινο βιολογικό υλικό****III.A.1. Έλεγχος των τεχνικών (ή πρωτόκολλων) απομόνωσης και καλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs)**

Για τους σκοπούς της μελέτης, μεσεγχυματικά κύτταρα που απομονώθηκαν από ομφάλιο λώρο (UC-MSCs), με την τεχνική της ενζυμικής πέψης (με κολλαγενάση και υαλουρονιδάση) και της ιστοκαλλιέργειας, καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες, που διέφεραν ως προς τη σύσταση του καλλιεργητικού υγρού. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά:

- 1] το α-MEM συμπληρωμένο είτε με τον ζωικό ορό εμβρύου βοός (FBS) είτε με ανθρώπινο ορό ομφαλοπλακουντιακού αίματος (CBS) και
- 2] το εμπορικό kit Mesencult για την καλλιέργεια MSCs

**III.A.2. Συσκευές για τα πειράματα σε ανθρώπινο βιολογικό υλικό**

- Ανάστροφο μικροσκόπιο [LEICA-DMIL]
- Αντλία αναρρόφησης [GILSON Aspiration station]
- Αυτόματος μικροτόμος παραφίνης [LEICA RM2255]
- Αυτόκαυστο [TECNO-GAZ]
- Δοχείο σταδιακής κατάψυξης, Mr. Frosty® [Nalgene]
- Επωαστικός κλίβανος αερίου CO<sub>2</sub> [THERMO Forma]
- Ζυγός [METTLER TOLEDO AE285]
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης-II [NUAIRE]
- Θερμαινόμενη πλάκα [Bioline]
- Καταψύκτης [-80°C] [KRYOTEC]
- Κυτταρομετρητής ροής [Coulter Beckman EPICS XL-MCL]
- Μικροφυγόκεντρος [Eppendorf-Refrigerated Microcentrifuge 5417R]
- Ορθό μικροσκόπιο [LEICA-DM L52]
- Υδατόλουτρο [Memmert]
- Φυγόκεντρος [Eppendorf-Centrifuge 5804]
- Φωτόμετρο [General Electric-NanoVue Plus]
- Ψυγείο [4°C] [HELMER]

**III.B.1. Συλλογή και μεταφορά ανθρώπινου βιολογικού υλικού****III.B.1.1. Υλικά**

- Εργαλεία:
  - Χειρουργικές λαβίδες
  - Χειρουργικό ψαλίδι
- Πλαστικά-Αναλώσιμα:
  - Αποστειρωμένες γάζες
  - Αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες με καπάκι, χωρητικότητας 50 ml [Falcon-50 ml, Becton Dickinson]
  - Σύριγγα 60 ml [Becton Dickinson]
  - Ισοθερμική τσάντα μεταφοράς βιολογικού υλικού της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛΤΟΠΑ)
  - Παγοκύστεις
- Διαλύματα-Αντιδραστήρια:
  - Τοπικό ανπσηπτικό διάλυμα χειρουργικού τύπου [Betadine solution]

### III.B.1.2. Συλλογή ομφάλιου λώρου για απομόνωση κυττάρων

Οι συλλογές ομφάλιων λώρων από τελειόμηνους τοκετούς, πραγματοποιήθηκαν από νοσηλεύτριες της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛΤΟΠΑ) και έπειτα από τη γραπτή συναίνεση της μητέρας. Κάθε συλλογή πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση του τοκετού, την απολίνωση του ομφάλιου λώρου και πριν αφαιρεθεί ο πλακούντας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

#### • III.B.1.2.a. Συλλογή βιολογικού υλικού

Τη συλλογή του ομφαλοπλακουντιακού αίματος διαδεχόταν η συλλογή του ομφάλιου λώρου. Μετά την αφαίρεση του ομφάλιου λώρου και του πλακούντα από το μαιευτήρα, η ειδικευμένη νοσηλεύτρια της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛΤΟΠΑ) έκοβε με αποστειρωμένο χειρουργικό ψαλίδι 10 cm ομφάλιου λώρου και το τοποθετούσε με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας σε κωνικό σωλήνα τύπου Falcon 50 ml, με βιδωτό πώμα. Η φύλαξη του ομφάλιου λώρου μέχρι την ολοκλήρωση της μεταφοράς του στα εργαστήρια της ΕΛΤΟΠΑ, διασφαλιζόταν σταθεροποιημένη σε θερμοκρασία 4°C.

#### • III.B.1.2.b. Μεταφορά βιολογικού υλικού στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος

Για τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, οι ασκοί με το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και τα Falcon με τα ιστοτεμάχια ομφάλιου λώρου, τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικές τσάντες της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, μαζί με μία παγοκύστη, ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία καθόλη τη διάρκεια της μεταφοράς, σταθεροποιημένη στους 4°C. Τη μετακομιδή επιμελήθηκε το προσωπικό της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛΤΟΠΑ).

### III.B.2. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο

#### III.B.2.1. Υλικά

- Εργαλεία:
  - Χειρουργικά ψαλίδια και λαβίδες, αποστειρωμένα
- Πλαστικά-Αναλώσιμα:
  - Αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες με καπάκι, χωρητικότητας 50 ml [Falcon-50 ml, Becton Dickinson]
  - Πλαστικές πλάκες καλλιέργειας 6 οπών [**6 well tissue culture plates**, Costar, Corning Life Sciences Inc., Amsterdam, Netherlands]
  - Τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 150 mm [Costar]
  - Ορολογικές πιπέτες 5 ml, 10 ml και 20 ml, μιας χρήσης [Sarstedt]
  - Σύστημα φιλτραρίσματος υγρών με φίλτρο νιτροκυτταρίνης (**nitrocellulose**) με πόρους 40 μm [Costar]
- Διαλύματα-Αντιδραστήρια:
  - Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων του Earl, (pH 7,2) - **Earl's Balanced Salt Solution** (EBSS) [Gibco]
  - Medium-199 [Gibco]
  - Κολλαγενάση - **collagenase** [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland]
  - Υαλουρονιδάση - **hyaluronidase** [Sigma-Aldrich]
  - Διάλυμα θρυψίνης 0,05% και 0,02% 2,2',2",2'''-(αιθυλο-1,2- διάμινο)-τετραοξικού οξέος - **trypsin-EDTA solution** [Sigma-Aldrich]

- Θρεπτικό υλικό α-MEM με ριβονουκλεοσίδια, δεοξυριβονουκλεοσίδια, L-γλουταμίνη, γλυκόζη 1000mg/L και δείκτη ερυθρό της φαινόλης (pH 7,2) (**Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification, low glucose with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, L-glutamine, και phenol red**) [Gibco]
- Ορός εμβρύου βοός - **Foetal Bovine Serum** (FBS) [Gibco]
- L-γλουταμίνη 200 mM [Gibco]
- Διάλυμα 10.000 U/ml πενικιλίνης και 10.000 µg/ml στρεπτομυκίνης (**penicilin-streptomycin**) [Gibco]
- Απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)

### III.B.2.2. Παρασκευή διαλυμάτων

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

### III.B.2.3. Προετοιμασία ομφάλιου λώρου για την απομόνωση κυττάρων

Οι ομφάλιοι λώροι, ανεξαρτήτως της μεθόδου με την οποία επρόκειτο να επεξεργαστούν, τοποθετήθηκαν αρχικά, σε τρυβλία καλλιέργειας 150 mm διαμέτρου [**Εικ. III.B.2.1.**] όπου με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων, αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι δύο ομφαλικές αρτηρίες και η ομφαλική φλέβα [**Εικ. III.B.2.1.**]. Στη συνέχεια ο συνδετικός ιστός (πηκτή του Wharton) τοποθετήθηκε σε κλειστό Falcon χωρητικότητας 50 ml, συμπληρωμένο με 25 ml διαλύματος EBSS και ανακινήθηκε με δύναμη προκειμένου να εκπλυθεί από υπολείμματα αίματος και / ή θρόμβων [**Εικ. III.B.2.1.**]. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλήφθηκε όσες φορές χρειάστηκε, τοποθετώντας εκ νέου τον ιστό σε άλλο Falcon χωρητικότητας 50 ml, συμπληρωμένο με 25 ml EBSS. Μετά τον απαραίτητο αριθμό εκπλύσεων παρελήφθησαν καθαρά ιστοτεμάχια, απαλλαγμένα από αδιάφορες προσμείξεις και κατάλληλα για την επόμενη φάση, της απομόνωσης κυττάρων.

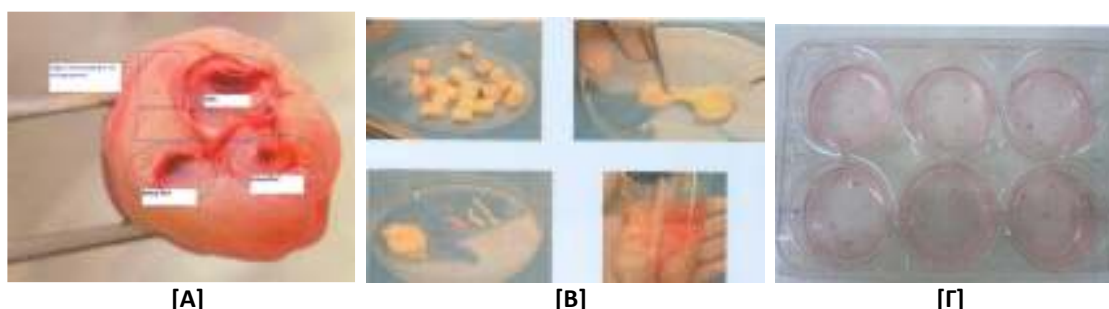
#### III.B.2.3.A. Μέθοδος απομόνωσης με ενζυμική πέψη

Τα ιστοτεμάχια της πηκτής του Wharton που ελήφθησαν από την προετοιμασία του ομφάλιου λώρου τοποθετήθηκαν σε Falcon χωρητικότητας 50 ml, που περιείχε 1 ml διαλύματος κολλαγενάσης-υαλουρονιδάσης 10x και 9 ml θρεπτικού υλικού Medium-199, όπου και παρέμειναν σε συνεχή ανάδευση επί 18 ώρες σε υδατόλουτρο στους **37°C**. Στη συνέχεια το περιεχόμενο φυγοκεντρήθηκε στα 500x **g** για 10 λεπτά και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η ανασύσταση του ιζήματος έγινε σε 10 ml διαλύματος θρυψίνης 0,05% - EDTA 0,02% (διαλύματος θρυψίνης/EDTA) και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα. Τελικά τα κύτταρα παρελήφθησαν έπειτα από νέα φυγοκέντρηση στα 500x **g** για 6 λεπτά.



### III.B.2.3.B. Μέθοδος απομόνωσης με ιστοκαλλιέργειες

Τα ιστοτεμάχια της πηκτής του Wharton τοποθετήθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας 150 mm διαμέτρου, όπου με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων, κόπηκαν σε μικρότερα τμήματα ιστού, μεγέθους 1-3 mm<sup>3</sup>. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ανατομικής λαβίδας 12 cm, τοποθετήθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 6 οπών και σε ορισμένη απόσταση το ένα ιστοτεμάχιο από το άλλο [Εικ. III.B.2.1.]. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας προστέθηκαν 2 ml θρεπτικού υλικού ιστοκαλλιέργειας α-MEM με 15% FBS, 2 mM L-γλουταμίνης και 100 U/ml πενικιλίνης / 100 µg/ml σε κάθε υποδοχή της πλάκας και οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C. Την 3<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό και την 10<sup>η</sup> αφαιρέθηκαν τα ιστοτεμάχια και το θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα που είχαν μεταναστεύσει στο πλαστικό υπόστρωμα της πλάκας αποκολλήθηκαν με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA.



**Εικόνα III.B.2.1.:** Η προετοιμασία των ομφάλιων λώρων για την απομόνωση UC-MSCs: [A] Αρχικά ο ομφάλιος λώρος κοβόταν σε μικρότερα ιστοτεμάχια από τα οποία με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων αφαιρούνταν τα αγγεία [B]. Στη συνέχεια τα τεμάχια πηκτής του Wharton πλένονταν με EBSS προκειμένου να χρησιμοποιηθούν [Γ].

### III.B.3. Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας

#### III.B.3.1. Υλικά

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

#### III.B.3.2.α. Αυτόματη μέτρηση

Για να μετρηθούν κύτταρα με την αυτόματη συσκευή μέτρησης Countess®, αρχικά αραιώθηκαν στην αναλογία 1 : 1 σε διάλυμα χρωστικής trypan blue 0,4%. Στη συνέχεια εναιώρημα κεχωρισμένων κυττάρων, όγκου 10 µl τοποθετήθηκε σε κάθε υποδοχή της πλάκας μέτρησης Countess® και η πλάκα «διαβάστηκε» από τη συσκευή. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε μετά από διόρθωση της εστίασης κατά τέτοιον τρόπο ώστε το περίγραμμα των κυττάρων να είναι ευδιάκριτο. Η συγκέντρωση των κυττάρων και η βιωσιμότητα υπολογίστηκαν αυτόματα από τη συσκευή.

### III.B.3.2.b. Μέτρηση με οπτικό μικροσκόπιο

Η μέτρηση των κυττάρων με οπτικό μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου *Neubauer*. Παρελήφθη ελαιώρημα κυττάρων, όγκου 10  $\mu\text{l}$  και αναμίχθηκε με ελαφρά ανάδευση σε 990  $\mu\text{l}$  PBS (αραίωση 1:100). Από αυτό το διάλυμα, παρελήφθη εκ νέου ελαιώρημα κυττάρων, όγκου 10  $\mu\text{l}$  και αραιώθηκαν με αναλογία 1:1 σε χρωστική **trypan blue** 0,4% και έπειτα τοποθετήθηκε στο αιματοκυτταρόμετρο. Σε τέσσερις περιοχές του οπτικού πεδίου μετρήθηκαν, αφενός τα νεκρά κύτταρα που αναγνωρίζονταν από το χρωματισμένο κυτταρόπλασμά τους και αφετέρου τα ζωντανά κύτταρα με διακριτικό γνώρισμα το έντονο περίγραμμα της κυτταρικής μεμβράνης και το διαυγές κυτταρόπλασμα. Με αυτόν τον τρόπο έπρεπε να μετρηθούν τουλάχιστον 200 κύτταρα ανά οπτικό πεδίο, ενώ σε αντίθετη περίπτωση επαναλαμβανόταν η μέτρηση έπειτα από προσαρμογή της αραιώσης. Τελικά ο υπολογισμός της συγκέντρωσης στο κυτταρικό ελαιώρημα έγινε με τον ακόλουθο τύπο:

$$C = M \times A \times 10^4$$

όπου **C**, η συγκέντρωση κυττάρων ανά ml ελαιωρήματος, **M** η μέση τιμή του πλήθους των κυττάρων που μετρήθηκαν στις 4 περιοχές του ίδιου οπτικού πεδίου, **A** ο συντελεστής αραιώσης (π.χ. 100 {=η αρχική αραιώση στο PBS} x 2 {=η αραιώση στο **trypan blue**} = 200).

### III.B.4. Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων ομφάλιου λώρου

#### III.B.4.1. Υλικά

- Πλαστικά-Αναλώσιμα:
  - Falcon 50 ml [Becton Dickinson]
  - Falcon 15 ml [Becton Dickinson]
  - Αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας, επιφανείας 75  $\text{cm}^2$  με κεκαμμένο λαιμό και αεριζόμενο πώμα [Costar]
  - Ορολογικές πιπέτες 5 ml, 10 ml και 20 ml, μιας χρήσης [Sarstedt]
  - Σύρριγγες 60 ml [Becton Dickinson]
  - Σύστημα φιλτραρίσματος υγρών με φίλτρο νιτροκυτταρίνης (**nitrocellulose**) με πόρους 40  $\mu\text{m}$  [Costar]
- Διαλύματα-Αντιδραστήρια:
  - PBS (pH 7,2) [Gibco]
  - Διάλυμα θρυψίνης 0,05% - **EDTA** 0,02% (διάλυμα θρυψίνης / EDTA) [Sigma-Aldrich]
  - Θρεπτικό υλικό  $\alpha$ -MEM [Gibco]
  - Θρεπτικό υλικό **Mesencult MSC Basal Medium (Human)** [StemCell Technologies]
  - Πρόσθετα καλλιεργητικού υλικού (**Mesenchymal Stem Cells Stimulatory Supplements (Human)**) [StemCell Technologies]
  - FBS [Gibco]
  - L-γλουταμίνη 200 mM [Gibco]
  - Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης [Gibco]

**III.B.4.2. Παρασκευή διαλυμάτων**

- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 10% FBS, 2 mM L-γλουταμίνης και 100 U / ml πενικιλίνης / 100 µg / ml (pH 7,2)
  - Σε 440 ml α-MEM προστέθηκαν:
    - ✓ 50 ml FBS
    - ✓ 5 ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200 mM
    - ✓ 5 ml διαλύματος 10.000 U / ml πενικιλίνης και 10.000 µg / ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 15% FBS, 2 mM L-γλουταμίνης και 100 U / ml πενικιλίνης / 100 µg / ml (pH 7,2)
  - Σε 415 ml α-MEM προστέθηκαν:
    - ✓ 75 ml FBS
    - ✓ 5 ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200 mM
    - ✓ 5 ml διαλύματος 10.000 U / ml πενικιλίνης και 10.000 µg / ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 20% FBS, 2 mM L-γλουταμίνης και 100 U / ml πενικιλίνης / 100 µg / ml (pH 7,2)
  - Σε 400 ml α-MEM προστέθηκαν:
    - ✓ 100 ml FBS
    - ✓ 5 ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200 mM
    - ✓ 5 ml διαλύματος 10.000 U / ml πενικιλίνης και 10.000 µg / ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας α-MEM με 20% CBS, 2 mM L-γλουταμίνης και 100 U / ml πενικιλίνης / 100 µg / ml (pH 7,2)
  - Σε 415 ml α-MEM προστέθηκαν:
    - ✓ 75 ml FBS
    - ✓ 5 ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200 mM
    - ✓ 5 ml διαλύματος 10.000 U / ml πενικιλίνης και 10.000 µg / ml στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας Mesencult Complete Medium (MCM) με 2 mM L-γλουταμίνης και 100 U / ml πενικιλίνης / 100 µg / ml (pH 7,2)
  - Στα 440 ml Mesencult MSC Basal Medium προστέθηκαν:
    - ✓ **50 ml** Mesenchymal Stem Cells Stimulatory Supplements
    - ✓ 5 ml διαλύματος L-γλουταμίνης 200 mM
    - ✓ 5 ml διαλύματος 10.000U / ml πενικιλίνης και 10.000 µg / ml στρεπτομυκίνης

**III.B.4.3. Κυτταροκαλλιέργεια**

Περίπου 750.000 MSCs ομφάλιου λώρου τοποθετήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας επιφάνειας 75cm<sup>2</sup> (1x10<sup>4</sup> κύτταρα / cm<sup>2</sup> αντίστοιχα) που περιείχαν 30 ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας. Ανάλογα με το πείραμα, το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είτε ήταν MCM, είτε α-MEM με FBS 10%, είτε α-MEM με FBS 15%, είτε α-MEM με FBS 20%, είτε α-MEM με CBS 20%). Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε κορεσμένο από υδατμούς περιβάλλον, μέσα σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C με ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5% σε CO<sub>2</sub>. Εικοσιτέσσερις ώρες έπειτα από την έναρξη της καλλιέργειας, αφαιρέθηκε πλήρως το θρεπτικό υλικό και οι φλάσκες εκπλύθηκαν με 15 ml PBS δύο φορές, προκειμένου να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν και προστέθηκαν 30 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού. Οι καλλιέργειες παρέμειναν στον επωαστικό κλίβανο μέχρις ότου η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας ξεπέρασε το 80% του εμβαδού του πλαστικού υποστρώματος. Στο διάστημα αυτό ελέγχονταν δύο φορές την εβδομάδα ενώ σε εβδομαδιαία βάση αφαιρούνταν 15 ml θρεπτικού υλικού το οποίο αναπληρωνόταν με 17 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού (προκειμένου να αντισταθμιστεί η εξάτμισή του).

#### III.B.4.4. Αποκόλληση κυττάρων και ανακαλλιέργεια (Passage)

Όταν η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας έφτασε το 80% (*confluency*), τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης 0,05% - EDTA 0,02% (διάλυμα θρυψίνης / EDTA). Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και η επιφάνεια του δοχείου της καλλιέργειας (πλάκα 6 οπών ή φλάσκα καλλιέργειας) εκπλύθηκε με 20 ml διαλύματος PBS δύο φορές προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως πιθανά υπολείμματα θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml διαλύματος θρυψίνης / EDTA σε κάθε οπή της πλάκας (ή 10 ml διαλύματος θρυψίνης / EDTA ανά φλάσκα 75cm<sup>2</sup>) και οι καλλιέργειες με το ένζυμο, επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C. Περίπου 10 έως 15 λεπτά μετά την έναρξη της ενζυμικής πέψης ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί η αποκόλληση των κυττάρων με δειγματοληπτικό μικροσκοπικό έλεγχο, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ελαφρά ανακίνηση ή κραδασμός (χτύπημα) του δοχείου ήταν απαραίτητα. Με την ολοκλήρωση της αποκόλλησης των κυττάρων η θρυψίνη αδρανοποιήθηκε με προσθήκη 200 µl FBS (ή 2 ml FBS για τις φλάσκες 75cm<sup>2</sup>). Τα αποκολλημένα κύτταρα συλλέχθηκαν με ορολογική πιπέτα και τοποθετήθηκαν σε κωνικό σωλήνα Falcon των 15 ml ή των 50 ml, με αντιστοίχως ίση ποσότητα PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 500x *g* για 5 min. Τελικά το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα ανασυστάθηκαν από το ίζημά τους στην απαραίτητη ποσότητα θρεπτικού υλικού (ή PBS), ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζονταν.

#### III.B.5. Υπολογισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων

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

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

όπου: N ο αριθμός των κυττάρων στο τέλος της καλλιέργειας,  
 N<sub>0</sub> ο αριθμός των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν,  
 t η συνολική διάρκεια της καλλιέργειας σε ώρες.

**ΕΝΟΤΗΤΑ-IV: Συσκευές – Αντιδραστήρια – Υλικά για μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό****IV.A. Πειράματα σε μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό****IV.A.1. Ομάδες των πειραματοζώων**

Πριν τα πειράματα, τα ζώα είχαν παραμείνει εμβάπτισμένα κατά διακριτές ομάδες (*cohorts*) και για χρονικό διάστημα 48 ωρών πριν τις χειρουργικές επεμβάσεις, σε μια σειρά διαβαθμίσεων συγκέντρωσης (*gradient*) της ουσίας Vitamin-A-Palmitate. Ταυτόχρονα με τα ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί (μέσω της εμβάπτισής τους) Vit-A, χρησιμοποιήθηκε και ζώο-μάρτυρας (*control*). Τα δείγματα, μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων διατηρήθηκαν σε ειδικά κάνιστρα (βαζάκια) συμπληρωμένα με φορμόλη, ως μέσο συντήρησης.

Α. Μάρτυρας: επαναφορά (ανάταξη) του μοσχεύματος στην ίδια (στην αρχική) ανατομική θέση ως προς το κολόβωμα, χωρίς περιστροφή των χειρουργικών επιφανειών τους κατά  $180^{\circ}$  (*control-back to the same position*).

Β. Δείγματα: μεταφορά του μοσχεύματος σε μη ομόλογη θέση στο ετερόπλευρο κολόβωμα.

Γ. Δείγματα: μεταφορά του μοσχεύματος σε ομόλογη (αλλά όχι στην αρχική) ανατομική θέση αλλά με ανεστραμμένο (ή αντιπαράλληλο) προσανατολισμό ως προς το κολόβωμα, με περιστροφή των χειρουργικών επιφανειών τους κατά  $180^{\circ}$ .

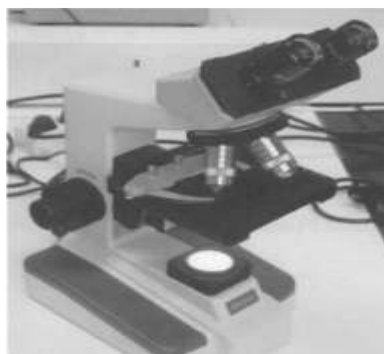
**IV.A.2. Συσκευές για τα πειράματα σε μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό**

- **Κλίβανος**, χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση του εγκλεισμού των δειγμάτων στην παραφίνη (*embedding*). Επιτρέπει τη διατήρηση της παραφίνης σε υγρή κατάσταση στους  $60^{\circ}\text{C}$ .
- **Μικροτόμος**, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των τομών από τα άκρα των γυρίνων, μια διαδικασία που επακολούθησε μετά την παραφίνωση.
- **Θερμαντική πλάκα**, χρησιμοποιήθηκε για τη σταθεροποίηση των τομών στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
- **Φωτογραφική μηχανή**, για την φωτογράφιση ολόκληρων των ζώων, καθώς και των τομών των άκρων τους.
- **Διοφθάλμιο μικροσκόπιο**, για την μικροσκοπική παρατήρηση των τομών μετά τη χρώση Domagk.
- **Στερεοσκόπιο**, για την παρατήρηση των ζώων, καθώς και των τομών των άκρων τους.



Εικόνα IV.A.2.1.:

Μικροτόμος



Διοφθάλμιο μικροσκόπιο

#### **IV.A.3. Αντιδραστήρια – Διαλύματα για την ιστοχημεία σε μη ανθρώπινο βιολογικό υλικό**

- Vitamin-A-Palmitate (40 mgr της ουσίας από την εταιρία Sigma, Type-VII, water dispersible, 250.000 USP units/gr).
- Υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης 3,7% για τη συντήρηση των δειγμάτων (παρασκευασμένο από την αρχική συγκέντρωση φορμαλδεΰδης 37% του διαλύματος-stock, με αραιώση σε απεσταγμένο νερό κατ'αναλογία 1:10).
- Αραιά διαλύματα οξέων (φορμικό οξύ,  $\text{HCOOH}$ ) μετά την παραμονή στη φορμαλδεΰδη, για να διασπαστούν τα άλατα του οστίτη ιστού και να διευκολυνθεί η παραγωγή των ιστολογικών τομών στο μικροτόμο.
- Διαλύματα αλκοόλης 50%, 70%, 95% και διάλυμα ισοπροπανόλης, για τη διαδικασία της αφυδάτωσης των δειγμάτων.
- Μείγματα ισοπροπανόλης-ξυλόλης, σε διακριτές αναλογίες:
- ισοπροπανόλη : ξυλόλη = 1:1, ισοπροπανόλη : ξυλόλη = 1:2 και καθαρή ξυλόλη για τη διαδικασία της διαύγασης των δειγμάτων.
- Μείγματα ξυλόλης-παραφίνης, σε διακριτές αναλογίες:
- ξυλόλη : παραφίνη = 1:1, ξυλόλη : παραφίνη = 1:2 και καθαρή παραφίνη για τη διαδικασία του εγκλεισμού των δειγμάτων σε παραφίνη.
- Διαλύματα ξυλόλης, ισοπροπανόλης, αιθανόλης 90%, αιθανόλης 70%, για την αφυδάτωση των ιστών πριν από τη χρώση τους.
- Παρασκευή χρωστικής (για χρώση Domagk):
- Διάλυμα-A: 0,5 gr θειικό αργίλιο + 100 ml απεσταγμένο νερό. Θέρμανση στους **60° C**. Όταν διαλυθεί προστίθεται 0,1 gr kernechtrot (nuclear red). Ανάδευση μέχρι διάλυσης. Επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου. Διήθηση.
- Διάλυμα-B: 1 gr φωσφορομολυβδαινικό οξύ + 100 ml απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα-Γ: 0,5 gr κυανό της ανιλίνης + 2 gr Orange-G + 100 ml απεσταγμένο νερό + 8 ml οξικό οξύ. Βρασμός. Ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Διήθηση. Το διάλυμα αυτό πριν από τη χρήση πρέπει να αραιωθεί σε απεσταγμένο νερό, αρχικά σε αναλογία = 1:1 και εν'συνεχεία σε αναλογία = 1:3. Τα διαλύματα αυτά διηθούνται πριν από τη χρήση τους.
- Ρητίνη, για την επικάλυψη των ιστολογικών παρασκευασμάτων στην αντικειμενοφόρο πλάκα (κεδρέλαιο).
- Νερό βρύσης, για τη συντήρηση των ζώων, για την έκπλυση των δειγμάτων, για τις εκπλύσεις (*rinsing*) από τις χρωστικές, κλπ.

#### **IV.A.4. Κλασσική ιστολογική τεχνική**

##### **IV.A.4.1. Μονιμοποίηση**

Μετά το θάνατο των ζώων τα διάφορα όργανα και οι ιστοί υφίστανται αυτόλυση (λόγω απελευθέρωσης λυσοσωμικών ενζύμων) και μικροβιακή αποσύνθεση, διεργασίες που αλλοιώνουν τη δομή τους, πιθανώς σε οποιαδήποτε κλίμακα διαστάσεων. Για να διατηρηθεί η μορφολογία και μετά θάνατον χρησιμοποιούνται διάφορες χημικές ύλες οι οποίες αδρανοποιούν τα ένζυμα, σκοτώνουν τα μικρόβια αλλά και σταθεροποιούν τις κυτταρικές και υπο κυτταρικές δομές, καθιστώντας όλα τα κυτταρικά συστατικά αδιάλυτα στο νερό και στην αλκοόλη. Αυτά τα χημικά υλικά καλούνται μονιμοποιητές. Δεν υπάρχει ιδανικός μονιμοποιητής, που να διατηρεί πραγματικά αναλλοίωτη την κυτταρική και ιστική δομή. Οι συνήθεις μονιμοποιητές όμως διατηρούν τη στερεοδιάταξη του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα σε ικανοποιητικό βαθμό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα δείγματα διατηρήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 3,7% (Κουσουλάκος, 1997).

#### IV.A.4.2. Αφαλάτωση

Όταν το όργανο το οποίο πρόκειται να υποβληθεί σε ιστολογική κατεργασία είναι ισχυρά εφλατωμένο (π.χ. οστά, δόντια), τότε μετά από τη μονιμοποίηση πρέπει να ακολουθήσει αφαλάτωση. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ολόκληρα τα ζώα παρέμειναν για πέντε ημέρες σε κατάλληλο αφαλατωτικό σκεύασμα (80 ml Formic Acid, 17,5 gr Sodium formate, 410 ml distilled water). Στη συνέχεια ακολούθησε μεταφορά για 2 ώρες σε απεσταγμένο νερό, εμβάπτιση για 2 ώρες σε δ/μα αιθανόλης 50% και τέλος, παραμονή σε δ/μα αιθανόλης 70% μέχρι την πραγματοποίηση του επόμενου βήματος. Για την αφαλάτωση προτείνονται είτε αραιά δ/ματα οξέων, είτε τριχλωροξικό οξύ 5%. Τα σπογγώδη οστά αφαλατώνονται σε 24 ώρες, ενώ τα συμπαγή σε 5-10 ημέρες ανάλογα με τη μάζα. Η μεταφορά σε αλκοόλη 70% είναι μια πρακτική που δίνει πολύ καλή χρώση (Κουσουλάκος, 1997).

#### IV.A.4.3. Πλύσιμο και αφυδάτωση ιστού

Είναι απαραίτητες διαδικασίες προκειμένου να απομακρυνθεί ο μονιμοποιητής, η παρουσία του οποίου θα δυσκόλευε τα επόμενα στάδια της όλης τεχνικής. Περιλαμβάνει αντικατάσταση του νερού με αλκοόλη. Η αντικατάσταση αυτή γίνεται σταδιακά έτσι ώστε να αποφευχθούν βίαιες δομικές και / ή μορφολογικές μεταβολές στον ιστό που είναι δυνατόν να προκύψουν λόγω ωσμωτικών φαινομένων (Κουσουλάκος, 1997). Συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Τοποθέτηση των δειγμάτων για 2 ώρες σε δ/μα αλκοόλης 85%.
- Μεταφορά τους και παραμονή για 2 ώρες σε δ/μα αλκοόλης 95%.
- Παραμονή για 2 ώρες σε δ/μα ισοπροπανόλης.
- Παραμονή overnight σε δ/μα ισοπροπανόλης.

#### IV.A.4.4. Διαύγαση ιστού

Επειδή η αλκοόλη δεν αναμιγνύεται με την παραφίνη, πρέπει να απομακρυνθεί για να καταστεί δυνατή η παραφίνωση (διαπότιση με υγρή παραφίνη) του ιστού. Η απομάκρυνση της αλκοόλης επιτυγχάνεται με εμβάπτιση του ιστού σε ξυλόλη, η οποία αναμιγνύεται τόσο με την αλκοόλη όσο και με την υγρή παραφίνη (Κουσουλάκος, 1997). Ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

1. Απομάκρυνση διαλύματος ισοπροπανόλης προηγούμενου σταδίου και προσθήκη μίγματος ισοπροπανόλης : ξυλόλης 1:1 για 3 ώρες.
2. Απομάκρυνση προηγούμενου μίγματος και προσθήκη μίγματος ισοπροπανόλης : ξυλόλης 1:2 για 3 ώρες.
3. Απομάκρυνση προηγούμενου μίγματος και προσθήκη καθαρής ξυλόλης μέχρι το επόμενο πρωί (περίπου 15 ώρες).

Σημείωση: τα διαλύματα των σταδίων-2 / -3 φυλάσσονται για επαναχρησιμοποίηση.

#### IV.A.4.5. Εγκλεισμός ιστού σε παραφίνη (*embedding*)

Τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα να διαποτιστούν με παραφίνη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε κλίβανο διότι η παραφίνη στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου (Κουσουλάκος, 1997). Η θερμοκρασία ρυθμίζεται λίγο πάνω από τους 60° C (σημείο τήξης της παραφίνης). Συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι:

- ❖ Τοποθέτηση των ζώων σε μπουκαλάκι που περιέχει μίγμα ξυλόλης : παραφίνης σε αναλογία 1 : 1, για διάστημα μιας ημέρας στον κλίβανο των 62° C (το μπουκαλάκι παραμένει κλειστό).
- ❖ Προσθήκη παραφίνης στο μπουκαλάκι ώστε η αναλογία του μίγματος ξυλόλη : παραφίνη να γίνει 1 : 2, για διάστημα 2 περίπου ημερών στον κλίβανο των 62° C (το μπουκαλάκι παραμένει κλειστό).



- ❖ Τοποθέτηση κάθε ζώου σε καθαρή παραφίνη για 2 ημέρες στον κλίβανο των **62° C**. Το μπουκαλάκι μένει ανοιχτό για να εξατμισθεί η ξυλόλη που έχει απομείνει.

Ακολούθησε κόψιμο των κάτω άκρων των ζώων στο ύψος της πυέλου με τη χρήση ψαλιδιού και τοποθέτησή τους ξεχωριστά το καθένα, σε βαζάκια που συμπληρώθηκαν με υγρή παραφίνη. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε μέσα στον κλίβανο των **62° C** ώστε να παραμένει υγρή η παραφίνη.

#### **IV.A.4.6. Τομή του ιστού**

Έπειτα από τους παραπάνω χειρισμούς κάθε άκρο που βρίσκεται πλέον στην παραφίνη αδειάζεται σε κυβάκια παραφίνης, μια διαδικασία που πραγματοποιείται επίσης μέσα στον κλίβανο. Τα κυβάκια παραφίνης έχουν προηγουμένως καθαριστεί με ξυλόλη για την απομάκρυνση κάθε υπολείμματος και κατόπιν τα τοιχώματα τους αλείφονται με γλυκερίνη για να διευκολυνθεί η απομάκρυνση της παραφίνης σε μεταγενέστερα στάδια κατεργασίας. Μόλις χύσουμε την παραφίνη με το κάθε άκρο μέσα στο κυβάκι, με μια λαβίδα και με πολύ προσεχτικές κινήσεις προσανατολίζουμε κάθε άκρο έτσι ώστε αυτό να βρίσκεται τοποθετημένο κατά μήκος μέσα στο κυβάκι και με φορά από το μηριαίο οστό προς τις φάλαγγες των δακτύλων.

Αμέσως μετά την εξαγωγή του κυβίσκου από τον κλίβανο, τοποθετείται μέσα στην παραφίνη χαρτάκι, κατά το ήμισυ του μήκους του, που φέρει τις ενδείξεις προσανατολισμού του συγκεκριμένου άκρου. Η τοποθέτηση αυτή πραγματοποιείται εγκαίρως, λίγο πριν στερεοποιηθεί η παραφίνη. Τα κυβάκια παραφίνης τοποθετούνται για περίπου πέντε λεπτά σε νερό και αμέσως μετά για τρία περίπου λεπτά στην κατάψυξη. Στη συνέχεια με τη βοήθεια νυστεριού αφαιρείται προσεκτικά από τον κυβίσκο (από το καλούπι της), όλη η στερεοποιημένη μάζα της παραφίνης που φέρει το δείγμα και τυλίγεται με αλουμινόχαρτο. Τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για τη διαδικασία της τομής τους (Σιάπικα, 2006).

Η τομή πραγματοποιείται με τη χρήση της μικροτόμου. Η μικροτόμος φέρει μια ειδική υποδοχή για το δείγμα (ένα μικρό μεταλλικό δίσκο που μπορεί να προσανατολίζεται κατάλληλα πάνω στην μικροτόμο). Αρχικά, με τη χρήση του νυστεριού δίνουμε στο κυβάκι σχήμα κόλουργας πυραμίδας (trimming). Οι κινήσεις πρέπει να είναι πολύ προσεχτικές διότι είναι δυνατόν να σχηματισθούν ρωγμές στο κυβάκι που να επηρεάσουν το δείγμα και τις τομές. Φροντίζουμε ώστε στην κορυφή της πυραμίδας να βρίσκονται τα δάκτυλα του άκρου. Κατόπιν, θερμαίνουμε στη φλόγα το νυστέρι και με τη χρήση μικρών κομματιών παραφίνης στερεώνουμε την πυραμίδα στην υποδοχή της μικροτόμου. Τοποθετούμε τη βάση με το δείγμα για λίγο στην κατάψυξη ώστε το δείγμα να είναι σκληρό και στη συνέχεια το τοποθετούμε στην ειδική εσοχή της μικροτόμου. Προσανατολίζουμε έτσι την υποδοχή ώστε το άκρο που βρίσκεται μέσα στην παραφίνη να κοιτάει όσο το δυνατό ευθεία και με τις φάλαγγες των δακτύλων προς τα πάνω.

Στη συνέχεια με προσοχή τοποθετούμε το μαχαίρι της μικροτόμου στην ειδική του θέση, αφού πρώτα το καθαρίσουμε με διηθητικό χαρτί ελαφρά εμποτισμένο με ξυλόλη. Μετακινούμε το μαχαίρι, μέχρι να φτάσει ελαφρά το δείγμα και το ασφαλίζουμε εκεί. Ρυθμίζουμε τη μικροτόμο στα 10  $\mu\text{m}$  και περιστρέφουμε το χερούλι της οπότε και το δείγμα αρχίζει να κόβεται. Στην αρχή οι τομές που προκύπτουν αποτελούνται από σκέτη παραφίνη. Μόλις όμως φτάσουμε στο δείγμα ρυθμίζουμε τη μικροτόμο στα 5  $\mu\text{m}$ , όπου είναι και το επιθυμητό πάχος της τομής. Κάθε τομή που προκύπτει κολλάει στο μαχαίρι, από το οποίο απομακρύνεται προσεκτικά με ένα λεπτό πινέλο που προηγουμένως έχει βραχεί με νερό. Με το πινέλο η τομή αφήνεται προσεκτικά πάνω σε μία σταγόνα νερού, στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Για την εύτακτη τοποθέτηση των τομών πάνω στη σταγόνα λαμβάνεται μέριμνα ώστε να απλώνονται όλες με τον ίδιο προσανατολισμό.

Όταν η αντικειμενοφόρος συμπληρωθεί με τομές τοποθετείται σε θερμαντική πλάκα (**40° C**) και παραμένει εκεί μέχρι την επόμενη ημέρα. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται μέχρι να τελειώσει το δείγμα και επαναλαμβάνεται με τον ίδιο τρόπο για τα υπόλοιπα. Κάθε φορά που παρατηρούνται στο μαχαίρι υπολείμματα της προηγούμενης τομής αυτό καθαρίζεται με λίγη ξυλόλη, ώστε να μην ακολουθήσουν διπλωμένες τομές.

Κάθε αντικειμενοφόρος που χρησιμοποιείται φέρει στο αριστερό της τμήμα ειδική ανάγλυφη επιφάνεια πάνω στην οποία σημειώνεται με μολύβι το δείγμα για το οποίο πρόκειται, καθώς και ο αύξων αριθμός της αντικειμενοφόρου για το συγκεκριμένο δείγμα. Μετά τη θερμαντική πλάκα οι αντικειμενοφόροι με τις τομές τοποθετούνται σε ειδικά στατώ όπου παραμένουν μέχρι να αρχίσει η διαδικασία της χρώσης που ακολουθεί.

#### **IV.A.4.7. Διαδικασία ιστοχημικής χρώσης**

Με τη διαδικασία της χρώσης αυξάνονται οι οπτικές αντιθέσεις των ποικίλων κυτταρικών και μεσοκυτταρικών συστατικών. Για την χρώση των τομών των άκρων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρώσης με Domagk. Η χρώση Domagk συνιστάται για όργανα στα οποία υπάρχει ποικιλία ιστών επειδή τους βάφει με διαφορετικό χρώμα.

- Αρχικά, οι τομές τοποθετούνται στον κλίβανο προκειμένου να λιώσει η παραφίνη και να απομακρυνθεί.
- Απλώνουμε σε όλο τον πάγκο εργασίας διηθητικό χαρτί. Τοποθετούμε διαδοχικά λεκανάκια κατά μήκος του πάγκου που φέρουν τα διαλύματα με τη σειρά που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Τα στατώ με τις τομές βυθίζονται διαδοχικά στα διαλύματα φροντίζοντας να τηρούνται αυστηρά οι χρόνοι παραμονής τους σε αυτά.

##### **IV.A.4.7.a. Ενυδάτωση των τομών:**

Δεδομένου ότι οι περισσότερες χρωστικές είναι υδατοδιαλυτές, τα ακόλουθα βήματα συνιστούν το στάδιο της ενυδάτωσης, το οποίο προηγείται της χρώσης και αποσκοπεί στην απομάκρυνση των καταλοίπων παραφίνης που ενδεχόμενα έχουν παραμείνει στις τομές. Συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι:

- Βύθιση των τομών σε λουτρό ξυλόλης για 5 λεπτά.
- Πολύ καλό στράγγισμα του στατώ που φέρει τις τομές, τοποθετημένου κεκλιμένα πάνω στο απορροφητικό χαρτί.
- Βύθιση των τομών σε νέο λουτρό ξυλόλης για 5 λεπτά.
- Πολύ καλό στράγγισμα του στατώ, όπως πριν.
- Βύθιση των τομών σε λουτρό ισοπροπανόλης για 3 λεπτά.
- Πολύ καλό στράγγισμα, όπως πριν.
- Εκ νέου βύθιση των τομών σε λουτρό ισοπροπανόλης για 3 λεπτά.
- Πολύ καλό στράγγισμα, όπως πριν.
- Βύθιση των τομών σε λουτρό αιθανόλης 90% για 3 λεπτά.
- Πολύ καλό στράγγισμα, όπως πριν.
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 3 λεπτά.
- Πολύ καλό στράγγισμα, όπως πριν.
- Εμβάπτιση των τομών σε απεσταγμένο νερό για 1 λεπτό.
- Πολύ καλό στράγγισμα, όπως πριν.

##### **IV.A.4.7.b. Χρώση των τομών:**

Έπειτα ξεκινά η χρώση:

- ❖ Εμβάπτιση στο διάλυμα-A για 7 - 8 λεπτά.

- 
- ❖ Πολύ καλό ξέπλυμα σε νερό, το οποίο φροντίζουμε να είναι καθαρό για κάθε στατώ, για 1 λεπτό. Ακολουθεί πολύ καλό στράγγισμα.
  - ❖ Εμβάπτιση στο διάλυμα-B για 5 λεπτά.
  - ❖ Πολύ καλό ξέπλυμα σε νερό για 1 λεπτό και πολύ καλό στράγγισμα.
  - ❖ Εμβάπτιση στο διάλυμα-Γ για 2 λεπτά.
  - ❖ Πολύ καλό ξέπλυμα σε νερό για 1 λεπτό και πολύ καλό στράγγισμα.
  - ❖ Οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν τουλάχιστον μέχρι την επόμενη ημέρα.
  - ❖ Βυθίζουμε κάθε αντικειμενοφόρο με τις τομές σε λουτρό ξυλόλης για λίγα δευτερόλεπτα και στραγγίζουμε σε διηθητικό χαρτί.
  - ❖ Ρίχνουμε με μία βελόνα σε κάθε αντικειμενοφόρο, 1 - 2 σταγόνες ρητίνη (κεδρέλαιο).
  - ❖ Τοποθετούμε την καλυπτρίδα ώστε η ρητίνη να απλωθεί και να επικαλύψει τις τομές.
  - ❖ Αφήνουμε τις αντικειμενοφόρους μέχρι την επόμενη ημέρα.
  - ❖ Αλείφουμε τα περιμετρικά όρια (κράσπεδο) της καλυπτρίδας με βερνίκι νυχιών, διάφανο.
  - ❖ Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο τις τομές (Κουσουλάκος, 1997).
  - ❖ *Σημείωση:* Με τη ρητίνη γίνεται ο εγκλεισμός του ιστού. Η ρητίνη αυξάνει το δείκτη διάθλασης, καθιστώντας τις τομές ευδιάκριτες κατά τη μικροσκόπησή τους. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι τα είδωλα των τομών πριν τον εγκλεισμό τους σε ρητίνη, φαίνονται στο μικροσκόπιο σχεδόν μαύρα.

## Γ-ΜΕΡΟΣ : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΕΝΟΤΗΤΑ-V: Αποτελέσματα για το *in vitro* πειραματικό σύστημα

#### 1. Σύγκριση των αποτελεσμάτων απομόνωσης και καλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και από τον ομφάλιο λώρο

Για τους σκοπούς της μελέτης, μεσεγχυματικά κύτταρα που απομονώθηκαν από ομφαλοπλακουντιακό αίμα, καθώς και από ομφάλιο λώρο, με την τεχνική της ενζυμικής πέψης (με κολλαγενάση και υαλουρονιδάση) και της ιστοκαλλιέργειας, καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες, που διέφεραν ως προς τη σύσταση του καλλιεργητικού υγρού. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά:

1] το α-MEM συμπληρωμένο είτε με τον ζωικό ορό εμβρύου βοός (FBS) είτε με ανθρώπινο ορό ομφαλοπλακουντιακού αίματος (CBS) και

2] το εμπορικό kit Mesencult για την καλλιέργεια MSCs

#### 1.1. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΑ MSCs ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Τα δεδομένα για τα MSCs που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα συνοψίζονται ως εξής:

1] Από τα θρεπτικά υλικά που εξετάστηκαν, το εμπορικό kit Mesencult επέτρεψε τον ταχύτερο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού, *Population Doubling Time (PDT)*,  $PDT = 123,7 \pm 22,3$  ώρες) αλλά δεν ευνόησε και τη διατήρησή τους σε καλλιέργεια για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα (πλέον των 80 ημερών).

2] Αντίθετα, καλλιέργειες των MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, διατηρήθηκαν σε α-MEM με 20% CBS για διάστημα μεγαλύτερο των πέντε μηνών αλλά δεν επίσπευσαν το ρυθμό πολλαπλασιασμού (μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού,  $PDT = 187,5 \pm 8,9$  ώρες).

3] Ενδιάμεσες τιμές απέδωσαν οι καλλιέργειες σε α-MEM με 20% FBS όπου τα κύτταρα διατηρήθηκαν για 120 ημέρες και με αρκούντως ικανοποιητικό ρυθμό πολλαπλασιασμού (μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού,  $PDT = 138,5 \pm 35,9$  ώρες).

Στα MSCs που απομονώνονται από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα αναγνωρίστηκαν επιτυχώς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των MSCs που απομονώνονται από το μυελό των οστών, δηλαδή:

1] ατρακτοειδές σχήμα με σφαιρικό πυρήνα που περιέχει πολλούς και έντονα ορατούς πυρηνίσκους.

2α] Επιπλέον εξέφραζαν τους δείκτες επιφανείας των MSCs, CD105, CD90, CD51, CD29, CD44, CD117 αλλά και το MHC τάξης-I αντιγόνο του Μείζονος Συμπλέγματος Ισοσυμβατότητας (HLA class-I) ενώ ήταν αρνητικά για τους δείκτες επιφανείας της αιμοποιητικής ή ενδοθηλιακής σειράς (CD64, CD3, CD62L, CD1a, CD133, CD34, HLA class-II).

2β] Η RT-PCR έδειξε την έκφραση, από τα MSCs των γονιδίων πολυδυναμικότητας Oct-4, Nanog και Rex-1 καθώς και των γονιδίων FGF-2 και LIF που σχετίζονται με τις ιδιότητές τους.

## 1.2. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΑ MSCs ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ (UC-MSCs)

Η απομόνωση των MSCs από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs) ήταν 100% επιτυχής, σε αντίθεση με ό,τι παρατηρήθηκε στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα, τόσο με τη μέθοδο των ιστοκαλλιιεργειών (WJ-MSCs) όσο και με εκείνη της ενζυμικής πέψης (UC-MSCs):

- 1] Τα κύτταρα που απομονώνονταν μπόρεσαν να διατηρηθούν σε καλλιέργειες για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών όταν χρησιμοποιήθηκε α-MEM με 20% FBS ή 20% CBS και πολλαπλασιάζονταν ταχύτατα ( $PDT = 82.48 \pm 14.5$  και  $PDT = 111,4 \pm 26.8$  ώρες, αντίστοιχα) ενώ
- 2] το εμπορικό kit Mesencult αποδείχθηκε τελείως ακατάλληλο καθώς δεν επέτρεψε τη διατήρηση των κυττάρων για διάστημα μεγαλύτερο των 24 ημερών.

Τα MSCs του ομφάλιου λώρου (UC-MSCs) είχαν τα ίδια μορφολογικά, φαινοτυπικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά με εκείνα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος ενώ αναγνωρίστηκαν επιτυχώς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των MSCs που απομονώνονται από το μυελό των οστών, δηλαδή:

- 1] ατρακτοειδές σχήμα με σφαιρικό πυρήνα που περιέχει πολλούς και έντονα ορατούς πυρηνίσκους,
- 2] εξέφραζαν και αυτά επίσης, τα γονίδια Oct-4, Nanog, FGF-2 και LIF,
- 3] Όσον αφορά στη δυνατότητα εποικισμού ικριωμάτων κολλαγόνου από τα κύτταρα αυτά, διαπιστώθηκε ότι ενώ με την καλλιέργεια σε στατικές συνθήκες ο εποικισμός περιορίστηκε στην επιφάνεια του ικρίωματος (βάθος 150  $\mu\text{m}$ ), η δυναμική καλλιέργεια επέτρεψε τη διείσδυση των κυττάρων στο ικρίωμα (βάθος 650  $\mu\text{m}$ ),
- 4] Όταν επιχειρήθηκε η κρυοσυντήρηση των κυττάρων από τις πρωτογενείς καλλιέργειες που απομονώθηκαν είτε με την ενζυμική πέψη είτε με τις ιστοκαλλιέργειες του ομφάλιου λώρου (UC-MSCs), διαπιστώθηκε ότι στο σύνολο των περιπτώσεων ανακτήθηκαν κύτταρα, των οποίων οι μέσες βιωσιμότητες [ $\bar{S}$ ], κυμάνθηκαν τουλάχιστον στην τιμή  $\bar{S} = 71 \pm 17\%$  για τρία *cohort* κρυοσυντήρησης, με αντίστοιχες διάρκειες 1 εβδομάδας, 1 μήνα ή 6 μηνών κατάψυξης. Επίσης, όταν καλλιεργήθηκαν, τα αποψυγμένα αυτά κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν με συγκρίσιμους ρυθμούς (τόσο σε σύγκριση μεταξύ τους, όσο και με τις καλλιέργειες πριν την κατάψυξη), ενώ διατήρησαν όλα τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Από την άλλη πλευρά, η κρυοσυντήρηση εναιωρήματος κυττάρων (UC-MSCs) που ελήφθη από την ενζυμική πέψη του ομφάλιου λώρου χωρίς να προηγηθεί καλλιέργεια, δεν ήταν επιτυχής, καθώς δεν απέδωσε ζώντα κύτταρα σε κανένα από τα δείγματα που καταψύχθηκαν για 1 μήνα ενώ, μόλις στο 10% των δειγμάτων που καταψύχθηκαν για 1 εβδομάδα και για 6 μήνες, αναπτύχθηκαν κύτταρα, τα οποία όμως δεν πολλαπλασιάζονταν στις καλλιέργειες. Η μέση βιωσιμότητα [ $\bar{S}$ ] των κυττάρων κατά την απόψυξη ήταν χαμηλή ( $\bar{S}_1 = 53 \pm 19\%$ ,  $\bar{S}_2 = 62 \pm 25\%$  και  $\bar{S}_3 = 49 \pm 22\%$  μετά από 1 εβδομάδα, 1 μήνα ή 6 μήνες κατάψυξης, αντίστοιχα). Παράλληλα στάθηκε αδύνατη η απομόνωση UC-MSCs από κρυοσυντηρημένα ιστοτεμάχια ομφάλιου λώρου ανεξαρτήτως της διάρκειας κρυοσυντήρησης.

## 2. Καλλιέργειες των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

### 2.1. Συλλογή ομφάλιου λώρου

Η συλλογή των ομφάλιων λώρων έγινε παράλληλα με τη συλλογή ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Συλλέχθηκαν συνολικά 321 ιστοτεμάχια μεγέθους 5cm το κάθε ένα και τοποθετήθηκαν σε ισάριθμα ξεχωριστά αποστειρωμένα δοχεία Falcon 50ml. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε με ισοθερμική τσάντα σε θερμοκρασία **4°C**. Στην ίδια θερμοκρασία διατηρήθηκαν σε ψυγείο μέχρι την επεξεργασία τους, η οποία ξεκίνησε το συντομότερο εντός του 24ώρου που επακολούθησε από την ώρα συλλογής. Τελικά επελέγησαν 20 ομφάλιοι λώροι για την απομόνωση UC-MSCs.

### 2.2. Απομόνωση Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

#### 2.2.a. Απομόνωση MSCs με ενζυμική πέψη του ομφάλιου λώρου (ο μεικτός πληθυσμός των UC-MSCs ή των «WJ-MSCs»)

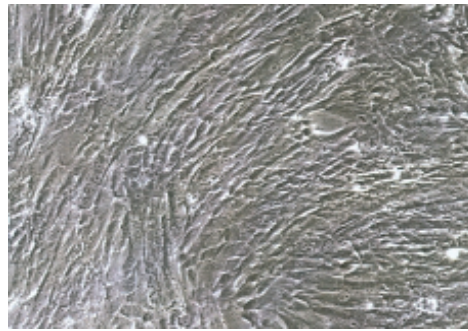
Συνολικά 20 ομφάλιοι λώροι (**Ο.Λ., U.C.**) χρησιμοποιήθηκαν κατά την ενζυμική απομόνωση MSCs για τον έλεγχο της καταλληλότητας των ποικίλων θρεπτικών υλικών, που διατίθενται στη σχετική αγορά. Κατόπιν της χειρουργικής απομάκρυνσης των ομφαλικών αγγείων, επακολούθησε η ενζυμική πέψη της εναπομείνουσας μάζας του τεμαχισμένου ομφάλιου λώρου για τη συγκομιδή των MSCs, αδιακρίτως αν αυτά αντιπροσωπεύουν μόνο εκείνα που είναι εμφωλευμένα στη *Βαρτόναιο γέλη*, ή το σύνολο των επιμέρους υποπληθυσμών που προέρχονται από οποιονδήποτε επιμέρους ιστό του ομφάλιου λώρου. Απομονώθηκαν κατά μέσο όρο  $\bar{x} = 1,75 \times 10^5 \pm 0,94$  κύτταρα ανά μήκος 1 cm U.C. με βιωσιμότητα  $\bar{S} = 83 \pm 17\%$ . Η συνολική ποσότητα των MSCs διαχωρίστηκε σε τέσσερα ίσα μέρη και καλλιεργήθηκαν το καθένα με διαφορετικό θρεπτικό υλικό (εις διπλούν), ώστε να διευκρινιστούν οι ιδανικές (ή βέλτιστες) συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν το MCM, α-MEM με 10% FBS, α-MEM με 20% FBS και α-MEM με 20% CBS ([**Εικ. V.2.2.A.**] και [**Εικ. V.2.2.Γ.**]).

#### 2.2.b. Απομόνωση MSCs με ιστοκαλλιέργειες του ομφάλιου λώρου (ο αμιγής πληθυσμός των WJ-MSCs)

Παράλληλα με την επιβεβαίωση της δυνατότητας απομόνωσης MSCs από τον ομφάλιο λώρο με ενζυμική πέψη και τη διαπίστωση του καταλληλότερου θρεπτικού υλικού, διερευνήθηκε και αντυπαραβλήθηκε ένας εναλλακτικός τρόπος (πρωτόκολλο ή τεχνική) απομόνωσης MSCs από τον ομφάλιο λώρο (με ιστοκαλλιέργεια) με απώτερο στόχο, αφενός τη μείωση του κόστους και αφετέρου τη βελτίωση της ποιότητας των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Για την απομόνωση WJ-MSCs μέσω της τεχνικής (του πρωτόκολλου) των ιστοκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν ιστοτεμάχια μεγέθους 2-3 mm<sup>3</sup> της **W.J.** από 10 διαφορετικούς ομφάλιους λώρους. Μετά από 12 ημέρες τα κύτταρα που είχαν προσκολληθεί στο πλαστικό υπόστρωμα αποκολλήθηκαν και μετρήθηκαν προκειμένου να προωθηθεί η καλλιέργειά τους σε φλάσκες. Με το πρωτόκολλο της ιστοκαλλιεργείας υπολογίστηκε ότι ένας μέσος αριθμός  $\bar{x} = 3,02 \times 10^5 \pm 0,66$  MSCs, με μέση βιωσιμότητα  $\bar{S} = 93 \pm 5\%$  απομονώθηκαν ανά 1 cm **U.C.** τα οποία καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας με α-MEM συμπληρωμένο με 15% FBS ([**Εικ. V.2.2.B.**] και [**Εικ. V.2.2.Δ.**]).



[A]

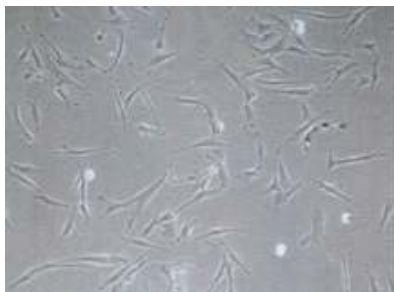


[B]

**Εικόνα V.2.1.:** [A] Ιστοτεμάχιο από ομφάλιο λώρο σε διδιάστατη ιστοκαλλιέργεια (μεγέθυνση 100x). [B] Ανακαλλιεργημένα WJ-MSCs κατόπιν της μεταφοράς (*passage*) σε φλάσκα, μέσω της τεχνικής (του πρωτόκολλου) των ιστοκαλλιεργειών.

### 2.3. Σύγκριση των τεχνικών απομόνωσης Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs)

Καθώς καταστρώθηκαν δύο διακριτές τεχνικές (ή πρωτόκολλα) απομόνωσης των MSCs από τον ομφάλιο λώρο, κρίθηκε απαραίτητη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των κυττάρων που απομονώνονται (**UC-MSCs**). Τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν σε όμοιες συνθήκες καλλιέργειας και όπως φαίνεται από τον Πίνακα I-1, και στις δύο περιπτώσεις όλες οι καλλιέργειες ήταν επιτυχείς. Τόσο στις πρωτογενείς καλλιέργειες των κυττάρων που απομονώθηκαν με ενζυμική πέψη (**Primoculture of isolation method-I WJ-MSCs, “P-I WJ-MSCs”**) όσο και σε εκείνες των MSCs που απομονώθηκαν με ιστοκαλλιέργειες (**Primoculture of isolation method-II WJ-MSCs, “P-II WJ-MSCs”**), μπορούσαν να παρατηρηθούν από την 5η κιόλας ημέρα, κύτταρα με «τυπική» μορφολογία μεσεγχυματικού κυττάρου ([Εικ. V.2.2.A.] και [Εικ. V.2.2.B.]).



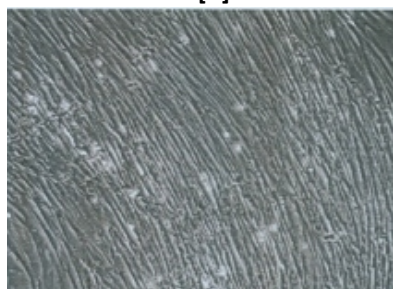
[A]



[B]



[Γ]



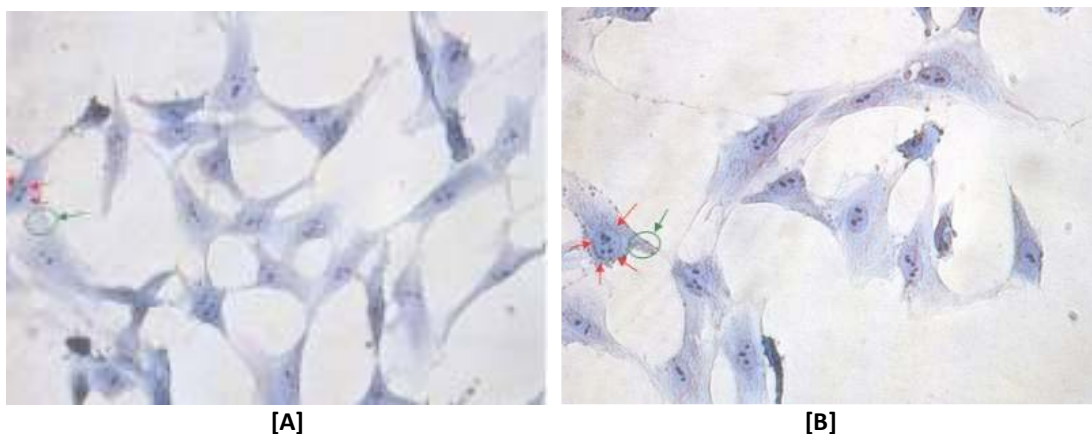
[Δ]

**Εικόνα V.2.2.:** Στίς πρωτογενείς καλλιέργειες που προήλθαν από την ενζυμική απομόνωση και από την ιστοκαλλιέργεια εμφανίστηκαν προσκολλημένα κύτταρα με μορφολογία τυπική των MSCs, από την 5η κιόλας μέρα. Η μορφολογία αυτή διατηρήθηκε κι όταν η επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας ξεπέρασε το 90%, για τα κύτταρα από το πρωτόκολλο της ενζυμικής πέψης και για τα κύτταρα από το πρωτόκολλο των ιστοκαλλιεργειών (μεγέθυνση 100x). {Πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης: ([Εικ. V.2.2.A.] και [Εικ. V.2.2.Γ.]), Πρωτόκολλο ιστοκαλλιεργειών: ([Εικ. V.2.2.B.] και [Εικ. V.2.2.Δ.])}.



### 2.3.α. Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΡΙΝ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Η κυτταροχημική χρώση των κυττάρων αυτών με Giemsa για τα “P-I WJ-MSCs” [Εικ. V.2.2.A.] και για τα “P-II WJ-MSCs” [Εικ. V.2.2.B.] επιβεβαίωσε το πολυγωνικό (μη ατρακτοειδές) σχήμα τους, καθώς και τις συχνότερες παραλλαγές του, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη γενική ινοβλαστοειδή μορφολογία με τις «πολυπολικά πολωμένες» (*planar polarity orientation*) κυτταρικές προεκβολές (*cell processes*) που εκτείνονται συστηματικά προς τα γειτονικά κύτταρα και καθοδηγούν τη συνάθροιση (*aggregation*) τους σε συστοιχισμένες διευθετήσεις (*ranks*), που στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αξιολογούνται υπό το πρίσμα της θεωρίας των «κελλωτών δικτύων» (“*cellular solids*”). Οι ευμεγέθεις πυρήνες καταλαμβάνουν κεντρική θέση στο κύτταρο, με έντονα κεχρωσμένους και πολλούς πυρηνίσκους ενώ στο διαυγές κυτταρόπλασμα εμφανίζονται διάσπαρτα μικρά λιπιδικά έγκλειστα, ενδεικτικά ενεργής μεταβολικής κατάστασης. Τόσο τα P-I «WJ-MSCs» όσο και τα P-II WJ-MSCs πολλαπλασιάζονταν καθόλη τη διάρκεια της διδιάστατης κυτταροκαλλιέργειας, προάγοντας την επικάλυψη (ή επίστρωση) της επιφάνειας του καλλιεργητικού υποστρώματος μέχρι και ποσοστού **90%** του εμβαδού του δοχείου, σε χρονικά διαστήματα 20 ημερών και 10 ημερών, αντίστοιχα ([Εικ. V.2.2.Γ. και Εικ. V.2.2.Δ. αντίστοιχα]).



**Εικόνα V.2.3.:** Η κυτταροχημική χρώση των “P-I WJ-MSCs” (ή «WJ-MSCs») ([Εικ. V.2.2.A.], [Εικ. V.2.3.A.] και [Εικ. V.2.3.B.]) και των “P-II WJ-MSCs” ([Εικ. V.2.2.B.], [Εικ. V.2.3.A.] και [Εικ. V.2.3.B.]) την 5<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας αναδεικνύει τη στατιστική επικράτηση της πολυγωνικής έναντι της ατρακτοειδούς μορφολογίας. Είναι ευδιάκριτοι οι ευμεγέθεις πυρήνες με τους πολλούς κεχρωσμένους πυρηνίσκους (κόκκινα βέλη), στο κοκκιοβριθές κυτταρόπλασμα με τα πολυάριθμα λιπιδικά έγκλειστα (πράσινα βέλη) (Χρώση Giemsa, μεγέθυνση 400x).

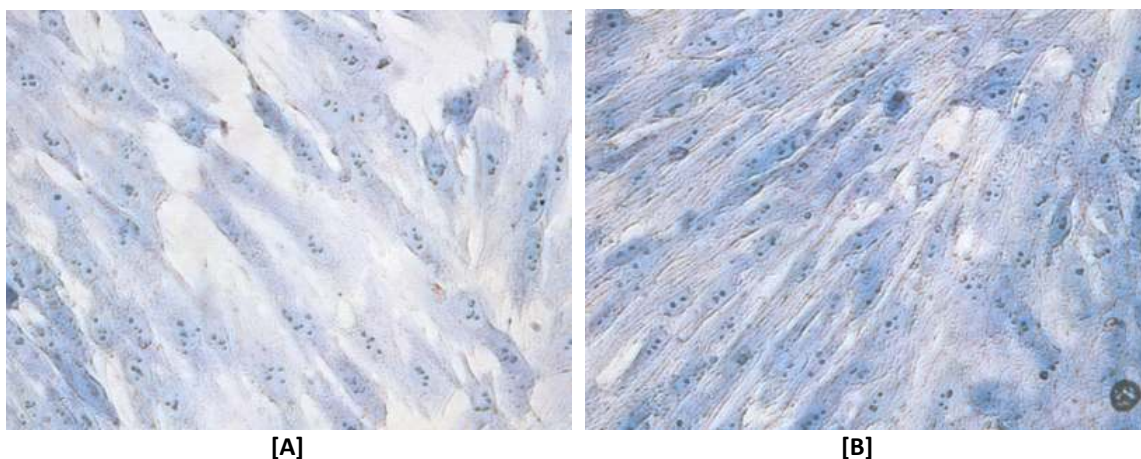
Συνοψίζονται δυο σημαντικές παρατηρήσεις που αφορούν τον τοπολογικό παραλληλισμό των μεσεγχυματικών συναθροίσεων με τις αβιοτικές και με τις βιοτικές «διδιάστατες κελλωτές διευθετήσεις» (“*honeycombs*”):

**[1]** Σε μια πρωιμότερη λουπόν φάση της μεσεγχυματικής συνάθροισης (“*MSC aggregation*”) οι διακυτταρικές επαφές περιορίζονται σε ένα καθεστώς λεπτών και επιμήκων κυτταροπλασματικών προσεκβολών, που σχετίζονται με την κυτταροβιολογία των ελασματοποδίων (*lamellipodia*) [Εικ. II.5.46.]. Στη μεταβατική αυτή κατάσταση η κυτταρική σχηματοποίηση δεν έχει ακόμη οριστικοποιήσει τη «διπολικά πολωμένη» ατρακτοειδή μορφολογία, με αποτέλεσμα να υιοθετεί εναλλακτικές μορφολογίες, οι οποίες αποκλίνουν (ή κυμαίνονται) από τη «μέση μορφολογία» που αντιπροσωπεύεται στο ατρακτόμορφο σχήμα του «τερματικού προσαρμοστικού φαινότυπου» και αντιστοιχεί στις μεσεγχυματικές συναθροίσεις κορεσμένων πληθυσμιακών πυκνοτήτων. Κατά συνέπεια το καθεστώς των διακυτταρικών επαφών απέχει (ή αποκλίνει) από μια ισοδύναμη *in vitro* εκδοχή της αντίστοιχης τοπολογικής συνθήκης «συνδεσιμότητας» (“*connectivity*”) που ισχύει στα «κελλωτά στερεά» (“*cellular solids*”), επειδή δεν έχει ολοκληρωθεί ο επιπολασμός του *in vitro* προσαρμοστικού φαινότυπου.

[2] Σε μια οψιμότερη όμως φάση της μεσεγχυματικής συνάθροισης (“*MSC aggregates*”) το καθεστώς των διακυτταρικών επαφών έχει εξειδικευτεί σε μια ισοδύναμη *in vitro* εκδοχή της αντίστοιχης τοπολογικής συνθήκης «συνδεσιμότητας» (“*connectivity*”) που ισχύει στα «κελλωτά στερεά» (“*cellular solids*”). Η πλειονότητα των κυττάρων έχει υιοθετήσει οριστικά την τυπική «διπολικά πολωμένη» ατρακτοειδή μορφολογία, η οποία αντικατοπτρίζει την ευνοϊκότερη σχηματοποίηση για τη μεσεγχυματική συνάθροιση που αντιστοιχεί σε κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες και κατ’επέκταση αντανακλά την εικαζόμενη «μέση μορφολογία» που αντιπροσωπεύεται στο ατρακτόμορφο σχήμα του «τερματικού προσαρμοστικού φαινότυπου».

### 2.3.b. Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Η χρώση με Giemsa για τα “*P-I WJ-MSCs*” (ή «*WJ-MSCs*») ([Εικ. V.2.2.Γ.] και [Εικ. V.2.4.Α.]) και για τα “*P-II WJ-MSCs*” ([Εικ. V.2.2.Δ.] και [Εικ. V.2.4.Β.]) έδειξε ότι στο στάδιο του κορεσμού της πληθυσμιακής πυκνότητας (*confluency*) ο φαινότυπος του μεσεγχυματικού κυττάρου έχει υιοθετήσει μια τροποποιημένη μορφολογία, έχοντας περιορίσει το πολυσχιδές περίγραμμα και οξύνοντας (ή επιτείνοντας) το «διπολικά πολωμένο» σχήμα, με αποτέλεσμα να καταλήξει σε πιο επιμηκυσμένες και ευθυτενείς μορφολογίες, συγκρινόμενες με τις μεταβατικές κατά τον εμβολιασμό του (*seeding*) στο δοχείο καλλιέργειας. Αυτά τα οψιμότερα ατρακτοειδή περιγράμματα αντικατοπτρίζουν την ευνοϊκότερη διαμόρφωση για τη μεσεγχυματική συνάθροιση που αντιστοιχεί σε κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες και αντιπροσωπεύουν το τερματικό στάδιο της προσαρμοστικής σχηματοποίησης. Στο απώγειο της εκθετικής φάσης της καμπύλης Hayflick έχουν διατηρήσει τον ευμεγέθη πυρήνα με τους πολλούς και έντονα κεχωσμένους πυρηνίσκους, όμως ο όγκος του κυτταροπλάσματος έχει περιοριστεί σε σχέση με τον όγκο του πυρήνα, διατηρώντας ακόμη αρκετά από τα αρχικά λιπιδικά έγκλειστα, αλλά καμιά από τις κυτοπλασμικές προεκβολές (*cell processes*) που έβριθαν στις αρχικές πολυγωνικές μορφολογίες. Γενικά, η *ex vivo* επέκταση (*population expansion*) των κυττάρων παρατάθηκε πέρα από τις 90 ημέρες, ωστόσο για τα *P-I WJ-MSCs* (ή «*WJ-MSCs*») ο μέσος ρυθμός πολλαπλασιασμού διαπιστώθηκε ότι ήταν βραδύτερος, με μέσο  $PD\bar{T} = 141,30 \pm 43,45$  ώρες σε αντιπαράβολή προς τα *P-II WJ-MSCs*, των οποίων η αντίστοιχη τιμή ήταν  $PD\bar{T} = 87,22 \pm 19,28$  ώρες ( $p=0.0120$ ). Στη συνέχεια τα κύτταρα των πρωτογενών καλλιιεργειών και των δύο πρωτόκολλων απομόνωσης χρησιμοποιήθηκαν για φαινοτυπικούς και λειτουργικούς ελέγχους.



**Εικόνα V.2.4.:** Η προσαρμοστική μορφογένεση διατήρησε το μορφομετρικό πρότυπο των ευμεγέθων πυρήνων και του κοκκιοβριθούς κυτταροπλάσματος, μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος 20 ημερών για τα “*P-I WJ-MSCs*” (ή «*WJ-MSCs*») [Εικ. V.2.2.Γ.] όπως αποκαλύπτεται στο [Α] και διαστήματος 10 ημερών για τα “*P-II WJ-MSCs*” [Εικ. V.2.2.Δ.] όπως αποκαλύπτεται στο [Β] (Χρώση Giemsa, μεγέθυνση 400x).

### 2.4. Επιλογή θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφάλιου λώρου (*UC-MSCs*)

#### 2.4.a. Ο αντίκτυπος της Επιλογής θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφάλιου λώρου (UC-MSCs), στα κινητικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειάς τους.

Κατά τον έλεγχο της επίδρασης των διαφορετικών θρεπτικών υλικών στην καλλιέργεια των MSCs που απομονώθηκαν από τον ομφάλιο λώρο (**UC-MSCs**), είτε με το πρωτόκολλο της ενζυμικής πέψης (**UC-MSCs**), είτε με εκείνο της ιστοκαλλιέργειας (**WJ-MSCs**), διαπιστώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές οι οποίες συνοψίζονται στους πίνακες που ακολουθούν (**Πίνακας V-1** και **Πίνακας V-2**). Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των τεσσάρων θρεπτικών υλικών που ελέγχθηκαν, επικεντρώθηκε στα ποσοστά επιτυχίας των καλλιεργειών, τα οποία αντιπροσωπεύουν το διαφορικό αντίκτυπο των επιμέρους καλλιεργητικών συστατικών στην κινητική της καλλιέργειας:

1] με τη χρήση του MCM καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν επιτυχώς MSCs της *Βαρτόνειας γέλης* (WJ-MSCs) μόνο από το 70% του συνόλου των ομφάλιων λώρων,

2] με τη χρήση του α-MEM με 20% CBS, καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν επιτυχώς MSCs της *Βαρτόνειας γέλης* (WJ-MSCs) από το 80% των ομφάλιων λώρων,

3] ενώ με τη χρήση του α-MEM με 10% FBS και με 20% FBS, καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν επιτυχώς MSCs της *Βαρτόνειας γέλης* (WJ-MSCs) από το 85% και από το 90% των ομφάλιων λώρων, αντίστοιχα,

4] Επιπλέον, παρατηρήθηκε επισταμένα ότι στις περιπτώσεις όπου κατέστη δυνατή η έναρξη της καλλιέργειας των UC-MSCs, η μεταγενέστερη εξέλιξή της (η πληθυσμιακή επέκταση, το μοτίβο της μεσεγχυματικής συνάθροισης, κλπ) επηρεάστηκε σε σημαντικό ποσοστό από την επιλογή του θρεπτικού υλικού.

**Πίνακας V-1:** Κινητικά χαρακτηριστικά των πρωτογενών καλλιεργειών UC-MSCs συναρτήσει της μεθόδου (ή πρωτόκολλου) απομόνωσης.

|                                                                          | <b>Μέθοδος Απομόνωσης</b>   |                             |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                                                          | <b>Ενζυμική πέψη</b>        | <b>Ιστοκαλλιέργειες</b>     |
| <b><i>n</i></b>                                                          | 10                          | 10                          |
| <b>Απομονωμένα κύτταρα ανά cm Ο.Λ.</b>                                   | $1.75 \pm 0.94 \times 10^5$ | $3.02 \pm 0.66 \times 10^5$ |
| <b>Βιωσιμότητα κυττάρων [S]</b>                                          | $83 \pm 17\%$               | $93 \pm 5\%$                |
| <b>% καλλιεργειών όπου παρατηρήθηκε ανάπτυξη των κυττάρων (<i>n</i>)</b> | 100% (10)                   | 100% (10)                   |
| <b>Μέσος όρος διπλασιασμού του πληθυσμού (PDT σε hr)</b>                 | $141.30 \pm 43.45$          | $87.22 \pm 19.28$           |
|                                                                          |                             | ( $p = 0.0120$ )            |
| <b>Τελική απόδοση</b>                                                    | $3.42 \pm 1.8 \times 10^6$  | $4.57 \pm 1.9 \times 10^6$  |

Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε MCM πολλαπλασιάζονταν με μέσο χρόνο διπλασιασμού (**μέσο PDT**),  $PDT = 116,1 \pm 81,2$  ώρες στην πρωτογενή καλλιέργεια. Συνολικά

μπόρεσαν να διατηρηθούν *in vitro* για 26 μόλις ημέρες πριν επέλθει αναστολή του πολλαπλασιασμού λόγω κυτταρικής γήρανσης. Στο διάστημα αυτό ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού τους ήταν  $PD\check{T} = 147,3 \pm 44,1$  ώρες δηλαδή παρατηρήθηκε επιβράδυνση κατά την εξέλιξη της καλλιέργειας. Το αντίθετο παρατηρήθηκε στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε α-MEM με 10% FBS. Ενώ στις πρωτογενείς καλλιέργειες διπλασιάζονταν κατά μέσον όρο κάθε  $PD\check{T} = 186,2 \pm 80,6$  ώρες στη συνέχεια ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους επιταχύνθηκε σημαντικά ώστε στις 62 ημέρες που διήρκεσε η καλλιέργειά τους το μέσο  $PDT$  ήταν  $PD\check{T} = 108,2 \pm 52,2$  ώρες. Πιο σταθερός ήταν ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των WJ-MSCs στο α-MEM με 20% FBS. Τόσο στις πρωτογενείς καλλιέργειες, όσο και για το συνολικό διάστημα που τα κύτταρα διατηρήθηκαν *in vitro* (πλέον των τριών μηνών) πολλαπλασιάζονταν με ταχείς ρυθμούς και μέσα  $PDT$ ,  $PD\check{T} = 84,4 \pm 12,3$  και  $PD\check{T} = 82,48 \pm 14,5$  ώρες αντίστοιχα. Τέλος οι καλλιέργειες WJ-MSCs σε α-MEM με 20% CBS παρουσίασαν, βραδύτερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού σε σχέση με αυτές σε α-MEM με 20% FBS, αφού τα  $PDT$  στις πρωτογενείς καλλιέργειες και στη συνολική διάρκεια της επέκτασης των κυττάρων ήταν  $PD\check{T} = 121,3 \pm 66,6$  και  $PD\check{T} = 111,4 \pm 26,8$  ώρες, αντίστοιχα αλλά μπόρεσαν και αυτές να διατηρηθούν για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών. Με βάση τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων διαπιστώθηκε ότι, αν είχαν ξεκινήσει όλες οι καλλιέργειες με τον ίδιο αρχικό πληθυσμό ( $N = 50.000$  κύτταρα), τότε μόνο αυτές που πραγματοποιήθηκαν σε FBS θα μπορούσαν να αποδώσουν το μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων στο συντομότερο χρονικό διάστημα, αναδεικνύοντας το CBS μόνο οριακά υποδεέστερο του FBS. Εντέλει, για τη συνέχιση των πειραμάτων επελέγη η χρήση θρεπτικού υλικού α-MEM με 15% FBS, αφενός για την προοπτική της διατήρησης των πλεονεκτημάτων των καλλιεργειών σε α-MEM με 20% FBS, δηλαδή του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού και της δυνατότητας διατήρησης των κυττάρων σε καλλιέργεια για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα και αφετέρου για την ανάγκη περιορισμού της έκθεσής τους σε ζωικό ορό.

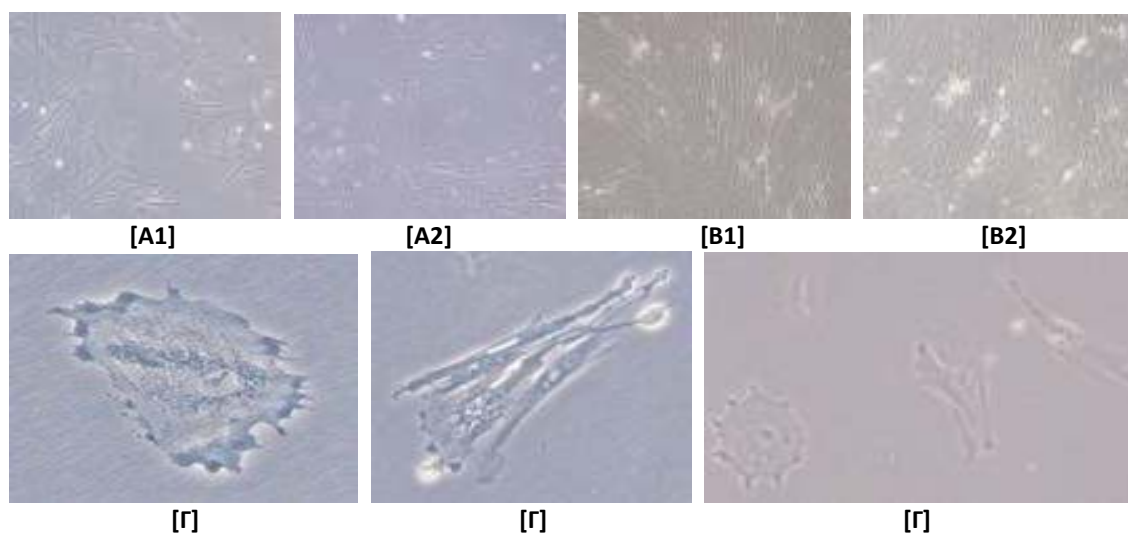
**Πίνακας V-2:** Κινητικά χαρακτηριστικά των πρωτογενών καλλιεργειών WJ-MSCs συναρτήσει του χρησιμοποιημένου θρεπτικού υλικού.

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

**2.4.b. Ο αντίκτυπος της Επιλογής θρεπτικού υλικού για τα Μεσεγχυματικά Κύτταρα του ομφάλιου λώρου, στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειάς τους.**

Οι σειρές φωτογραφιών που συνοψίζονται στην [Εικ. V.2.5.] απεικονίζουν:

- α) αφενός τη βαθμιαία έκπτωση των μορφολογικών χαρακτηριστικών που είναι συσχετισμένα με τον «τυπικό» μεσεγχυματικό φαινότυπο, ως αποτέλεσμα «γήρανσης» της καλλιέργειάς τους και
- β) αφετέρου τις προσαρμοστικές μεταβολές του *in vitro* μεσεγχυματικού φαινότυπου, όπως αποτυπώνονται στα διακριτά στιγμιότυπα κατά τη μονοκυτταρική επίστρωση στη διδιάστατη επιφάνεια του καλλιεργητικού υποστρώματος (*MSC aggregation pattern*). Στην πρώτη σειρά απεικονίζονται μορφολογίες και συναθροίσεις, 5 – 10 ημέρες κατόπιν της έναρξης της καλλιέργειας [A1, A2] και 15 – 25 ημέρες κατόπιν της έναρξης της καλλιέργειας [B1, B2]. Στη δεύτερη [Γ] σειρά, απεικονίζονται μορφολογίες, περίπου 35 ημέρες κατόπιν της έναρξης της καλλιέργειας.

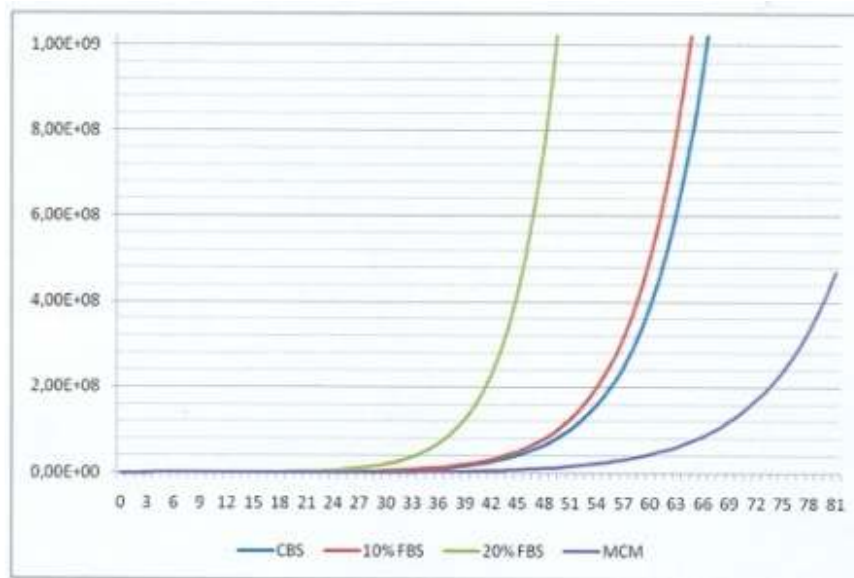


Εικόνα V.2.5.: προσαρμοστικές μορφολογίες των UC-MSCs στη διδιάστατη κυτταροκαλλιέργεια.

#### V-2.4.c Σύνοψη αποτελεσμάτων για τα MSCs του ομφάλιου λώρου

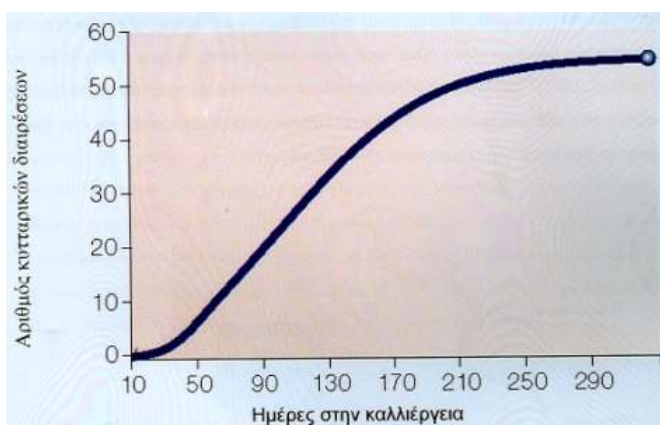
- 1] Οι συλλογές έγιναν από τελειόμηνους τοκετούς και κατόπιν έγγραφης συναίνεσης της μητέρας. Η θερμοκρασία κατά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο ήταν 4°C και η επεξεργασία τους, για την απομόνωση των κυττάρων, ξεκίνησε σε λιγότερο από 24 ώρες από τη συλλογή.
- 2] Στις περιπτώσεις όπου η απομόνωση UC-MSCs ήταν επιτυχής, μελετήθηκε η πολλαπλασιαστική δυνατότητα των κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες. Η μέθοδος απομόνωσης δε φάνηκε να επηρεάζει την κινητική των καλλιεργειών των UC-MSCs [Εικ. V.2.6.]. Η μέγιστη διάρκεια διατήρησης των κυττάρων στις συνθήκες της μελέτης ήταν για 120 ημέρες, που αντιστοιχούσαν σε 6 ανακαλλιέργειες (“*passages*”). Μετά από αυτό το διάστημα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σταμάτησε και παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία τους [Εικ. V.2.5.]. Συγκεκριμένα εμφάνιζαν ένα υπερβολικά ακανόνιστο περίγραμμα, που αντιστοιχούσε σε πολυσχιδές κοίλο πολυγωνικό ή αστεροειδές κυτταρικό σχήμα με εξασθενημένο, έντονα κοκκιώδες κυτταρόπλασμα με πολύλοβους πυρήνες. Οι καλλιέργειες αυτές κατέληξαν με τη σταδιακή νέκρωση και αποκόλληση των UC-MSCs. Μέχρι τη 5η ανακαλλιέργεια (που αντιστοιχούσε σε 100 ημέρες καλλιέργειας) οπότε και παρατηρήθηκε η τελευταία αύξησή του, ο πληθυσμός των UC-MSCs υπέστη κατά μέσον όρο  $\bar{x} = 23,18 \pm 1,78$  διπλασιασμούς, δηλαδή έναν διπλασιασμό κάθε  $PD\bar{T} = 104 \pm 8,12$  ώρες.
- 3] Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν την απουσία του αιμοποιητικού δείκτη CD45 (ποσοτό έκφρασης μικρότερο του 1%). Αντιθέτως οι χαρακτηριστικοί των MSCs δείκτες που εξετάστηκαν, δηλαδή το CD105, CD29, CD44 αλλά και το MHC τάξης-I αντιγόνο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA class-I), βρέθηκαν θετικοί με ποσοστό έκφρασης μεγαλύτερο του 95%. Τα χαρακτηριστικά αυτά διατηρήθηκαν αμετάβλητα έως και την τελευταία ανακαλλιέργεια (5η) όπου συνεχίστηκε ο πολλαπλασιασμός των UC-MSCs, προτού τελικά νεκρωθούν τα κύτταρα.





**Εικόνα V.2.6.:** Θεωρητικές καμπύλες αύξησης του αριθμού των κυττάρων, συναρτήσει του χρησιμοποιημένου θρεπτικού υλικού. Η υπόθεση εργασίας θεώρησε πως όλες οι καλλιέργειες ξεκίνησαν με τον ίδιο αρχικό πληθυσμό MSCs (50.000 κύτταρα), ενώ οι καμπύλες υπολογίστηκαν συναρτήσει του μέσου ρυθμού πολλαπλασιασμού (**PDT**). (Στον άξονα των τετμημένων (x'x) η μεταβλητή του χρόνου, σε ημέρες από την έναρξη της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ στον άξονα των τεταγμένων (y'y) ο αριθμός των MSCs).

Για την πληρέστερη κατανόηση του γραφικού χαρακτήρα των θεωρητικώς υπολογιζόμενων καμπυλών για την *in vitro* πληθυσμιακή επέκταση [Εικ. V.2.6.], κρίθηκε σκόπιμη μια σύγκριση με ένα τυπικό υπόδειγμα της καμπύλης Hayflick. Το 1961, ο Leonard Hayflick και ο Paul Moorerhead ανακάλυψαν ότι τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα εμφανίζουν το φαινόμενο της βαθμιαίας έκπτωσης του πολλαπλασιαστικού δυναμικού που είναι γνωστό ως αναδιπλασιαστική γήρανση. Συγκεκριμένα, τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, όταν μεταφερθούν στην καλλιέργεια, χάνουν σταδιακά το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και αφού πραγματοποιήσουν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διπλασιασμών ( $\approx 50$  για τους ινοβλάστες), φτάνουν στο σημείο της μη αντιστρεπτής παύσης του πολλαπλασιασμού. Η παραπάνω διατύπωση εκφράζεται και από τη λογαριθμική καμπύλη Hayflick που χαρακτηρίζει την *in vitro* ανάπτυξη των φυσιολογικών ινοβλαστών [Εικ. V.2.7.].



**Εικόνα V.2.7.:** Γραφική απόδοση της Καμπύλης του Hayflick. Ανθρώπινοι εμβρυικοί ινοβλάστες διαιρούνται στην καλλιέργεια καθ' όλη τη διάρκεια της *in vitro* πληθυσμιακής επέκτασής τους και καταμετρείται ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων, συναρτήσει του χρόνου παραμονής τους στην καλλιέργεια. Μια μεγάλη περίοδος συνεχούς αύξησης ακολουθείται από μια περίοδο με μειωμένο ρυθμό αύξησης που στο τέλος καταλήγει σε μη αντιστρεπτή παύση του πολλαπλασιασμού (Shay & Wright, 2000).





**Δ-ΜΕΡΟΣ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ****ΕΝΟΤΗΤΑ-VI.: Συζήτηση-Συμπεράσματα για το *in vitro* πειραματικό σύστημα****VI.1. Συνοπτικά συμπεράσματα**

1] Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε η αποδοτικότερη απομόνωση MSCs από τη *Βαρτόναιο γέλη (Wharton's Jelly)* του ομφάλιου λώρου (WJ-MSCs), συγκριτικά με την αντίστοιχη διαδικασία απομόνωσής τους από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Τα κύτταρα αυτά σε σύγκριση με εκείνα (MSCs) των ενηλίκων, παρουσιάζουν διαφορές στη δυνατότητα διαφοροποίησής τους, οι οποίες σχετίζονται με την εμβρυική προέλευσή τους (ή οντογενετική καταγωγή) και με την «νεαρή» τους ηλικία.

2] Αποδείχθηκε ότι τα MSCs του ομφάλιου λώρου (UC-MSCs), μπορούν να εποικίσουν ικρίωματα κολλαγόνου και θα μπορούσαν πιθανότατα να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση των κατασκευών ιστομηχανικής που έως τώρα στηρίζονται αποκλειστικά στην προμήθεια πιο «γηρασμένων» MSCs από ιστούς ενηλίκων.

3] Σχεδιάστηκε μελετήθηκε και επικυρώθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης και κρυοσυντήρησης των μεσεγχυματικών κυττάρων από τη *Βαρτόναιο γέλη (Wharton's Jelly)* του ομφάλιου λώρου (WJ-MSCs), με σκοπό τη μελλοντική χρήση σε κλινικές εφαρμογές, γεγονός που επέτρεψε τη δημιουργία της πρώτης Τράπεζας Μεσεγχυματικών Κυττάρων του ομφάλιου λώρου («ΕΛΤΟΠΑ») στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

4] Διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια εμβρυικών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (UC-MSCs), μπορεί να υποστηριχθεί χωρίς τη χρήση ζωικών ορών, χρησιμοποιώντας ως καινοτόμο υποκατάστατο, τον ορό ομφαλοπλακουντιακού αίματος (CBS).

5] Συνοπτικά, το MCM αποδείχθηκε το πλέον ακατάλληλο για την καλλιέργεια MSCs ομφάλιου λώρου (UC-MSCs), λόγω του μικρότερου ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της αδυναμίας διατήρησής τους σε καλλιέργεια για διάστημα μεγαλύτερο των 26 ημερών, καθώς και εξαιτίας των υποδεέστερων συνολικών ποσοστών επιτυχίας (ή απόδοσης) των καλλιεργειών με MCM.

6] Αντίθετα, το α-MEM με FBS αναδείχθηκε ως το βέλτιστο καλλιεργητικό υλικό. Παρατηρήθηκε, αφενός μια σαφής εξάρτηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας (ή δυναμικού) των μεσεγχυματικών κυττάρων συσχετισμένη με τη συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου ορού, η οποία αφετέρου, συσχετίστηκε επιπλέον και με τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά τους.

7] Το α-MEM με 20% CBS κρίθηκε αναποτελεσματικότερο από το FBS, επειδή επιβράδυνε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μολοντί επέτρεψε τη διατήρηση των καλλιεργειών για μεγάλο χρονικό διάστημα.

8] Λαμβάνοντας υπόψη τα συγκριτικά αποτελέσματα της επίδρασης των θρεπτικών υλικών τόσο στα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, όσο και σε εκείνα του ομφάλιου λώρου (UC-MSCs), αφενός διασαφηνίστηκε ότι η σύνθεση του MCM ασκεί την ίδια επίδραση σε όλα αδιακρίτως τα MSCs εμβρυϊκής προέλευσης και αφετέρου ότι το CBS θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των ζωικών ορών στις κυτταροκαλλιέργειες εμβρυικών MSCs γενικότερα, αφού επιτρέπει τη διατήρησή τους.

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

### VI.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφάλιου λώρου

Για την απομόνωση των MSCs από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs), αρχικά δοκιμάστηκε η μέθοδος της ενζυμικής πέψης του ιστού (Lu L.L. et al., 2006; Wang H.S. et al., 2004). Παρόλο που οι δύο αυτές ερευνητικές ομάδες είχαν ήδη αναφερθεί στη δυνατότητα απομόνωσης MSCs από τον ομφάλιο λώρο, ωστόσο δεν είχαν ποτέ επισημανθεί ή διευκρινιστεί οι λεπτομέρειες και ιδιαιτερότητες των συνθηκών της απομόνωσης και της καλλιέργειάς τους, ένα έλλειμμα που αναπληρώθηκε επαρκώς στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

### VI.2.2. Σχεδιασμός, υλοποίηση και επικύρωση, πρωτόκολλου καλλιέργειας Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων του ομφάλιου λώρου

Για την επιβεβαίωση και βελτίωση της δυνατότητας απομόνωσης MSCs από τον ομφάλιο λώρο, καταστρώθηκε ένα πρωτόκολλο που επέτρεψε τη συστηματική απομόνωση, καλλιέργεια και κρυοσυντήρησή τους για μελλοντική κλινική χρήση. Πρόσφατες μελέτες έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των βέλτιστων συνθηκών απομόνωσης (Salehinejad P. et al., 2012; Yoon J.H. et al., 2013), καλλιέργειας και κρυοκατάψυξης (Balci D. and Can A., 2013; Da-Croce L. et al., 2013) των MSCs του ομφάλιου λώρου (UC-MSCs). Επισημαίνεται η βασική προϋπόθεση αξιοποίησης των MSCs για κλινική χρήση, η οποία έγκειται στην προμήθεια ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα, διότι η παρατεταμένη παραμονή τους σε συνθήκες καλλιέργειας ενδέχεται να οδηγήσει σε συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών (Ho A.D. et al., 2005) ή καταστροφή των κυττάρων λόγω γήρανσης. Πράγματι, πολλαπλές μελέτες κατέδειξαν ότι οι μεταβολές στις οποίες υπόκεινται τα MSCs κατά την καλλιέργειά τους ταυτίζονται με τις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα *in vivo* εξαιτίας της γήρανσης του οργανισμού (Wagner W. et al., 2009).

Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι βραχύνονται τα τελομερή τους (Baxter M.A. et al., 2004), αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και την απόπτωση σε βάρος των γονιδίων που ελέγχουν τη μίτωση (Schallmoser K. et al., 2010) και μεταβάλλεται το προφίλ μεθυλίωσης του DNA (Bork S. et al., 2010) με αποτέλεσμα την έκπτωση ή και απώλεια της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και της φαινοτυπικής τους ταυτότητας. Ως εκ τούτου αλλά και λόγω του γεγονότος ότι η παραγωγή του CBS οδηγεί στην καταστροφή μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος, που θα μπορούσαν εναλλακτικά να χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, επιλέχθηκε το α-MEM με FBS για τη συνέχιση των πειραμάτων και τη μελέτη των WJ-MSCs. Συνήθως τα καθιερωμένα πρωτόκολλα καλλιέργειας και επέκτασης MSCs χρησιμοποιούν συγκεντρώσεις ορού που κυμαίνονται μεταξύ του 10% και 20% (Chamberlain G. et al., 2007; Meuleman N. et al., 2006), μια διακύμανση, η διερεύνηση της οποίας επαναλήφθηκε και στην παρούσα εργασία.

Δεδομένης της διαπίστωσης ότι η επίδραση του FBS στα κύτταρα ήταν εξαρτημένη από τη χρησιμοποιούμενη ποσότητα, προτιμήθηκε η συγκέντρωση 15% FBS, προκειμένου να σταθμιστεί η επίσπευση της επέκτασης του μεσεγχυματικού πληθυσμού, συνδυασμένη με τον περιορισμό στην κατανάλωση ορού. Εξάλλου, συγκριτικές μελέτες σε MSCs άλλων θηλαστικών (Ayatollahi M. et al., 2012; Eslaminejad M.B. et al., 2009), αλλά και παλαιότερες σε ανθρώπινα κύτταρα του αμνιακού υγρού (Felix J.S. et al., 1974), έδειξαν ότι οι ευνοϊκές επιπτώσεις του ορού στη βιωσιμότητα και στον πολλαπλασιασμό μεγιστοποιούνται μέχρι τη συγκέντρωση 15% FBS, ενώ περαιτέρω αύξηση δεν συνοδεύεται από αξιολογη μεταβολή των κινητικών χαρακτηριστικών της καλλιέργειας.

#### **VI.2.2.a. Σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης με κριτήριο τα κινητικά χαρακτηριστικά της κυτταροκαλλιέργειας.**

Αρχικά, από τη σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης διαπιστώθηκε ότι τόσο η ενζυμική πέψη όσο και η ιστοκαλλιέργεια, επέτρεψαν τη λήψη ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων. Ωστόσο, η απόδοση σε WJ-MSCs που παρήχθησαν με το πρωτόκολλο των ιστοκαλλιεργειών, συνοδεύτηκε από ταχύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει πρόσφατη μελέτη που κατέδειξε επιπλέον και την καλύτερη βιωσιμότητα των απομονωμένων MSCs, σε αντιπαράθεση προς την αντίστοιχη τιμή που απέδωσε η ενζυμική πέψη (Yoon J.H. et al., 2013). Μια πιθανή ερμηνεία εστιάζεται στον ευνοϊκότερο αντίκτυπο που ασκεί η δεδομένη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία «καθλώνονται» τα WJ-MSCs κατά την απομόνωσή τους με το πρωτόκολλο της ιστοκαλλιέργειας.

1] Έτσι, στην πλειονότητά τους τα P-II WJ-MSCs στη Βαρτόναιο γέλη ενός οποιουδήποτε ομφάλιου λώρου τελειόμηνης κύησης, εικάζεται ότι αντιπροσωπεύουν έναν σχετικώς **αμυγή (ή ομοιογενή) πληθυσμό**, ο οποίος στο *in vivo* ανατομικό περιβάλλον του οργανισμού της επιτόκου μητέρας διανύει εκθετική φάση πολλαπλασιασμού. Στην υπόθεση αυτή συνηγορεί η διαπίστωση ότι το πληθυσμιακό κλάσμα των P-II WJ-MSCs, ήδη από την έναρξη των πρωτογενών καλλιεργειών και μέχρι το πέρας τους, πολλαπλασιάστηκε αποδοτικότερα κι επικάλυψε συντομότερα το καλλιεργητικό υπόστρωμα, παράγοντας συγχρόνως και κύτταρα καλύτερης ποιότητας σε οποιαδήποτε επιμέρους φάση της *in vitro* πληθυσμιακής επέκτασης, σε αντιδιαστολή προς τα P-I WJ-MSCs (ή P-I «WJ-MSCs») στα οποία, πιθανότατα επειδή συλλέχθηκαν με μια διαδικασία (της ενζυμικής πέψης) υποδεέστερης διακριτικής ικανότητας συμπεριλήφθηκε (μοιραία) ένας μεσεγχυματικός πληθυσμός ετερογενούς (ή μεικτής) φαινοτυπικής ταυτότητας, αντιπροσωπεύοντας οποιαδήποτε πιθανή φάση του *in vivo* κυτταρικού κύκλου και προσδίδοντας κατ'επέκταση φτωχότερα κινητικά χαρακτηριστικά στην *in vitro* πληθυσμιακή επέκταση.

2] Κατά συνέπεια, μετά τον εμβολιασμό στις πρωτογενείς τους καλλιέργειες, τα P-I WJ-MSCs (ή P-I «WJ-MSCs») παρέμειναν σε *λανθάνουσα φάση* για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μέχρι ολοκληρωθεί η προσαρμογή τους, η οποία διατήρησε τις **a priori** δυσμενέστερες προοπτικές εγκαίνιασης και ευόδωσης του (ασύγχρονου) κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με αναπόφευκτο αποτέλεσμα την ανεπιθύμητη παράταση της χρονικής διάρκειας που απαιτούν τα πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας, για συσσώρευση του προβλεπόμενου αριθμού των **1,0 x 10<sup>6</sup>** κυττάρων ανά χιλιόγραμμα βάρους του ασθενούς (Troyer D.L. and Weiss M.L., 2008).

#### **VI.2.2.b. Σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης με κριτήριο τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της κυτταροκαλλιέργειας.**

Ωστόσο, ανεξαρτήτως της τεχνικής (ή πρωτοκόλλου) απομόνωσης, η ταυτότητα των MSCs που απομονώνονται από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs), επιβεβαίωσε τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων, δηλαδή το διπολικό ή ατρακτοειδές σχήμα των ινοβλαστοειδών κυττάρων, με τους μεγάλους πυρήνες, τους πολλούς και έντονα κεχωρημένους πυρηνίσκους και το διαυγές (ή «λεπτό») κυτταρόπλασμα, διεσπαρμένο με λιπιδικά έγκλειστα.

Επίσης, ο ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος επιβεβαίωσε το μεσεγχυματικό τους χαρακτήρα, καθώς εξέφραζαν τους δείκτες επιφανείας CD105, CD93, CD70, CD29, CD44, CD51, CD58, και το αντιγόνο HLA τάξης-I, ενώ ήταν αρνητικά για τους αιμοποιητικούς δείκτες CD45, CD34 και το αντιγόνο HLA τάξης-II.

Παράλληλα, όπως εξάλλου και τα MSCs του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, έτσι και τα MSCs από τον ομφάλιο λώρο (UC-MSCs), εξέφραζαν τα γονίδια Oct-4, Nanog, LIF και το FGF-2. Τα τρία πρώτα από τα γονίδια αυτά έχουν διαπιστωθεί μεμονωμένα και όχι σε συνδυασμό, σε κύτταρα

του ομφάλιου λώρου (Lu L.L. et al., 2006 ; Yoon J.H. et al., 2013), γεγονός που επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης και αποδεικνύει την πολυδυναμικότητα και το βλαστικό χαρακτήρα των UC-MSCs. Το σύνολο των παραπάνω μορφολογικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών διατηρήθηκε καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας αποδεικνύοντας ότι είναι εφικτή η πληθυσμιακή επέκταση των MSCs του ομφάλιου λώρου.

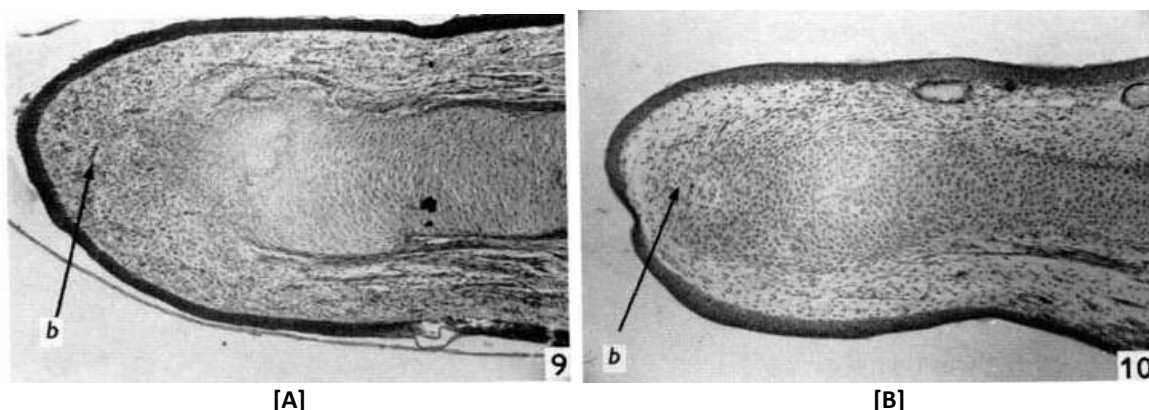
Επιπλέον, τα απομονωμένα κύτταρα του ομφάλιου λώρου διατήρησαν και τις υπόλοιπες ιδιότητες των MSCs αφού διαφοροποιήθηκαν σε οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα, αλλά δε διαφοροποιήθηκαν πλήρως σε λιποκύτταρα στις 21 ημέρες που διήρκεσε η επαγωγή της λιπογένεσης. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τη δημοσιευμένη μελέτη του Zhang και των συνεργατών του που ανέφερε ότι τα UC-MSCs έχουν αυξημένη δυνατότητα διαφοροποίησης σε οστεοκύτταρα σε σχέση με τα MSCs του μυελού των οστών, αλλά δε διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα (Zhang Z.Y. et al., 2009). Παράλληλα, τα αποτελέσματα διαφοροποίησης των κυττάρων τόσο του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, όσο και του ομφάλιου λώρου έρχονται να επιβεβαιώσουν μελέτες που αναφέρουν ότι τα MSCs εμβρυικής προέλευσης παρουσιάζουν περιορισμένη δυνατότητα λιπογένεσης (Karahuseynoglu S. et al., 2007; Ragni E. et al., 2013).

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αποτελεσμάτων της απομόνωσης και καλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων από ομφάλιο λώρο (UC-MSCs), αξιολογούνται ως εφάμιλλης αποδοτικότητας τα δυο πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή της ενζυμικής πέψης ολόκληρου ομφάλιου λώρου και της ιστοκαλλιέργειας της *Βαρτόνειας γέλης* (*Wharton's Jelly*). Εξάλλου και οι δύο τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από διαφορετικές ομάδες με μεγάλη επιτυχία (Lindenmair A. et al., 2012). Κατά συνέπεια, η τελική επιλογή της πλέον ενδεδειγμένης τεχνικής, μπορεί να βασιστεί μόνο σε δευτερεύοντα, ή σε λεπτομερέστερα κριτήρια, επισφαλή όμως σε υποκειμενικές παραμέτρους όπως είναι για παράδειγμα το οικονομικό κόστος (δεδομένου ότι η χρήση ενζύμων αυξάνει τις εργαστηριακές δαπάνες), η διαχείριση του φόρτου εργασίας στην εργαστηριακή ρουτίνα, καθώς και η εμπειρία του ιατροβιολογικού προσωπικού στην αντίστοιχη τεχνογνωσία.

Πάντως, αν και δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής τοξική επίδραση των χρησιμοποιούμενων ενζύμων στις μεσεγχυματικές κυτταροκαλλιέργειες, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας συνηγορούν ευμενέστερα υπέρ των πλεονεκτημάτων που συγκεντρώνει η τεχνική (ή το πρωτόκολλο) απομόνωσης και επέκτασης των μεσεγχυματικών κυττάρων με συμβατικές (διδιάστατες) ιστοκαλλιέργειες από ομφάλιο λώρο, κυρίως επειδή ασκεί μια εκδοχή «επιλογής» ανατομικώς εντοπισμένων μεσεγχυματικών πληθυσμών από τη *Βαρτόνεια γέλη*, με βέλτιστες προδιαγραφές βιωσιμότητας και επέκτασης και ενδεχόμενα, ανώτερης θεραπευτικής αξίας. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρει η *Iftimia-Mander*, η τεχνική των ιστοκαλλιεργειών διασφαλίζει πιο σταθερή απόδοση επειδή επηρεάζεται λιγότερο από παραμέτρους που έχουν σχέση με την ποιότητα του αρχικού (πρωτόλειου ή ακατέργαστου) βιολογικού υλικού (Iftimia-Mander A. et al., 2013).

**Δ-ΜΕΡΟΣ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ****ΕΝΟΤΗΤΑ-VII: Συζήτηση-Συμπεράσματα για το *in vivo* πειραματικό σύστημα****VII.1. Η συμβολή της κυτταρικής προσκόλλησης στη χάραξη σχεδίου (*pattern formation*)**

Στις προνύμφες των αμφιβίων, η ερμηνεία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (*intercalation, intercalary regeneration*), που επάγεται κατόπιν του αντικανονικού επαναπροσανατολισμού (αντιπαράλληλης στοίχισης ένεκεν αναστροφής κατά  $180^\circ$ ) των προσθιοπίσθιων και νωτοκοιλιακών αξόνων ασυμμετρίας, τον οποία επιβάλλει η χειρουργική συγκόλληση των δυο επιφανειών ακρωτηριασμού (μοσχεύματος και κολοβώματος) (Κωσταρίδης Π., 1989; Αναστασόπουλος Σ., 1998; Μαυρόγιαννου Ε., 2003) είτε με ομόπλευρη (*ipsilateral*) είτε με ετερόπλευρη (*contralateral*) μεταμόσχευση, παραπέμπει σε κάποια από τις διαθέσιμες θεωρίες της μορφογένεσης, οι οποίες όλες συγκλίνουν στην εισήγηση της έννοιας της τοπικής πληροφορίας (*positional information*). Έτσι, στους πειραματικούς χειρισμούς των ακρωτηριασμών και των μεταμοσχεύσεων άκρων στους γυρίνους, εικάζεται ότι η υποβόσκουσα μιτογόνος συνθήκη έγκειται σε κάποια μορφή ασυνέχειας των τοπικών πληροφοριών ("*positional information discontinuity*"), εξαιτίας της προκλητής ανακατανομής τους, παραδείγματος χάριν με αντίθετα προσανατολισμένες (αντίρροπες) διαβαθμίσεις στις δυο εφαπτόμενες επιφάνειες ακρωτηριασμού, η μια κατά τον προσθιοπίσθιο (*anterior-posterior*) και η άλλη κατά το νωτοκοιλιακό (*dorsal-ventral*) άξονα ασυμμετρίας. Η ασυνέχεια αυτή ανάλογα με την περίπτωση, είναι δυνατόν να εμφανίζεται ως έλλειμμα (ή εκκένωση) των ενδιάμεσων τιμών μιας φυσικής ακολουθίας, της οποίας η συνοχή διακόπηκε από τον ακρωτηριασμό, ή να εκδηλώνεται ως αντιπαράβολή μεταξύ μη συνεχόμενων τιμών από δυο διακριτές ακολουθίες, για τις οποίες επιβλήθηκε μια αντικανονική γειτνίαση, όπως για παράδειγμα σε μια χειρουργική συγκόλληση επιφανειών ακρωτηριασμού από κολόβωμα και μόσχευμα. Το μοριακό υπόβαθρο αυτής της ασυνέχειας ή διένεξης των τοπικών πληροφοριών ανάγεται σε απώτερη ανάλυση, στις διαφορετικές προσκολλητικές ιδιότητες (*adhesiveness*) των διαφοροποιημένων και / ή των μη διαφοροποιημένων κυττάρων που εξαναγκάζονται να γειτνιάσουν κατά την αντικανονική επαφή των δυο αυτών επιφανειών. Σε μια παρόμοια θεώρηση πάντως συγκλίνει και η αιτιολόγηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που επάγεται σε ένα κολόβωμα, όπου δεν έχει προηγηθεί καμιά φανερή αναδιάταξη σε οποιονδήποτε από τους τρεις άξονες ασυμμετρίας και κατ' επέκταση δεν οριοθετείται κάποια πρόδηλη ανατομική θέση (σημείο ή επιφάνεια) όπου εντοπίζεται η αφετηρία οργάνωσης του αναγεννητικού βλαστήματος (Goode R.P., 1967) (*regenerative blastema*).



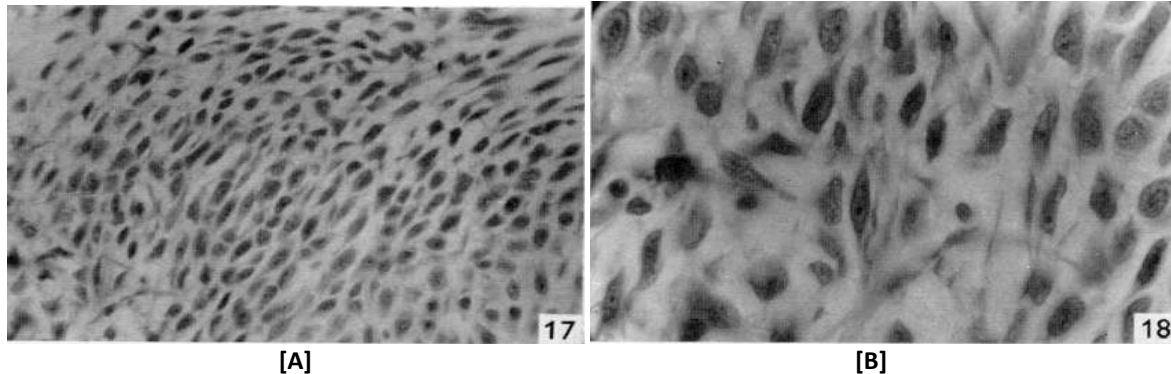
**Εικόνα VII.1.1.:** Απώτερο τμήμα αναγεννώμενου πρόσθιου άκρου από: **[A]** ενήλικο άτομο *Xenopus laevis*, 48 ημέρες μετά τον ακρωτηριασμό του και **[B]** από ενήλικο άτομο *Bombina bombina*, 56 ημέρες μετά τον ακρωτηριασμό του. Η συνάθροιση βλαστηματικών κυττάρων (*blastemal accumulation*) εντοπίζεται στη μεταβατική περιοχή που παρεμβάλλεται ανάμεσα στο ανοιχτόχρωμο αδιαμόρφωτο όριο του οστού και στο σκουρόχρωμο τραυματικό επιθήλιο, σε μια συνεχόμενη προέκταση των προχονδρικών κυττάρων της μεσεγχυματικής συμπύκνωσης, η οποία προπαρασκευάζει την επικείμενη αναγεννητική αποκατάσταση του καταλοίπου του οστού (b=βλαστηματικά κύτταρα, Χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης, Μεγέθυνση 100x).

## VII.2. Η συμβολή της διαβάθμισης του καθορισμού (“*determination gradient*”) για τους αδιαφοροποίητους φαινότυπους των βλαστηματικών κυττάρων, στη χάραξη σχεδίου (“*pattern formation*”)

Κατά την αναγέννηση ακρωτηριασμένων και / ή μεταμοσχευμένων άκρων στις προνύμφες αμφιβίων η *in vivo επανεγκατάσταση* και *επανεξειδίκευση* των πληροφοριών θέσης που αναδιοργανώνονται στα αναγεννώμενα μορφογενετικά πεδία, μεσολαβείται γενικά από τον αδιαφοροποίητο φαινότυπο που υιοθετούν τα βλαστηματικά κύτταρα (*blastemal cells*). Κατά αναλογία προς τη διαβάθμιση που διέπει οποιονδήποτε διαφοροποιημένο φαινότυπο, οι διαδικασίες της αποδιαφοροποίησης (*dedifferentiation*) και της υπερδιαφοροποίησης (*transdifferentiation*) που υπεισέρχονται στην παραγωγή και στην επέκταση (*population expansion*) των βλαστηματικών πληθυσμών, παράγουν ποικιλότητα στο εύρος (φάσμα ή συνδυασμό) των αδιαφοροποίητων χαρακτηριστικών, καθώς και διαβάθμιση στην πρωιμότητα / οψιμότητα (*temporal coefficient*) του καθορισμού (*determination*) τους. Υπό το πρίσμα λοιπόν της αναγκαιότητας για *επανεγκατάσταση* των πληροφοριών θέσης κατά τα πρωιμότερα αναγεννητικά στιγμιότυπα (φάση αποδιαφοροποίησης), η χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) αναδιοργανώνει την προϋπάρχουσα τοπογραφία τους στο γεωμετρικό επίπεδο της επιφάνειας ακρωτηριασμού–συγκόλλησης, σε συνάρτηση με τον πολλαπλασιασμό ενός μεικτού κυτταρικού πληθυσμού, στη φαινοτυπική σύνθεση του οποίου αρχικώς υπερτερούν αριθμητικά τα διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία αντιπροσωπεύουν μια «*οριζόντια μεταβίβαση* τοπικών αξιών (*positional values*)» και κατ’επέκταση μια συνεχή διαβάθμιση της τοπικής πληροφορίας. Αυτή η φάση επανεγκατάστασης πληροφοριών θέσης μέσω της κλιμάκωσης των κυτταροδιαιρέσεων διαφοροποιημένων φαινότυπων, τείνει να διατηρήσει τη **συνέχεια (continuity)** στη διαβάθμιση της τοπικής πληροφορίας. Αντιθέτως, στο βαθμό που η φάση αυτή θα επιστρατεύσει και θα κλιμακώσει την «*κάθετη μεταβίβαση* τοπικών αξιών (*positional values*)» μέσω της κλιμάκωσης των κυτταροδιαιρέσεων αδιαφοροποίητων φαινότυπων, θα επιφέρει **ασυνέχεια (discontinuity)** στη διαβάθμιση της τοπικής πληροφορίας. Από τη σκοπιά της *επανεξειδίκευσης* των πληροφοριών θέσης, μια τέτοια συνθήκη είναι επιρρεπής στην εγκαθίδρυση μιας αντιπαράθεσης των τοπικών πληροφοριών για τους άξονες ασυμμετρίας του αναγεννητικού μορφογενετικού πεδίου. Η έκβαση μιας τέτοιας τοπολογικής διένεξης κατά τα πρωιμότερα αναγεννητικά στιγμιότυπα (φάση αποδιαφοροποίησης), εικάζεται ότι επιβάλλει στη χάραξη σχεδίου να οργανώσει στο κολόβωμα μια καινοφανή –*de novo*– τοπογραφία πληροφοριών θέσης που εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό ενός μεικτού κυτταρικού πληθυσμού, στη φαινοτυπική σύνθεση του οποίου υπερτερούν αριθμητικά τα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Η επακόλουθη κλιμάκωση των κυτταροδιαιρέσεων τέτοιων φαινότυπων, με κυμαινόμενο βαθμό καθορισμού (*determination*) (ή με άλλα λόγια κυμαινόμενο βαθμό «οντογενετικής οπισθοδρόμησης»), προορίζεται να αμβλύνει την **ασυνέχεια (discontinuity)** στη διαβάθμιση της τοπικής πληροφορίας, με πιθανότερο αποτέλεσμα την αυτοοργάνωση περισσότερων από ένα, αναγεννητικών μορφογενετικών πεδίων και την παραγωγή ετερομορφικών αναγεννημάτων (*supernumerary regenerates*).

Ανεξάρτητα από την επίδραση της πληθυσμιακής αναλογίας αδιαφοροποίητων και διαφοροποιημένων κυττάρων στην κανονική (επιμορφική) και μη κανονική (ετερομορφική) έκβαση της αναγέννησης, ο μορφογενετικός αντίκτυπος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη χάραξη σχεδίου κατά τη διεύθυνση του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας, έγκειται στη διατάραξη (*distortion*) της καθεστικυίας τάξης πληροφοριών θέσης των διαφοροποιημένων φαινότυπων, από τον αναγκαίο τοπολογικό μετασχηματισμό που επιβάλλει η επικείμενη αφομοίωση της πληροφορίας θέσης την οποία εισηγείται ο αδιαφοροποίητος φαινότυπος. Με άλλα λόγια η ενδεχόμενη αντιπαράθεση τοπικών πληροφοριών κατά τη δευτερογενή ανάπτυξη, ισοδυναμεί με μια διένεξη μεταξύ φαινότυπων που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης (*differentiation*) ή διακριτά στάδια καθορισμού (*determination*), τα οποία όμως συνοψίζονται, είτε σποραδικά σε μεμονωμένα βλαστηματικά κύτταρα ή σε ολιγάριθμες ομάδες τους, είτε μεσολαβούνται συστηματικότερα και μαζικά από κυτταρικούς πληθυσμούς, των οποίων ο βαθμός χρονισμού (συγχρονισμού ή ετεροχρονισμού) για τον πολλαπλασιασμό και τη

διαφοροποίηση / καθορισμό, δεν απορρέει εξολοκλήρου από τον εκτεταμένο αυτοματισμό του οντογενετικού προγραμματισμού που δεσπόζει κατά την πρωτογενή ανάπτυξη. Γενικότερα, η όλη δυναμική διατήρησης / μεταβολής του καθεστώτος γειτνίασης (ή διεπαφής, *cell-cell contacts*) των αντιπαραβαλλόμενων κυττάρων, στο βαθμό που αντανακλά την τοπολογική μεταβλητή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*) και τη διακύμανσή της αναφορικά με ένα γενετικό πρότυπο (ή αρχέτυπο) ως συνάρτηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εικάζεται ότι αντιπροσωπεύει στο *in vivo* μορφογενετικό πεδίο την κρίσιμη τοπολογική παράμετρο που αλληλεπιδρά μορφογενετικά με τη χάραξη σχεδίου.



**Εικόνα VII.2.2.:** Λεπτομέρειες από τη συνάθροιση βλαστηματικών κυττάρων (*blastemal accumulation*) που παριστάνεται στην **[Εικ. VII.1.1]**: **[A]** διαφαίνεται μια υποτυπώδης στοίχιση των μεσεγχυματικών κυττάρων που απαρτίζουν το βλαστηματικό πληθυσμό, η οποία θεωρείται άρρηκτα συσχετισμένη με την ινοβλαστοειδή μορφολογία τους. Η *in vivo* ατρακτοειδής σχηματοποίηση που παρατηρείται συστηματικά στους βλαστηματικούς πληθυσμούς (*blastemal accumulations*) ποικίλης ειδοειδικής προέλευσης, εικάζεται ότι αντιπροσωπεύει τη μορφολογία μοναδιαίου κελιού που αντιστοιχεί σε κελωτή διάταξη με πρότυπο συνδεσιμότητας (*connectivity pattern*), διαφορετικό από εκείνο που διέπει τις προχονδρικές μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) (Μεγέθυνση 400x). **[B]** Η *in vitro* ατρακτοειδής σχηματοποίηση διαπιστώνεται τυποποιημένη σε υπερθετικό βαθμό στις συναθροίσεις των μεσεγχυματικών κυττάρων που απομονώνονται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (*UC-MSC aggregates*) και συνηγορεί ευμενώς υπέρ της εικαζόμενης συσχέτισης κυτταρικής σχηματοποίησης (*cell shape plasticity*) και διευθέτησης (*UC-MSC aggregation pattern plasticity*). Επίσης θεμελίωσε την «ακρογωνιαία υπόθεση εργασίας» που μέσω της θεωρίας των κελωτών δικτύων, επεξέτεινε τον παραλληλισμό μεταξύ της τοπολογίας των *in vivo* βλαστηματικών συναθροίσεων (*blastemal accumulations*) και της τοπολογίας των *in vitro* μεσεγχυματικών συναθροίσεων (*UC-MSC aggregates*), σε μια γενίκευση που συμπεριέλαβε και την *in vivo* τοπολογία των μεσεγχυματικών συμπυκνώσεων (*mesenchymal condensations*) (Μεγέθυνση 1000x).

### VII.3. Η συμβολή του διανυσματικού χαρακτήρα της «καθοδηγούμενης κυτταροδιαίρεσης» (“*oriented cytokinesis*”) στην αναπαραγωγή / διασπορά της τοπικής πληροφορίας κατά τη χάραξη σχεδίου (“*pattern formation*”) στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία

Οι τοπολογικές ιδιότητες των δυο επιφανειών ακρωτηριασμού, μοσχεύματος και κολοβώματος, είναι δυνατόν να παραμετροποιηθούν στο βαθμό που αντιπροσωπεύουν διαφορές στην εξειδίκευση των πληροφοριών θέσης που υπεισέρχονται στις μορφογενετικές αλληλεπιδράσεις. Τέτοιας μορφής τοπικές πληροφορίες είναι συνήθως τοπικά και / ή χρονικά κατανεμημένες στις επιμέρους διευθύνσεις που οριοθετούν κάθε διακριτό μορφογενετικό πεδίο, οι οποίες είτε είναι συγγραμμικές με τους τρεις εμβρυικούς άξονες ασυμμετρίας του, είτε εξαρτώνται από αυτούς σύμφωνα με κάποια συνάρτηση, στην οποία υπεισέρχεται οπωσδήποτε η τοπολογική μεταβλητή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*) των κυττάρων του πεδίου. Κατά ανάλογο τρόπο που κατά την πρωτογενή ανάπτυξη ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός οργανώνεται σε συνάρτηση με τους άξονες ασυμμετρίας του αναπτυσσόμενου εμβρύου, ενώ παράλληλα καταλήγει να τους τροποποιεί, η χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) κατά την αναγέννηση, αναδιατάσσει και επανεξειδικεύει τις τοπικές πληροφορίες που στοιχειοθετούν το μορφογενετικό πεδίο του αναγεννητικού βλαστήματος



(*regenerative blastema*) σε συνάρτηση με τους άξονες ασυμμετρίας του και σε εξάρτηση από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα τοπολογικά ισοδύναμα των επανατροφοδοτικών αυτών *in vivo* αλληλεπιδράσεων, θεωρήθηκαν στην παρούσα εργασία ότι αντιπροσωπεύονται και επεκτείνονται από τις αντίστοιχες μορφογόνες διεργασίες που υποβόσκουν στις *in vitro* συνθήκες των διδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών. Οι μορφοποιητικές αυτές συνιστώσες συγκλίνουν και αφομοιώνονται από τη μιτωτική μοριακή μηχανή (π.χ. προσανατολισμού της μιτωτικής ατράκτου, *mitotic spindle orientation*), εμπλουτίζοντάς την με την ιδιότητα της «διατεταγμένης κυτταροδιαίρεσης» η οποία αντιπροσωπεύει την *in vitro* εκδοχή της κυτοκίνησης-Β (*cytokinesis-B*) και εφοδιάζει το μεσεγχυματικό φαινότυπο με την παρατηρούμενη *in vitro* προσαρμοστική του πλαστικότητα, οι κυτταροβιολογικές συνιστώσες της οποίας συνοψίζονται στην κυτταρική σχηματοποίηση (*cell shape plasticity*), στη μεταναστευτικότητα (*motility*) και στη συναθροιστικότητα (*aggregation-ranking*).

Πιθανολογείται λοιπόν η εξάρτηση της τοπογραφικής διαβάθμισης των πληροφοριών θέσης (*positional information spatial gradient*) κατά τη διεύθυνση του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας, από μια «πολωμένη διεύθυνση» της μιτωτικής ατράκτου κατά την κυτταροδιαίρεση (*mitotic spindle orientation*). Η πληθυσμιακή επέκταση (*population expansion*) ενός οποιουδήποτε μορφογενετικού πεδίου, είτε στο *in vivo* αναγεννητικό βλάστημα, είτε στις *in vitro* συναθροίσεις των μεσεγχυματικών κυτταροκαλλιιεργειών, ευοδώνεται μέσω της διανυσματικής διεύθυνσης των θυγατρικών κυττάρων, η οποία αντανακλά το μορφογόνο ρόλο της «διατεταγμένης μίτωσης», με τη στατιστική έννοια που εστιάζεται σε ένα πληθυσμιακό κλάσμα ενός συνόλου γεγονότων κυτταροδιαίρεσης, που το αναγνωρίζει ως «υποσύνολο εκλεκτικά ασύμμετρων κυτταροκινήσεων». Επισημαίνεται ότι με αυτό τον όρο αυτό δεν υποδηλώνεται η συστηματικά προσανατολισμένη διευθυνσιοδότηση της μίτωσης (***mitosis orientation***) που εξαρτάται από οποιοδήποτε χημειοτακτικό ερέθισμα. Η διανυσματική διεύθυνση των μιτωτικών προϊόντων υποδηλώνει έναν περιορισμό -τοπολογικής αιτιολογίας- των βαθμών ελευθερίας που υπεισέρχονται σε μια οποιαδήποτε τυχαία διευθυνσιοδότηση της κυτταροδιαίρεσης, με συνέπεια οι συχνότητες (ή πιθανότητες) των μίτωσης που συμπαρατάσσουν οριστικά και τα δυο θυγατρικά κύτταρα στην ίδια (π.χ. στην *proximal-distal*) διεύθυνση-φορέα, να υπερτερούν έναντι οποιωνδήποτε άλλων.

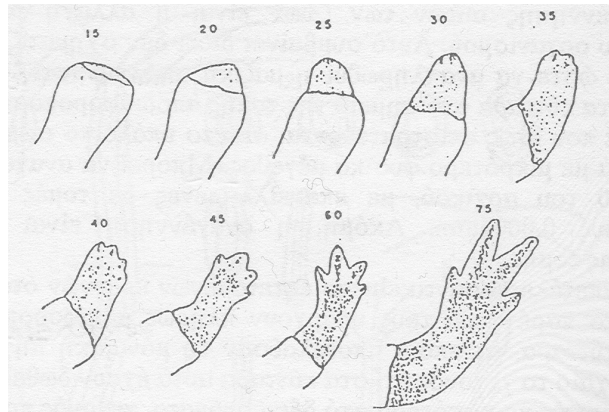
Η χρηστική αξία της στατιστικής αυτής θεώρησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που συνοδεύει τη χάραξη σχεδίου σε ένα αναπτυσσόμενο μορφογενετικό πεδίο, έγκειται στη συσχέτιση της μορφογένεσης με την τοπολογική μεταβλητή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*) των κυττάρων του πεδίου, προκειμένου να εξηγηθεί -για παράδειγμα- ο «κανόνας του ακραίου μετασχηματισμού» (*distal transformation rule*):

1] έτσι, αφενός οι συχνότητες των μίτωσης κατά τη διεύθυνση του εγγύς-μακράν (π.χ. *proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας στο αναγεννητικό βλάστημα είναι οι περισσότερες (εκλεκτική διευθυνσιοδότηση της μίτωσης κατά τον εγγύς-μακράν άξονα),

2] αφετέρου οι συχνότητες των μίτωσης που κατανέμονται αμφίδρομα, δηλαδή και προς τις δυο κατευθύνσεις του εγγύς-μακράν άξονα (μη πολωμένη διευθυνσιοδότηση μίτωσης κατά τον εγγύς-μακράν άξονα), είναι ισότιμες με την έννοια ότι είναι ίσες οι κυτταροδιαίρεσεις που συναθροίζουν κύτταρα προς εγγύτερη (*proximal*) και προς απώτερη-μακράν (*distal*) κατεύθυνση, αποκλειστικά και μόνο στις πρωιμότερες κυτταροδιαίρεσεις. Αρχικά, συσσωρεύονται αδιαφοροποίητα κύτταρα σε μια (μεσεγχυματική) συνάθροιση που διευρύνεται *διατεταγμένα* χωρίς όμως παραλλήλως να πολώνεται η επέκτασή της προς κάποια «προτιμητέα ή ευνοϊκή» φορά. Από τη σκοπιά των αντίστοιχων πληροφοριών θέσης που εξαρτώνται από τέτοιες (μη πολωμένες, *non-oriented mitoses*) μίτωσης, συμπεραίνεται ότι και οι δυο διαφορετικές «όψεις-πόλοι» της διεύθυνσης επέκτασης στον εγγύς-μακράν άξονα είναι εντελώς ισότιμες χωρίς να αντιπροσωπεύουν οπωσδήποτε αντιδιαμετρικά ή αντίθετα «μέτωπα πολλαπλασιασμού», με τη μία «όψη-πόλο» να

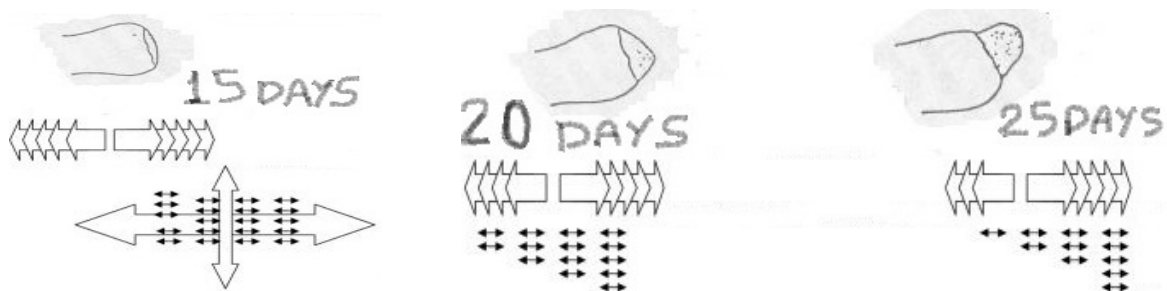
ευοδώνεται προς μικρότερες ανατομικές αποστάσεις (άρα προς εγγύτερη *-proximal-* πληροφορία θέσης) από την θέση έκφυσης του κολοβώματος και την άλλη «όψη-πόλο» να ευοδώνεται προς μεγαλύτερες ανατομικές αποστάσεις (άρα προς απώτερη *-distal-* πληροφορία θέσης). από την ίδια θέση έκφυσης στον κορμό του σώματος. Επισημαίνεται ότι το δεδομένο σημείο αναφοράς για το αναγεννώμενο άκρο (π.χ. αν θα είναι η θέση έκφυσης του κολοβώματος από τον κορμό ή αν θα είναι η θέση έκφυσης του βλαστήματος από την επιφάνεια ακρωτηριασμού) είναι αυθαίρετο και υποδηλώνει ένα ανατομικό ορόσημο για την ποσοτική αξιολόγηση του βαθμού καθορισμού / διαφοροποίησης των βλαστηματικών κυττάρων, συναρτήσει των ανατομικών συντεταγμένων που αντιπροσωπεύουν κατά μήκος του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας στο αναγεννητικό βλάστημα.

Κατά τη «σύμμετρη ή σύμμορφη διαστολή» της εγγύς-μακράν διάστασης, τα πιο παρωχημένα –γενεαλογικώς– θυγατρικά κύτταρα (τα λιγότερο πρόσφατα, τα «γρηραιότερα βλαστηματικά») θα αποκλίνουν τοπογραφικώς ολοένα και περισσότερο, καθώς η μεταξύ τους αρχική απόσταση θα καταλαμβάνεται βαθμιδόν από τα πιο πρόσφατα –γενεαλογικώς– θυγατρικά κύτταρα (τα «νεαρότερα βλαστηματικά»), τα οποία εξάλλου προορίζονται να συμπληρώσουν το χάσμα ασυνέχειας της πληροφορίας θέσης στον εγγύς-μακράν άξονα του αναγεννώμενου πεδίου, σε μεταγενέστερη φάση μέσω της (επανα)διαφοροποίησής τους. Η σταδιακή κλιμάκωση των διαστάσεων του αναγεννητικού βλαστήματος με την ευόδωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, συσσωρεύει συστηματικά μεγαλύτερη ετερογένεια στη φαινοτυπική σύνθεση του βλαστηματικού πληθυσμού, επειδή συσσωρεύει ετερογένεια στο βαθμό καθορισμού τους (*determination*). Στο βαθμό λοιπόν που παύουν να είναι αμελητέες οι διαστάσεις του αναγεννητικού βλαστήματος κατά τον εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) **[P-D]** άξονα ασυμμετρίας, η *συνάθροιση* (*aggregation, recruitment*) των βλαστηματικών κυττάρων συμπορεύεται παράλληλα και σε συνάρτηση με τη διεργασία του καθορισμού τους (*determination*) και / ή της (επανα)διαφοροποίησής τους (*differentiation*), εξαιτίας της τοπολογικής διαβάθμισης του **[P-D]** άξονα που απορρέει από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο αντίκτυπος της γεωμετρικής αυτής συνθήκης **[P-D]** στοίχισης (**[P-D]** *ranking, aggregation*) των θυγατρικών κυττάρων, για τις συχνότητες των μιτώσεων υιοθετεί τον εικαζόμενο μορφογενετικό χαρακτήρα σταδιακά, στο βαθμό που η **[P-D]** παράταξη των μιτωτικών προϊόντων καθίσταται ικανή και αναγκαία συνθήκη για τη μεταβολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού, καθώς και της κατεύθυνσης προαγωγής του, σε συνάρτηση με την κλιμάκωση του πληθυσμιακού μεγέθους των μεσεγχυματικών κυττάρων κατά μήκος του **[P-D]** άξονα ασυμμετρίας. Αυτή η πληθυσμιακή εξάρτηση προσδίδει στην εγγενή τοπολογική διαβάθμιση κατά μήκος του **[P-D]** άξονα, τη φυσική (βιολογική) υπόστασή της επεδείκνυται καταμερίζει την γεωμετρική κλίμακα των αποστάσεων του άξονα σε κύτταρα διασυνδεδεμένα μεταξύ τους σύμφωνα με ένα πρότυπο διακυτταρικής επαφής, που αντιστοιχεί στην τοπολογική μεταβλητή της *συνδεσιμότητας* (*connectivity*). Η διατήρηση ή μεταβολή του προτύπου διακυτταρικής επαφής μεσολαβείται από το χρονισμό του πολλαπλασιασμού με τη φάση (επανα)διαφοροποίησης (*differentiation*), η οποία όμως έπεται κανονικά της φάσης καθορισμού (*determination*) των βλαστηματικών φαινότυπων. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η συμβολή του βαθμού καθορισμού (*“determination gradient”*) των αδιαφοροποίητων φαινότυπων που παράγει η αποδιαφοροποίηση (*dedifferentiation*), στη μορφογένεση του αναγεννώμενου βλαστήματος μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση της χάραξης σχεδίου με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στο βαθμό που διατηρεί σταθερό ή μεταβάλλει το ρυθμό και / ή την κατεύθυνση προαγωγής του.



**Εικόνα VII.3.3.:** Στη σχηματική αναπαράσταση συνοψίζονται τα ορόσημα στάδια της αναγέννησης του δεξιού πρόσθιου άκρου σαλαμάνδρας, σε αριθμούς οι οποίοι αναπαριστούν τις ημέρες μετά τον ακρωτηριασμό του. Στο χρονογραφικό αυτό σχήμα επισημαίνεται ότι σε όλα τα επιμέρους στιγμιότυπα, δε μεταβάλλεται η ανατομική απόσταση της επιφάνειας ακρωτηριασμού από οποιοδήποτε σημείο αναφοράς στο κολόβωμα, π.χ. από την θέση έκφυσης του κολοβώματος στην ωμική ή στην πυελική ζώνη του κορμού του ζώου. Στη σχηματική αυτή απεικόνιση, απλώς συνοψίζεται η συμβολή του μεταβλητού ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην αναπλήρωση της ελλείπουσας μάζας, σύμφωνα με τον τοπογραφικό «κανόνα του ακραίου μετασχηματισμού» (*distal transformation rule*). Αν παρατάσσονταν τα αντίστοιχα στιγμιότυπα μιας διαφορετικής ακολουθίας, με σκοπό να απεικονίσουν τον αντίκτυπο της μεταβολής (π.χ. της ελάττωσης) στην απόσταση της επιφάνειας ακρωτηριασμού από το ίδιο σημείο αναφοράς στο κολόβωμα (δηλαδή από την θέση έκφυσής του), τότε οι αριθμοί αυτοί, δεν επρόκειτο να αλλάζουν, επειδή ο χρόνος που απαιτείται για την αναγέννηση του άκρου είναι ανεξάρτητος από τη μάζα που απομακρύνθηκε, υποδηλώνοντας ότι ο κυμαινόμενος ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που επάγεται από τον ακρωτηριασμό, εξαρτάται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταβλητών (Goss, 1969 Principles of Regeneration).

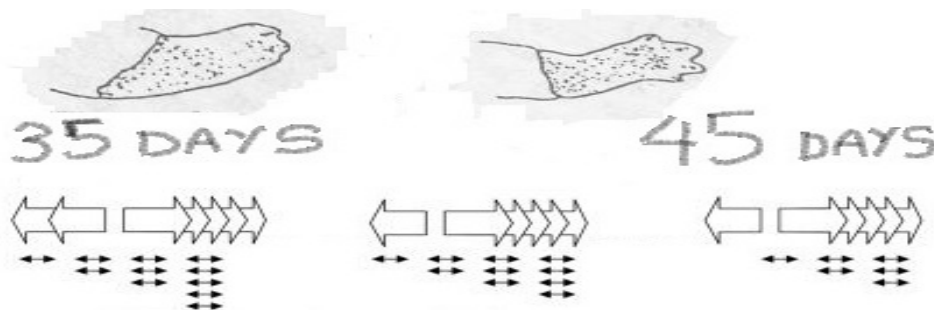
Σε αντιπαραβολή προς το προηγούμενο, στα επόμενα διαγράμματα απεικονίζεται σχηματικά ο τοπογραφικός αντίκτυπος του μεταβλητού ρυθμού για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό:



**Εικόνα VII.3.4.:** Με τα μικρά διπλά βέλη απεικονίζεται μόνο το κλάσμα των μιτώσεων που αφενός παρατάσσουν και τα δυο θυγατρικά κύτταρα σε διεύθυνση, παράλληλη με οποιονδήποτε φορέα του εγγύς-μακράν άξονα ασυμμετρίας και αφετέρου κληροδοτούν ισότιμο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και στα δυο μιτωτικά προϊόντα.

Δεδομένου του μορφογενετικού ενδιαφέροντος τέτοιων μαζικών μιτώσεων και λόγω του υψηλού βαθμού συγχρονισμού τους στα πρώιμα αναγεννητικά στάδια, η (μεσεγχυματική) συνάθροιση όλων αυτών των θυγατρικών κυττάρων κατανέμεται εκατέρωθεν ενός κοινού επιπέδου συμμετρίας, τοποθετημένου αρχικώς στην επιφάνεια ακρωτηριασμού. Οι δυο υποπληθυσμοί που καταλαμβάνουν τη μια και την άλλη όψη αυτής της νοητής εγκάρσιας διατομής του εγγύς-μακράν άξονα ασυμμετρίας, αντιπροσωπεύουν γεωμετρικώς τα δυο θυγατρικά κύτταρα της πρώτης από αυτές τις μιτώσεις. Ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός αυτών των υποπληθυσμών μέσω της εκλεκτικής

(«διανυσματικής») μίτωσης (*oriented cytokinesis*) κατακερματίζει το αρχικό (αρχέτυπο) επίπεδο συμμετρίας και παράγει αντίγραφά του, τα οποία στο βαθμό που κατανέμονται συμμετρικά ως προς το πρώτο (αρχέτυπο), δεν υποκαθιστούν τον αρχικό του ρόλο ως ενιαίου μετώπου πολλαπλασιασμού για το αναγεννώμενο μορφογενετικό πεδίο. Κατά συνέπεια όσο κλιμακώνονται οι μιτώσεις, οι δυο όψεις του αποκλίνουν σταδιακά, αντιπροσωπεύοντας αντίστοιχα ξεχωριστά «μέτωπα πολλαπλασιασμού». Τα πρωιμότερα (συμπεριλαμβανομένου του πρωταρχικού) επιμέρους αυτά «υπομέτωπα πολλαπλασιασμού» διαφέρουν μόνο στην σχετική απόσταση από τη θέση έκφυσης του κολοβώματος (σημείο αναφοράς) ενώ η διαφορά στο πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό, θεωρείται αμελητέα. Το αρχικό επίπεδο συμμετρίας, εκατέρωθεν του οποίου εξακολουθούν να αποκλίνουν, έχει υιοθετήσει πλέον εντελώς γεωμετρικό χαρακτήρα και συμπίπτει με εκείνο της επιφάνειας ακρωτηριασμού. Αν ήταν εφικτός ο υπολογισμός ενός «κέντρου βάρους» για τον αδιαφοροποίητο πληθυσμό των θυγατρικών κυττάρων (*blastemal cells*), θα καταλάμβανε το γεωμετρικό κέντρο της επιφάνειας ακρωτηριασμού, επειδή οι πρωιμότερες μιτώσεις εξακολουθούν να είναι μαζικές και σχεδόν συγχρονισμένες, μέχρι να ξεκινήσει η χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) στη συσσωρευμένη μεσεγχυματική συνάθροιση (*mesenchymal condensation*), στο αναγεννητικό βλάστημα που απεικονίζεται διαγραμματικά στην εικόνα [Εικ. II.5.36.].

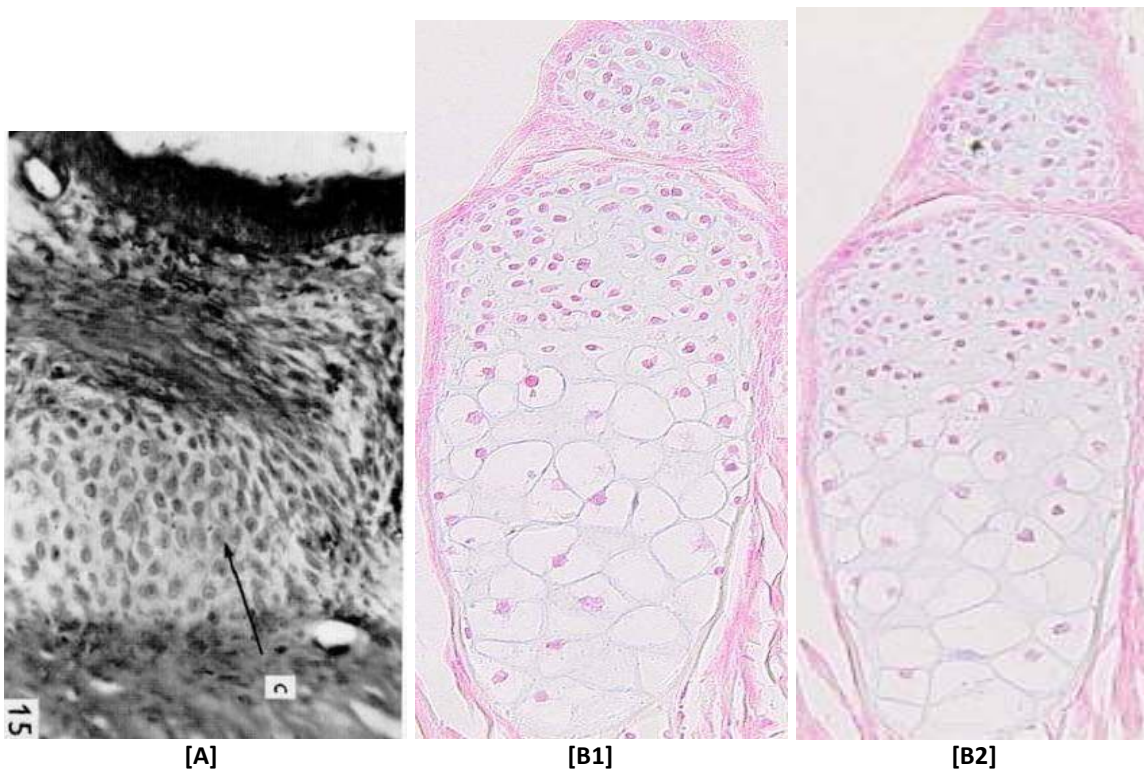


**Εικόνα VII.3.5.:** Καθώς οι κυτταροδιαιρέσεις γίνονται ολοένα και πιο ασύγχρονες, η συχνότητα των μιτώσεων που παράγουν θυγατρικά κύτταρα με ισότιμο πολλαπλασιαστικό δυναμικό ελαττώνεται σε συνάρτηση με το χρόνο, με αποτέλεσμα την αποτύπωση μιας τοπογραφικώς πολωμένης και διαβαθμισμένης κατανομής των πιο πρόσφατων θυγατρικών κυττάρων, επειδή μόνο το πιο «μακράν» (*distal*) από τα δυο μιτωτικά προϊόντα κάθε κυτοκίνησης υπερτερεί ως προς το πολλαπλασιαστικό του δυναμικό, έναντι του άλλου.

Η συχνότητα των μιτώσεων που συναθροίζουν βλαστηματικά κύτταρα προς εγγύτερες (*proximal*) θέσεις σταδιακά μειώνεται, επειδή ελαττώνεται το πληθυσμιακό κλάσμα των πρωιμότερων φαινότυπων (καθώς ο βαθμός του καθορισμού των αποδιαφοροποιημένων φαινότυπων γίνεται ολοένα πιο πρόσφατος κατά την οντογενετική χρονική κλίμακα). Ο εύλογος μηχανισμός που δικαιολογεί αυτή τη μεταβολή είναι η έναρξη της διαφοροποίησης των πρωιμότερων φαινότυπων, είτε παράλληλα με τη συνάθρυσή τους, είτε σε μεταγενέστερη φάση. Τα «στατιστικά ισοδύναμα» των αρχικών δυο μετώπων πολλαπλασιασμού, διαφέρουν και στην σχετική απόσταση από τη θέση έκφυσης του κολοβώματος και στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, ενώ το αρχικό γεωμετρικό επίπεδο συμμετρίας τους έχει υποκατασταθεί από ένα «στατιστικό κέντρο βάρους» των πιο πρόσφατων βλαστηματικών κυττάρων, το οποίο έχει μετατοπιστεί στη διεύθυνση του εγγύς-μακράν άξονα ασυμμετρίας προς περισσότερο «μακράν» (*distal*) εγκάρσιες διατομές του.

**VII.4. Η συμβολή του διανυσματικού χαρακτήρα της «καθοδηγούμενης κυτταροδιαίρεσης» (*“oriented cytokinesis”*) στην επαναδιαφοροποίηση / επανεξειδίκευση της τοπικής πληροφορίας κατά τη χάραξη σχεδίου στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία**

Στα οψιμότερα στάδια οργάνωσης του αναγεννητικού βλαστήματος η έναρξη της (επανα)διαφοροποίησης των βλαστηματικών κυττάρων ξεκινά πριν την κατάπαυση της φάσης εντατικού πολλαπλασιασμού που τροφοδοτεί το απόθεμα των αδιαφοροποίητων φαινότυπων και ενδεχόμενα ξεκινά σε εξάρτηση από την αποδιαφοροποίηση, διαμεσολαβώντας μια αρνητικά επανατροφοδοτούμενη διαδικασία «αποπεράτωσης» ή αναστολής της (*“feedback inhibition”*). Η μερική χρονική επικάλυψη (ή *χρονισμός*) των επιμέρους αναγεννητικών διεργασιών, επιτρέπει την επιτόπια *-in situ-* αλληλεπίδραση μεταξύ αποδιαφοροποίησης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού και (επανα)διαφοροποίησης, υπό την εκδοχή μιας εύτακτης και εύρρυθμης «μορφογενετικής σκυταλοδρομίας»... Στο πλαίσιο μιας φυσιολογικής ειδοειδικής δευτερογενούς ανάπτυξης (όπως κανονικά ισχύει για τα πρωιμότερα στάδια της μεταμόρφωσης των προνυμφών άνιουρων αμφιβίων και για όλα τα στάδια της μεταμόρφωσης των προνυμφών ουροδελών αμφιβίων), τα βλαστηματικά κύτταρα κατά την επικείμενη (επανα)διαφοροποίησή τους πρόκειται να επανεξειδικεύσουν τις αντίστοιχες πληροφορίες θέσης που ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναπαρήγαγε (ή επανεγκατέστησε) και διέσπειρε κατά μήκος του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας στο αναγεννητικό βλάστημα. Πιθανώς η τερατογόνος επίδραση των εξωγενών ρετινοειδών να σχετίζεται με μια αντικανονική παράταση της περιόδου αλληλεπίδρασης μεταξύ των τριών αυτών αναπτυξιακών μηχανισμών (αποδιαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού και (επανα)διαφοροποίησης). Στην υπόθεση αυτή συνηγορούν τα ιστοχημικά παρασκευάσματα από αναγεννώμενα άκρα προνυμφών άνιουρων αμφιβίων που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία και αποκαλύπτουν ότι τουλάχιστον στις θέσεις που οριοθετούν τις επικείμενες αρθρώσεις μεταξύ των φαλλάγγων των δακτύλων (*interdigital joints*), είναι συστηματική η συμπαρουσία μορφολογιών που αντιπροσωπεύουν στην ίδια ιστολογική τομή, όλη την κλίμακα κυτταρικής σχηματοποίησης για τον *in vivo* προχονδρικό μεσεγχυματικό φαινότυπο [Εικ. II.5.43].



**Εικόνα VII.4.6.:** Λεπτομέρειες από τη συνάθροιση μεσεγχυματικών κυττάρων (*mesenchymal accumulations*) στις προχονδρικές μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) αναγεννώμενων άκρων: [A] ατόμων του είδους *Discoglossus pictus* και [B1, B2] ατόμων του είδους *Rana temporaria* (Μεγέθυνση 400x).

Η χρήση ενός υποθετικού «**αντιπαραδείγματος**» (μέσω της συλλογιστικής της «εις άτοπον απαγωγής») θα αποσαφηνίζε την ειδοποιό διαφορά της *συνιστώσας του πολλαπλασιασμού* που είναι τοπικά και χρονικά περιορισμένος και «εισαγάγει / παράγει» αδιαφοροποιήτους φαινότυπους μέσω μιας διεργασίας τύπου «όλα ή τίποτα», από τη *συνιστώσα της αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation)* που είναι επίσης τοπικά και χρονικά περιορισμένη, αλλά προσδίδει στους αδιαφοροποιήτους φαινότυπους μια ποσοτική διακύμανση (ή «διαβάθμιση καθορισμού»), μέσω μιας διεργασίας που καθορίζει «πόσο νεαρότερος ή πόσο γηραιότερος» θα προκύψει ο μεμονωμένος βλαστηματικός φαινότυπος, καθορίζοντας για καθένα από τα κύτταρα του βλαστηματικού πληθυσμού μια αντίστοιχη τιμή για το *βαθμό του οντογενετικού καθορισμού του (blastemal phenotype determination gradient)*:

α) Αν λοιπόν υποθεθεί ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στο αναγεννητικό βλάστημα από άκρο προνύμφης αμφιβίου, είχε ξεκινήσει πλήρως συγχρονισμένα και σε επόμενο στάδιο αναστέλλονταν εξίσου μαζικά, εκμηδενίζοντας το ενδεχόμενο χρονικής επικάλυψης με την επικείμενη (επανα-)διαφοροποίηση, τότε η οποιαδήποτε ποικιλότητα στο βαθμό καθορισμού των αδιαφοροποιήτων φαινότυπων είναι θα ήταν εύλογο να αποδοθεί αποκλειστικά στη διεργασία της αποδιαφοροποίησης (*dedifferentiation*).

Από την άλλη όμως αν ίσχυε η εναλλακτική εκδοχή, ώστε η ετερογένεια στο βαθμό καθορισμού των αδιαφοροποιήτων φαινότυπων να μην εμπλουτιζόταν από καμιά εκδοχή συνιστώσας αποδιαφοροποίησης κατά τον εντατικό πολλαπλασιασμό, τότε η προοπτική της ιστοειδικής ποικιλοποίησης για τον ομοιογενή βλαστηματικό πληθυσμό που παρήχθη από το απόθεμα των προϋπαρχόντων γεναρικών κυττάρων, θα εξαρτώνταν εξ'ολοκλήρου από τη μαζική έναρξη της (επανα-)διαφοροποίησης, ταυτόχρονα για όλα τα βλαστηματικά κύτταρα με τον *ίδιο βαθμό οντογενετικού καθορισμού (ή αδιαφοροποίητου ιστοειδικού φαινότυπου)*. Με άλλα λόγια αδιαφοροποίητοι φαινότυποι με κοινό βαθμό (προγενέστερου) καθορισμού (έστω για παράδειγμα «ισότιμο» του σταδίου του «ουραίου φύτρου») και εφοδιασμένοι με την προοπτική της διαφοροποίησης προς τις επικείμενες (διαφορετικές) ιστοειδικές ταυτότητες (*“prospective fates”*), επρόκειτο να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους οντογενετικά, για μια «αυτόνομη» παραγωγή της απωλεσθείσας ανατομικής δομής, χωρίς αναπτυξιακή εξάρτηση από το προϋπάρχον κυτταρικό και μη, περιβάλλον του οργανισμού (π.χ. από την ενδοκρινολογική του κατάσταση, κλπ), μια συνθήκη που ωστόσο δεν επιβεβαιώνεται ούτε καν στην τάξη των ουροδελών αμφιβίων που χαρακτηρίζονται από αναγεννητική αυτοτέλεια υπερθετικού βαθμού (Kamel A. et al., 1975; Kanamori A. and Brown D.D., 1992; Pecorino L.T. et al., 1994, 1996; Jiang H. et al., 1994; Kirimoto A. et al., 2005; Kochhar D.M. et al., 1998).

Αντίθετα όμως από μια τέτοια αυτοτελή έκβαση της αναγέννησης, όλες οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν την εξάρτηση της δευτερογενούς ανάπτυξης από την οντογενετική κατάσταση του οργανισμού σε όλα τα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης. Με άλλα λόγια αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη, η δυνατότητα παραγωγής και διασποράς φαινοτυπικής ετερογένειας μεταξύ των αδιαφοροποιήτων κυττάρων του αναγεννητικού βλαστού. Είναι τεκμηριωμένη η συμβολή των διαφοροποιημένων κυττάρων από τους (προϋπάρχοντες) παρακείμενους ιστούς, στην τροφοδότηση αυτής της αδιαφοροποίητης φαινοτυπικής ποικιλότητας, μέσω της αποδιαφοροποίησης. Επιπλέον, δεδομένου ότι η χάραξη σχεδίου (*pattern formation*) προηγείται της διαφοροποίησης, εικάζεται ότι υπεισέρχεται μια μορφογενετική συνιστώσα στον εντατικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό, για την εγκατάσταση τοπογραφικής ανομοιογένειας κατά μήκος του εγγύς-μακράν άξονα ασυμμετρίας του μορφογενετικού πεδίου (κατά αναλογία με τον αντίκτυπο του διαφορικού ρυθμού των αυλακώσεων στην αντιδιαμετρική παράταξη των ζωικών και των φυτικών βλαστομεριδίων). Στο αναγεννητικό βλάστημα (*regenerate*) πολύ πριν την έναρξη της (επανα-)διαφοροποίησης, η εγγύς-μακράν κατανομή των αδιαφοροποιήτων φαινότυπων καθίσταται ετερογενής ως προς το *βαθμό απόκλισης από την κατάσταση τερματικής διαφοροποίησης*, ήδη από την έναρξη του πολλαπλασιασμού και καθόλη τη διάρκεια συνάθροισης μη διαφοροποιημένων φαινότυπων, εξαιτίας της τοπογραφικής ετερογένειας με την οποία συμπληρώνει το βλαστηματικό πληθυσμό, η «διατεταγμένη αλληλεπίδραση» πολλαπλασιασμού και αποδιαφοροποίησης. Ο αντίκτυπος του

«μορφογενετικού ανισοτροπισμού» τον οποίο υιοθετεί ο πολλαπλασιασμός που συνοδεύει τη χάραξη σχεδίου, έγκειται στη διαμόρφωση μιας **«πολωμένα διατεταγμένης ηλικιακής κατανομής»** των αδιαφοροποίητων φαινότυπων («ηλικιακή ετερογένεια») κατά μήκος του εγγύς-μακράν άξονα ασυμμετρίας του αναγεννητικού βλαστήματος (Goode R.P., 1967; Maden M. et al., 2003).

β] Αν ήταν εφικτό οι κυτταροδιαιρέσεις να ήταν όλες ομοεπίπεδες και να παρέτασσαν όλα τα θυγατρικά κύτταρα στο (ίδιο) γεωμετρικό επίπεδο της επιφάνειας ακρωτηριασμού και επιπλέον αν ήταν δυνατόν σε μεταγενέστερο αναγεννητικό στιγμιότυπο όλα τα αδιαφοροποίητα κύτταρα με τον ίδιο ιστοειδικό αδιαφοροποίητο φαινότυπο και όμοια **«πολωμένη διατεταγμένη ηλικιακή κατανομή»** να μετανάστευαν μαζί και να ανακατανέμονταν ανάμεσα στα προϋπάρχοντα διαφοροποιημένα κύτταρα του κολοβώματος, σε μη-τυχαίες θέσεις, χωρίς καταστροφή της προηγούμενης κυτταροβριθούς στοίχισης ως προς την εγκάρσια διατομή του εγγύς-μακράν άξονα ασυμμετρίας, τότε η επαναπροσανατολισμένη κατά **90°** ομοεπίπεδη αυτή κατανομή των αδιαφοροποίητων φαινότυπων θα μετασχηματιζόταν γεωμετρικώς στην επιμηκυσμένη μεσεγχυματική συμπύκνωση (*regenerative mesenchymal condensation*) με την απαιτούμενη «τοπογραφική ετερογένεια», την επιδεκτική για διαφοροποίηση κατά μήκος του εγγύς-μακράν (*proximal-distal*) άξονα ασυμμετρίας στο αναπτυσσόμενο αναγεννητικό βλάστημα.

Κάθε ξεχωριστή εκδοχή είναι διατυπωμένη έτσι ώστε να προσδίδει στην αντίστοιχη μεμονωμένη βιολογική διαδικασία που μονοπωλεί, τις κατάλληλες υποθετικές ιδιότητες που θα αναπλήρωναν-αντιστάθμιζαν την απουσία της άλλης διεργασίας, δεδομένης όμως της δέσμευσης για εκπλήρωση της σκοπούμενης συνθήκης του συγχρονισμού στην έναρξη της (επανα)διαφοροποίησης όλων των βλαστηματικών κυττάρων. Από τον κατάλληλο συνδυασμό των δυο υποθετικών εκδοχών που αντιπροσώπευαν τα αντιπαραδείγματα, προκύπτει η ρεαλιστικότερη εκδοχή του χρονισμού (μερικής χρονικής αλληλεπικάλυψης) μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αποδιαφοροποίησης, η οποία εισηγείται μια αλληλοσυμπληρωματική συνεισφορά στον τοπικό και χρονικό καθορισμό της χάραξης σχεδίου για παραγωγή σύνθετου μοτίβου διαφοροποίησης, καταργώντας την ανάγκη εικασίας εξεζητημένων ιδιοτήτων για καθεμιά διεργασία ξεχωριστά.

#### **VII.5. Η συμβολή της τοπολογίας στην αναπαραγωγή και επανεξειδίκευση της τοπικής πληροφορίας κατά τη χάραξη σχεδίου (*"pattern formation"*) στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία**

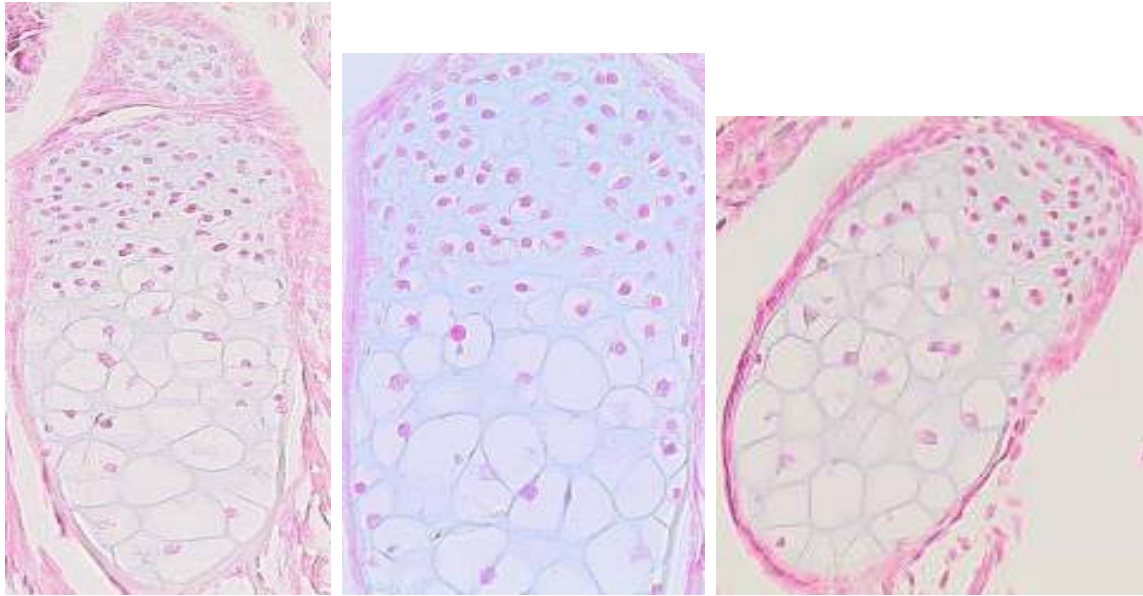
Συνοψίζοντας για τη δευτερογενή ανάπτυξη άκρων από προνύμφες άνιουρων αμφιβίων, η αντιπαράθεση τοπικών πληροφοριών που επάγει μορφογένεση μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αποδιαφοροποίησης, εικάζεται ότι συμμορφώνεται με το ευρύτερο θεωρητικό υπόβαθρο του «κανόνα του ακραίου μετασχηματισμού» (*"Distal Transformation Rule"*) και ανάγεται σε απώτερη ανάλυση σε μια διένεξη στο «καθεστώς γειτνίασης» των μη διαφοροποιημένων φαινότυπων των βλαστηματικών κυττάρων και η οποία:

1] αφενός απορρέει από την αντικανονική συμπαράταξη των προϋπαρχόντων διαφοροποιημένων κυττάρων του παρακείμενου ανατομικού περιβάλλοντος, με τα βλαστηματικά που εφοδιάζονται με τις επιμέρους τιμές μιας ολόκληρης διαβάθμισης από διαθέσιμους αδιαφοροποίητους φαινότυπους, είτε εξαιτίας του ειδοειδικού μορφογενετικού αντίκτυπου των ακρωτηριασμών και / ή των μεταμοσχεύσεων, είτε λόγω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και / ή της κυτταρικής μετανάστευσης που πλασιώνουν τη συγκρότηση του τραυματικού επιθηλίου (*wound epithelium*, [WE]) κατά την έναρξη της αναγέννησης και

2] αφετέρου κλιμακώνεται ως αποτέλεσμα της αντικανονικής συνάθροισης αδιαφοροποίητων κυττάρων σε ετερογενή πληθυσμό που συμπληρώνει όλη την κλίμακα των μεταβατικών φαινοτυπικών διαβαθμίσεων του καθορισμού (*determination*). Η ειδοειδική αυτή



δυνατότητα συνύπαρξης και αλληλεπίδρασης στο βλαστηματικό πληθυσμό, μεταξύ φαινότυπων που καλύπτουν ένα τόσο ευρύ φάσμα γενεών από την οντογενετική διαδοχή των αμφιβίων, επιστρατεύει (*recruitment*) μέσω της αποδιαφοροποίησης στον ένα πόλο της κλίμακας του καθορισμού, τους «παρωχημένους φαινότυπους» που μεσολαβούν τον πρωιμότερο καθορισμό, για την εξειδίκευση εγγύτερων (*proximal*) πληροφοριών θέσης και στον άλλο πόλο της κλίμακας του καθορισμού, αντιπαραθέτει τους «πρόσφατους φαινότυπους» που αντιπροσωπεύουν τον οψιμότερο καθορισμό, για την εξειδίκευση απώτερων (*distal*) πληροφοριών θέσης.



**Εικόνα VII.5.7.:** Λεπτομέρειες από τη συνάθροιση μεσεγχυματικών κυττάρων (*mesenchymal accumulations*) στις προχονδρικές μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) αναγεννώμενων άκρων ατόμων του είδους *Rana temporaria*. Με τη χρώση Domagk στα παρασκευάσματα ο (υαλώδης) χόνδρος εμφανίζεται γαλάζιος, τα χονδροκύτταρα εμφανίζονται ροζ μέσα στα χόνδρινα έλυτρα, ενώ ο μυς βάφεται καφεκόκκινος (Μεγέθυνση 400x).

Η φυσική γειτνίαση των δυο διακριτών μεσεγχυματικών πληθυσμών στο *in vivo* ανατομικό περιβάλλον του αναγεννητικού βλαστήματος των πειραματοζώων (*regenerating blastema*) εγείρει σωρεία ερωτημάτων για τη θεώρηση μιας ενιαίας τοπολογίας, η οποία εικάζεται ότι διέπει την πλαστικότητα της *in vivo* κυτταρικής σχηματοποίησης (*cell shape plasticity*) σε αλληλεξάρτηση προς την πλαστικότητα του προτύπου της *in vivo* κυτταρικής συνάθροισης (*aggregation pattern plasticity*) ([Εικ. VII.1.1.], [Εικ. VII.2.2.]). Προτείνεται λοιπόν ότι η μορφογένεση έχει τοπολογικό χαρακτήρα και:

1] Καθοδηγεί τη μετάπτωση της σφαιρικής μορφολογίας των θυγατρικών κυττάρων που τροφοδοτούν τον αδιαφοροποίητο μεσεγχυματικό πληθυσμό (*blastemal cells*), προς την ατρακτοειδή μορφολογία, στην οποία συγκλίνουν ανεξάρτητα:

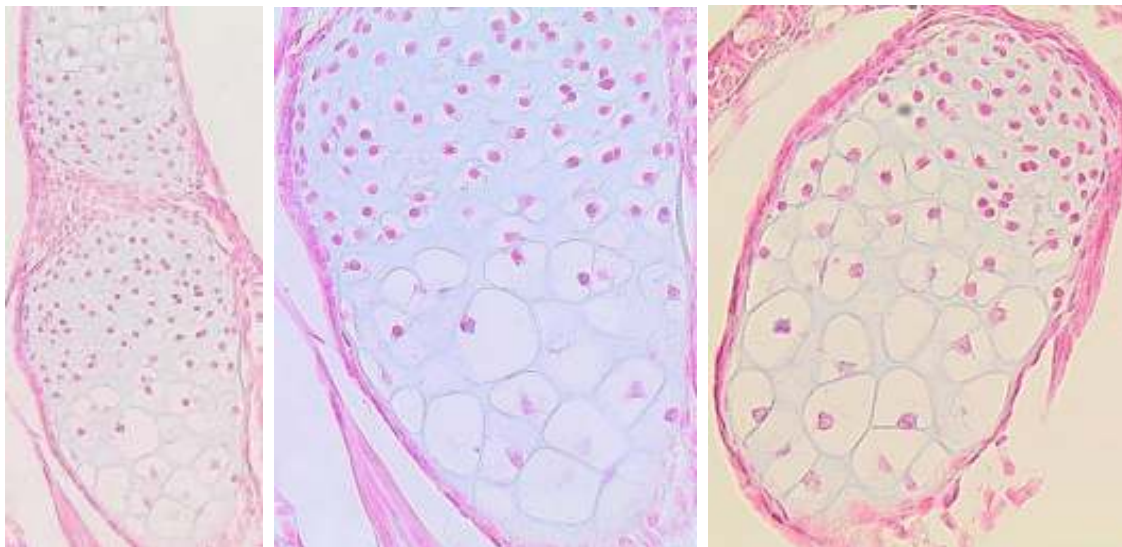
1α) αφενός ο *in vivo* βλαστηματικός φαινότυπος στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία (*regenerative morphogenetic fields*) ([Εικ. VII.5.7.], [Εικ. VII.5.8.]) και

1β) αφετέρου ο *in vitro* προσαρμοστικός φαινότυπος των μεσεγχυματικών κυττάρων που απομονώνονται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (UC-MSCs) ([Εικ. II.5.37.], [Εικ. V.2.4.]).

2] Καθοδηγεί τον τοπολογικό μετασχηματισμό της σφαιρικής στην ατρακτοειδή μορφολογία, μέσω «αλληλουχιακής σχηματοποίησης», η οποία περιλαμβάνει μια εκτενή ακολουθία από μεταβατικές μορφολογίες που τροφοδοτούν σταδιακά την πολυεδρική σχηματοποίηση των αδιαφοροποίητων φαινότυπων στις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*).

Η παρατηρούμενη *in vivo* πλαστικότητα της κυτταρικής μορφολογίας (*cell shape plasticity*) των προχονδρικών φαινότυπων στις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) παρέχει ενδείξεις που συνηγορούν ευμενώς στις προαναφερθείσες υποθέσεις μορφογένεσης για τη

δευτερογενή ανάπτυξη στο μορφογενετικό πεδίο του άκρου των προνυμφών αμφιβίων. Οι μορφολογικές μεταβολές που συμπορεύονται με τη διαδοχή των σταδίων του καθορισμού (*determination*) για τους αδιαφοροποίητους φαινότυπους και θα μπορούσαν να επισημάνουν διακεκριμένα στιγμιότυπά της, δεν είναι μικροσκοπικώς ορατές στην ιστοχημεία με χρώση Domagk ([Εικ. VII.4.6.B.], [Εικ. VII.5.7.], [Εικ. VII.5.8.]). Αλλά οι αντίστοιχες μορφομετρικές μεταβολές που συνοδεύουν την ακολουθία ορόσημων σταδίων της οντογένεσης του χονδροκυτταρικού φαινότυπου κατά τη δευτερογενή ανάπτυξη, είναι άμεσα παρατηρήσιμες στα ιστολογικά παρασκευάσματα, με τη μορφή της συνεχούς αλλαγής στις κυτταρικές διαστάσεις και της ασυνεχούς ποικιλότητας στην κυτταρική σχηματοποίηση. Πάντως, η αύξηση των κυτταρικών διαστάσεων (ή μεγέθους) συμπορεύεται γραμμικά με τη διαδικασία της κυτταρικής αύξησης (υπερτροφίας), η οποία σηματοδοτεί ολόκληρη τη φάση της μετάπτωσης του καθορισμού για τον προχονδρικό φαινότυπο (*prechondrogenic determination*), στον αντίστοιχο για το χονδροκυτταρικό (*chondrogenic determination*) και προηγείται της διαφοροποίησής του. Με άλλα λόγια πριν ευοδωθεί η διαφοροποίηση και επικρατήσουν στατιστικώς οι ισογενικές ομάδες (*isogenic groups*) με την χαρακτηριστική παρουσία των χόνδρινων ελύτρων ([Εικ. VII.5.7.], [Εικ. VII.5.8.]), η μορφολογική ομοιογένεια του προχονδροκυτταρικού πληθυσμού στις μεσεγγυματικές συμπυκνώσεις εκτρέπεται (ή αποκλίνει) προς μια σταδιακή ποικιλοποίηση των κυτταρικών διαστάσεων και σχημάτων. Κατά συνέπεια κρίνεται σκόπιμη μια περιεκτική τοπολογική θεώρηση της διακύμανσης του *in vivo* κυτταρικού μεγέθους και σχήματος, επειδή απετέλεσε το εφαλτήριο υπόβαθρο για την αντίστοιχη θεώρηση του ανισοτροπισμού κυτταρικού μεγέθους και σχήματος, που σε συνδυασμό με τον ανισοτροπισμό προσανατολισμού για την κυτταρική γειτνίαση, υποβόσκουν στις διδιάστατες συναθροίσεις των μεσεγγυματικών κυττάρων (*MSC-aggregates*) που απομονώνονται στις ιστοκαλλιέργειες από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο.



**Εικόνα VII.5.8.:** Λεπτομέρειες από τη συνάθροιση μεσεγγυματικών κυττάρων (*mesenchymal accumulations*) στις προχονδρικές μεσεγγυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) αναγεννώμενων άκρων ατόμων του είδους *Rana temporaria*. Επειδή όλο το φάσμα μορφολογικών παραλλαγών που αντικατοπτρίζουν τον ανισοτροπισμό μεγέθους και σχήματος αποτυπώνεται στα ιστοχημικά αυτά παρασκευάσματα, συγκεντρωμένος στα περιορισμένα γεωμετρικά όρια της ίδιας γειτονιάς προχονδρικών κυττάρων, υιοθετήθηκε επιτυχημένα ο όρος «μεσεγγυματική συμπύκνωση» (Μεγέθυνση 400x).

Έτσι, η «διατεταγμένη κυτοκίνηση» (*oriented mitosis*) που υιοθετεί την εκδοχή της κυτοκίνησης-B (*cytokinesis-B*) εκπληρώνει τον *in vitro* μορφογόνο ρόλο της [Εικ. II.5.57.] με τρεις προϋποθέσεις που συσχετίζονται στενά με την τοπολογία του διδιάστατου κελλωτού δικτύου, το οποίο θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύουν στις ιστοκαλλιέργειές τους οι μεσεγγυματικές συναθροίσεις (*MSC-aggregates*):

- 1] με πολλά κύτταρα ανά μονάδα επιφάνειας (του καλλιεργητικού υποστρώματος),
- 2] με πολυγωνική σχηματοποίηση, ευρείας διακύμανσης (μεταβατικών) μορφολογιών,
- 3] με σταδιακή κλιμάκωση του καθεστώτος διακυτταρικής γειννίαςης μέχρι το τερματικό στάδιο της μεσεγχυματικής συνάθροισης που παρατηρείται στις κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες και απαρτίζεται από τα κύτταρα ατρακτοειδούς μορφολογίας που αντιπροσωπεύουν την τερματική *in vitro* φαινοτυπική προσαρμογή ([Εικ. II.5.37.], [Εικ. V.2.4.]),
- 4] η ακολουθία των μεταβατικών μορφολογιών που συμπληρώνουν την πεπερασμένη κλίμακα διαβάθμισης (ή ποικιλότητας) της πολυγωνικής σχηματοποίησης στο πλαίσιο των *in vitro* μεσεγχυματικών συναθροίσεων (*MSC-aggregates*), εικάζεται ότι συμμορφώνεται με τους κανόνες που καθοδηγούν τους τοπολογικούς μετασχηματισμούς στα αβιοτικά κελλωτά δίκτυα, για τα οποία χρησιμοποιούνται τυποποιημένα υποδείγματα Ευκλείδειων στερεών για την υπολογιστική αναπαράσταση της σχηματοποίησης του μοναδιαίου κελιού. Τέτοιες αρχέτυπες μορφολογίες περιλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

| Name                | Image                                                                               | Vertices<br><i>V</i> | Edges<br><i>E</i> | Faces<br><i>F</i> | Euler<br>characteristic:<br>$V - E + F$ |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| Tetrahemihexahedron |   | 6                    | 12                | 7                 | 1                                       |
| Octahemioctahedron  |  | 12                   | 24                | 12                | 0                                       |
| Cubohemioctahedron  |  | 12                   | 24                | 10                | -2                                      |
| Great icosahedron   |  | 12                   | 30                | 20                | 2                                       |

**Εικόνα VII.5.9.:** Ο πίνακας συνοψίζει τις βασικές γεωμετρικές μεταβλητές που υπεισέρχονται στον υπολογισμό της σταθεράς Euler (*Euler characteristic*) και κατ'επέκταση στην τοπολογία των κελλωτών δικτύων, για αντιπροσωπευτικά (πρότυπα) κανονικά στερεά με κοίλη πολυεδρική μορφολογία.

Η «διατεταγμένη κυτοκίνηση» (*oriented mitosis*) εκπληρώνει τον *in vivo* μορφογόνο ρόλο της με τρεις αντίστοιχες προϋποθέσεις που συσχετίζονται στενά με την τοπολογία του τριδιάστατου κελλωτού δικτύου, το οποίο θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύουν οι προχονδρικές μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*):

1] με λίγα κύτταρα ανά μονάδα όγκου της μεσεγχυματικής συνάθροισης (*mesenchymal accumulation*) για το μορφογενετικό πεδίο δεδομένης ανατομικής δομής, (π.χ. δακτύλου ή άκρου),

2] με πολυεδρική σχηματοποίηση, περιορισμένης διακύμανσης (μεταβατικών) μορφολογιών,

3] με σταδιακή εναλλαγή μεταξύ κλιμάκωσης και αποκλιμάκωσης του καθεστώτος διακυτταρικής γειτνίασης (συνδεσιμότητας, *connectivity*), που αντιστοιχεί στη μετάβαση από τη σφαιρική μορφολογία, στην πολυεδρική και στη συνέχεια από την πολυεδρική σε εκείνη των ισογενικών ομάδων (*isogenic groups*) κατά το στάδιο της διαφοροποίησης του χονδροκυτταρικού φαινότυπου ([Εικ. VII.5.7.], [Εικ. VII.5.8.]),

4] η ακολουθία των μεταβατικών μορφολογιών που συμπληρώνουν την πεπερασμένη κλίμακα διαβάθμισης (ή ποικιλότητας) της πολυγωνικής σχηματοποίησης στο πλαίσιο των *in vivo* μεσεγχυματικών συναθροίσεων (*mesenchymal accumulations*), εικάζεται ότι συμμορφώνεται με τους κανόνες που καθοδηγούν τους τοπολογικούς μετασχηματισμούς στα αβιοτικά κελλωτά δίκτυα, για τα οποία χρησιμοποιούνται τυποποιημένα υποδείγματα Ευκλείδειων στερεών για την υπολογιστική αναπαράσταση της σχηματοποίησης του μοναδιαίου κελλίου. Τέτοιες αρχέτυπες μορφολογίες περιλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

| Name                  | Image                                                                               | Vertices<br><i>V</i> | Edges<br><i>E</i> | Faces<br><i>F</i> | Euler<br>characteristic:<br>$V - E + F$ |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| Tetrahedron           |  | 4                    | 6                 | 4                 | 2                                       |
| Hexahedron<br>or cube |  | 8                    | 12                | 6                 | 2                                       |
| Octahedron            |  | 6                    | 12                | 8                 | 2                                       |
| Dodecahedron          |  | 20                   | 30                | 12                | 2                                       |
| Icosahedron           |  | 12                   | 30                | 20                | 2                                       |

**Εικόνα VII.5.10.:** Ο πίνακας συνοψίζει τις βασικές γεωμετρικές μεταβλητές που υπεισέρχονται στον υπολογισμό της σταθεράς Euler (*Euler characteristic*) και κατ'επέκταση στην τοπολογία των κελλωτών δικτύων, για αντιπροσωπευτικά (πρότυπα) κανονικά στερεά με κυρτή πολυεδρική μορφολογία.

Στο πλαίσιο θεώρησης του ανισοτροπισμού (*anisotropy*) που διέπει την πλειονότητα των κελλωτών δικτύων βιολογικής προέλευσης και αντικατοπτρίζει τη διακύμανση των διαστάσεων και της μορφολογίας των κυττάρων από τα οποία δομούνται, διαπιστώνεται συστηματικά μια στερεότυπη συμμεταβολή των δυο αυτών μεταβλητών (μεγέθους και σχήματος), υποδηλώνοντας το τοπολογικό υπόβαθρο της αλληλεξάρτησής τους. Η παρατήρηση επιβεβαιώνει ότι η *in vivo* αύξηση των κυτταρικών διαστάσεων (μέσω κυτταρικής υπερτροφίας) συμπορεύεται απαρέγκλιτα με μια συνοδό μετάπτωση από τη σφαιρική, προς την πολυεδρική σχηματοποίηση. Κατά την κλιμάκωση του μεγέθους οποιουδήποτε κυττάρου σφαιρικής μορφολογίας, ελαττώνεται η τιμή του λόγου

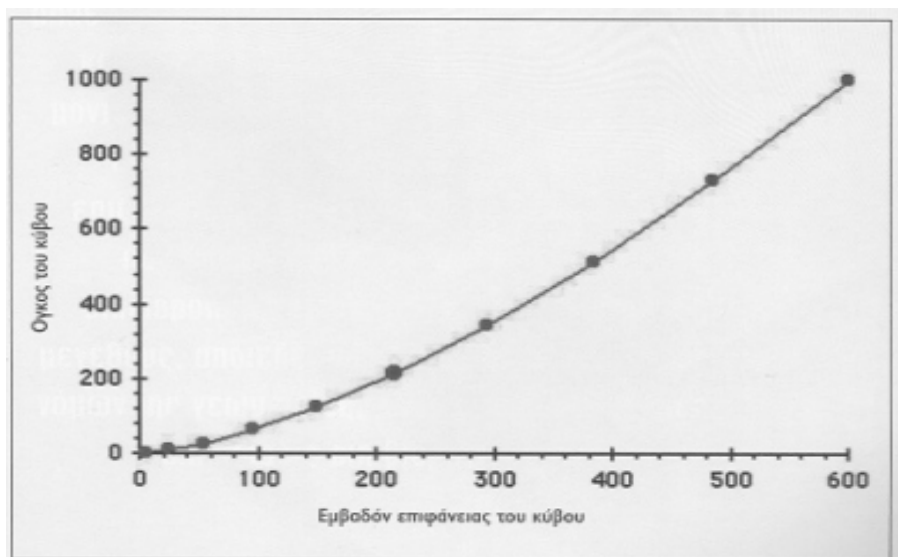


επιφάνειας προς όγκο (“*area-to-volume ratio*”) σύμφωνα με την ίδια απλή σχέση που διέπει τη γεωμετρία και τοπολογία της άβιας ύλης:

$$\frac{S}{V} = \frac{3}{r}$$

Αλλά μια τέτοια μεταβολή -αν επρόκειτο να ολοκληρωθεί αποκλειστικά με τοπολογικούς όρους για οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο- τείνει να ευνοήσει τη διατήρηση της σφαιρικής διαμόρφωσης, είτε πρόκειται για μονοκύτταρο είδος είτε αφορά τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών. Η απώτερη αιτία αυτής της «*συντηρητικής τοπολογικής ροπής*» που υποβόσκει κατά τη βιολογική μορφογένεση φαίνεται πως ανάγεται στην οικουμενικότητα που πλαισιώνει την ιδιότητα της σφαίρας να διασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή επιφάνεια για δεδομένο όγκο, συγκριτικά προς την αντίστοιχη δυνατότητα που επιδεικνύει οποιαδήποτε άλλη τριδιάστατη μορφολογία. Δεδομένης της φθίνουσας μονοτονίας για το λόγο μεταβολής  $\lambda(x_1, x_2)$  της εκθετικής καμπύλης όγκου-εμβαδού οποιουδήποτε Ευκλείδειου κανονικού στερεού (μη εξαρουμένης της σφαίρας) [Εικ. VII.5.12.], η αύξηση των διαστάσεων δεδομένου κανονικού στερεού, συμπορεύεται αναπόφευκτα με τη μείωση του λόγου επιφάνειας προς όγκο. Η γενικότητα αυτής της κατάστασης υποδηλώνει πως η προοπτική του ενδεχόμενου μετασχηματισμού της μορφολογίας του προς τη σφαιρική δεν είναι απαγορευτική, αλλά αντιθέτως περιορίζεται από την πλαστικότητα της φυσικής σχηματοποίησής του και εξαρτάται από τους βαθμούς ελευθερίας που υπεισέρχονται στη δυνατότητα τροποποίησης του λόγου μεταβολής  $\lambda(x_1, x_2)$  της αρχικής (δηλαδή της δικής του) εκθετικής καμπύλης όγκου-εμβαδού [Εικ. VII.5.11.].

Ειδικότερα, η συστηματική παρατήρηση της φυσικής γειτνίασης σφαιροειδών κυττάρων με παρακείμενες (ή εφαπτόμενες) πολυεδρικές μορφές, υποδηλώνει μια υποβόσκουσα τοπολογική συνθήκη «*συνέχειας*» για τη μετάπτωση της κυτταρικής σχηματοποίησης από τη σφαιρική προς την πολυεδρική μορφολογία. Επίσης διαπιστώνεται επανειλημμένα ότι η διακύμανση μεγέθους για τα σφαιρικά κύτταρα είναι πολύ πιο περιορισμένη από ό,τι ισχύει για τα πολυεδρικά, συνηγορώντας περαιτέρω στην τεκμηρίωση της «*ασυμβατότητας*» της σφαιρικής μορφολογίας για την τελεσφόρηση της *in vivo* μορφογένεσης των βλαστηματικών πληθυσμών (*mesenchymal accumulations*) στις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις μορφογενετικών πεδίων σε φάση πρωτογενούς ή δευτερογενούς ανάπτυξης ([Εικ. VII.4.6.], [Εικ. VII.5.7.], [Εικ. VII.5.8.]). Την πλέον ευλογοφανή δικαιολόγηση αυτής της «*ακαταλληλότητας*» του σφαιροειδούς σχήματος για ολοκλήρωση (ή αποπεράτωση) της χάραξης σχεδίου (*pattern formation*), θα μπορούσε να συνοψίσει η πρόδηλη διαπίστωση ότι η γειτνίαση τέτοιων (σφαιρικών) κυττάρων θα μειονεκτούσε υπερβολικά ως προς την προοπτική σύναψης διεπαφών (*cell-cell-interfaces*), συγκρινόμενα με την αντίστοιχη απεριόριστη δυνατότητα που συνοδεύει τις πολυεδρικές μορφολογίες στις κελλωτές (διασυνδεδεμένες) διευθετήσεις τους. Μια ενδεχόμενη σφαιροειδής σχηματοποίηση για το μοναδιαίο κελλί τέτοιων δικτύων, είναι φανερό ότι θα περιόριζε σε υπερθετικό βαθμό τη δυνατότητα καθιέρωσης τοπολογικού καθεστώτος συνδεσιμότητας (*connectivity*), εξαιτίας της υποδεέστερης πλαστικότητας συναρμογής των επιφανειών διεπαφής για τέτοια (σφαιροειδή) υποτιθέμενα σχήματα. Επιπρόσθετα, η απαράβατη αυτή φθίνουσα μεταβολή του λόγου επιφάνειας προς όγκο  $\{S/V\}$  συναρτήσει της αύξησης των σφαιρικών διαστάσεων, κατατείνει στη σταθερή απώλεια («*έλλειμμα*» ή «*έκπτωση*») διαθέσιμης επιφάνειας για σύναψη διακυτταρικών διεπαφών, αλληλένδετα με την αύξηση του μήκους της ακτίνας  $\{r\}$  που επιβάλλει η κυτταρική αύξηση (υπερτροφία) και κατ'επέκταση περιορίζει συστηματικά την προοπτική ευόδωσης της συνδεσιμότητας (*connectivity*) μεταξύ των μοναδιαίων κελλιών του δικτύου, κατά την πληθυσμιακή επέκτασή τους.



**Εικόνα VII.5.11.:** Διάγραμμα συμμεταβολής του όγκου του κύβου σε συνάρτηση με τη μεταβολή του εμβαδού της επιφάνειάς του. Παρατηρείται ότι η σχέση αυτή δεν βαίνει γραμμικά συναρτήσει της σύμμετρης κλιμάκωσης των διαστάσεων του κύβου, αφού ο ρυθμός μεταβολής της αντίστοιχης αύξησης του όγκου είναι μεγαλύτερος εκείνου που συνοδεύει δεδομένη αύξηση της επιφάνειας. Για τον κύβο, αλλά και γενικότερα για τα άλλα πολύεδρα, η καμπύλη βαίνει πιο «απότομα» από ό,τι ισχύει για τη σφαίρα, επειδή ο αριθμητής είναι μεγαλύτερος (ίσος προς 6) από τον αντίστοιχο του λόγου για τη σφαίρα. Με άλλα λόγια η εκθετική καμπύλη όγκου-εμβαδού για οποιοδήποτε πολύεδρο επιδεικνύει στερεότυπα μεγαλύτερο λόγο μεταβολής  $\lambda(x_1, x_2)$ , σε σύγκριση με τον αντίστοιχο της σφαίρας.

Εναλλακτικά, η πολυεδρική κυτταρική σχηματοποίηση διασφαλίζει τη συστηματική διατήρηση υψηλότερων τιμών για το λόγο επιφάνειας προς όγκο  $\{S/V\}$  κατά την αύξηση του μεγέθους του μοναδιαίου κελλιού και κατ'επέκταση ευνοεί την προοπτική ευόδωσης του καθεστώτος συνδεσιμότητας (*connectivity*) στις κελλωτές διατάξεις. Η πλαστικότητα (ή προσαρμοστικότητα, "*fitness*") της σχηματοποίησης για την πολυεδρική μορφολογία δεν περιορίζεται αποκλειστικά στη διακύμανση των διαστάσεων αλλά προσδίδει πολυπλοκότητα στη δυναμική της συναρμογής των μοναδιαίων κελλιών, με συνέπεια να υπερτερεί έναντι της αντίστοιχης ποικιλότητας για τη σφαιρική μορφολογία.

Έτσι, αυτή ακριβώς η προσαρμοστική απόκλιση (ή «αντισταθμιστική διακύμανση») από την «υποδεέστερη μορφογενετική αποδοτικότητα» του σφαιροειδούς σχήματος, φαίνεται να υποβόσκει και στην πολυμορφική σχηματοποίηση που υιοθετούν οι *in vitro* μεταβατικές μορφολογίες του μεσεγχυματικού φαινότυπου στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειες. Για την εποπτικότερη αντιπαραβολή της μεταβολής του λόγου επιφάνειας προς όγκο  $\{S/V\}$  μεταξύ σφαιρικής και μη σφαιρικής (πολυεδρικής) μορφολογίας, παρατίθενται δυο διαγράμματα που αφορούν τη στερεολογία του κύβου ([Εικ. VII.5.11.], [Εικ. VII.5.12.]), για τον οποίο ο αντίστοιχος λόγος επιφάνειας προς όγκο ("*surface-to-volume ratio*")  $\{S/V\}$  είναι:

$$\frac{S}{V} = \frac{6}{a}$$

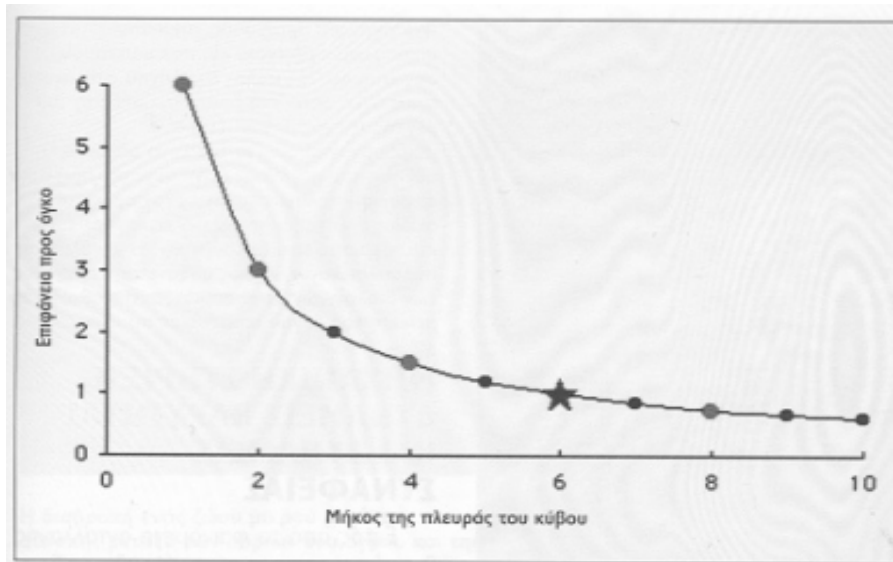
Για τη σφαίρα η αντίστοιχη καμπύλη του διαγράμματος όγκου-εμβαδού [Εικ. VII.5.11.], βαίνει πιο «ομαλά» από ό,τι ισχύει για τον κύβο, καθώς και για τα άλλα πολύεδρα, επειδή ο αριθμητής είναι μικρότερος (ίσος προς 3) από τον αντίστοιχο του λόγου για τον κύβο. Δηλαδή η εκθετική καμπύλη για τη σφαίρα επιδεικνύει μικρότερο λόγο μεταβολής  $\lambda(x_1, x_2)$ . Η ίδια αυτή δυναμική επιβεβαιώνεται εποπτικότερα στο διάγραμμα του λόγου εμβαδού-όγκου συναρτήσει του

μήκους ακμής για τον κύβο, ως αντιπροσωπευτικού δείγματος της πολυεδρικής στερεολογίας [Εικ. VII.5.12.]. Στο πλαίσιο της αντιπαραβολής αυτής επισημαίνεται ότι οι ποιοτικές διαφορές μεταξύ της σφαιρικής σχηματοποίησης και της πολυεδρικής αντικατοπτρίζουν σε πολλές περιπτώσεις τη διαφορά στον ποσοτικό αντίκτυπο που επιφέρει στη σχηματοποίηση, η διακύμανση του ρυθμού μεταβολής του λόγου εμβαδού-όγκου συναρτήσει της μοναδιαίας διάστασης του σχήματος (ακτίνας για τη σφαίρα, ακμής για τον κύβο, κλπ). Έτσι, η προοπτική διατήρησης υψηλότερων τιμών για το λόγο εμβαδού-όγκου  $\{ S / V \}$  διαφαίνεται ευνοϊκότερη κατά την αύξηση του μεγέθους του μοναδιαίου κελλιού, όταν υιοθετεί την πολυεδρική αντί για τη σφαιρική μορφολογία. Για τον κύβο, η καμπύλη βαίνει πιο «απότομα» από ό,τι ισχύει για τη σφαίρα, επειδή ο αριθμητής είναι μεγαλύτερος (ίσος προς 6) από τον αντίστοιχο του λόγου για τη σφαίρα. Η «αρχική επιφάνεια» [E] που επικαλύπτει (επενδύει ή περιτυλίγει) τον αντίστοιχο όγκο κύβου δεδομένης ακμής  $\{ a \}$ , εμπλουτίζεται με τριπλάσιο εμβαδόν («τελική επιφάνεια»  $[E'] = 3E$ ) για δεδομένο υποδιπλασιασμό του μήκους της ακμής του  $\{ \frac{a}{2} \}$ . Γενικεύοντας και για τα άλλα πολύεδρα, η εκθετική καμπύλη του λόγου εμβαδού-όγκου  $\{ S / V \}$  συναρτήσει της μεταβολής στη μια διάσταση του Ευκλείδειου χώρου επιδεικνύει μεγαλύτερο λόγο μεταβολής  $\lambda(x_1, x_2)$  για μια ευρεία ποικιλότητα πολυεδρικών διαμορφώσεων.

Συνεπώς η σφαιρική σχηματοποίηση ενδείκνυται για ομαλότερη διαβαθμισμένη μεταβολή της τοπικής πληροφορίας και κατ'επέκταση για διασφάλιση της συνέχειάς της, σε αντιδιαστολή προς την υποδεέστερη αντίστοιχη δυνατότητα της πολυεδρικής σχηματοποίησης. Η τοπολογική αυτή συνθήκη σφαιρικής σχηματοποίησης των θυγατρικών κυττάρων των *in vivo* κυτταροδιαιρέσεων, εικάζεται ότι εμπλουτίζει τις μορφογενετικές δυνατότητες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αλληλεπίδρασης με τη διαδικασία της αποδιαφοροποίησης, κατά την *in vivo* αναπαραγωγή και διασπορά της τοπικής πληροφορίας στα αναγεννητικά μορφογενετικά πεδία της καταβολής του άκρου στα προνυμφικά στάδια των αμφιβίων. Αντιθέτως, η πολυεδρική σχηματοποίηση που παρατηρείται κατά τις *in vitro* κυτταροδιαιρέσεις ενδείκνυται για ασυνεχή και απότομη (ταχύρρυθμη) διαβαθμισμένη μεταβολή της τοπικής πληροφορίας και κατ'επέκταση για διασφάλιση της *de novo* εγκατάστασής της στο *in vitro* περιβάλλον της ιστοκαλλιέργειας.

Η εκθετική συνάρτηση που περιγράφει τον τρόπο μεταβολής του λόγου επιφάνειας προς όγκο ("surface-to-volume ratio")  $\{ S / V \}$  συναρτήσει της μεταβολής των διαστάσεων οποιουδήποτε στερεού σώματος [Εικ. VII.5.12.], υποδηλώνει εποπτικά την έντονη εξάρτησή του από την τάξη μεγέθους οποιουδήποτε σχήματος είναι πιθανό να υιοθετήσει το στερεό. Για παράδειγμα, η αναλογία της επιφάνειας ενός κύβου προς τον όγκο που καταλαμβάνει και ο τρόπος που η αναλογία αυτή μεταβάλλεται ως συνάρτηση του μεγέθους του αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της εξάρτησης. Αν υποθεθεί ότι οι διαστάσεις ενός τυχαίου κύβου με μήκος ακμής  $\{ a \}$  διπλασιάζονται, τότε η επιφάνειά του θα τετραπλασιαστεί. Η διαπίστωση αυτή προκύπτει άμεσα από τον υπολογισμό του συνολικού εμβαδού των έξι εδρών του κύβου με βάση το εμβαδόν [E] κάθε έδρας του, πριν και μετά το διπλασιασμό του μήκους ακμής. Ωστόσο, η αντίστοιχη συμμεταβολή του όγκου θα είναι δυσανάλογα μεγαλύτερη, αφού με το διπλασιασμό των διαστάσεών του, η επιφάνεια του κύβου τετραπλασιάζεται ενώ ο όγκος του οκταπλασιάζεται. Κύβοι μεγαλύτερων διαστάσεων παρουσιάζουν μικρότερη τιμή του λόγου επιφάνειας προς όγκο, σε σύγκριση με κύβους μικρότερου μεγέθους. Η μείωση του λόγου αυτού με την αύξηση του μεγέθους αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό όλων των σωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων.





**Εικόνα VII.5.12.:** Διάγραμμα συμμεταβολής του λόγου εμβαδού προς όγκο, συναρτήσει του μήκους της πλευράς του κύβου. Είναι σαφής η τóση μείωσης της επιφάνειας σε σχέση με τον όγκο, καθώς αυξάνεται το μήκος της πλευράς. Ο αστερίσκος δηλώνει το μήκος της πλευράς, για το οποίο ο όγκος και η επιφάνεια αποκτούν ίσες τιμές και ο λόγος εμβαδού προς όγκο εξισώνεται με τη μονάδα.

Άρα, μια εναλλακτική δυνατότητα εξασφάλισης υψηλής τιμής για το λόγο επιφάνειας προς όγκο σε αντικείμενα μεγαλύτερου μεγέθους, προϋποθέτει την υιοθέτηση ενός περισσότερο περίπλοκου και σύνθετου σχήματος, που θα περιλαμβάνει περισσότερες εσοχές και / ή προεξοχές. Η ανάγκη αύξησης της μορφολογικής πολυπλοκότητας και κατ'επέκταση κλιμάκωσης της ποικιλότητας σχηματοποίησης, προκειμένου ο λόγος εμβαδού προς όγκο να διατηρείται σε υψηλές τιμές καθώς αυξάνεται το μέγεθος του μοναδιαίου κελλιού για τα κελλωτά δίκτυα, δικαιολογεί ως ένα βαθμό την *in vivo* πολυεδρική σχηματοποίηση που υιοθετεί ο προχονδρικός φαινότυπος των βλαστηματικών κυττάρων (*blastemal cells*) στις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις (*mesenchymal condensations*) των αναγεννητικών μορφογενετικών πεδίων στις καταβολές (φύτρα) των άκρων (*limb buds*) στα αμφίβια, καθώς επίσης ερμηνεύει και την *in vitro* προσαρμοστική σχηματοποίηση που υιοθετούν τα μεσεγχυματικά κύτταρα που απομονώνονται από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο (UC-MSCs) στις διδιάστατες ιστοκαλλιέργειές τους. Η γεωμετρική και τοπολογική αυτή εκδοχή της *in vitro* προσαρμογής συμπληρώνει μια σχεδόν προκαθορισμένη ακολουθία από μεταβατικές μορφολογίες, οι οποίες αποκλίνουν στερεότυπα από τη σφαιρική μορφολογία και καθοδηγούν τη μετάπτωση του μονήρους προσαρμοστικού φαινότυπου (*solitary phenotype*) προς το συναθροιστικό φαινότυπο (*aggregative phenotype*) που παρατηρείται χαρακτηριστικά σε κορεσμένες πληθυσμιακές πυκνότητες (*confluent population densities*).

---

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-Ι: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Aggarwal S and Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-1822. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559
2. Allen KJ, Buck NE and Williamson R. (2005). Stem cells for the treatment of liver disease. *Transpl Immunol*, 15(2), 99-112. doi: 10.1016/j.trim.2005.09.001
3. Altman J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137(4), 433-457. doi: 10.1002/cne.901370404
4. Altman J and Das GD. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335.
5. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425(6961), 968-973. doi: 10.1038/nature02069
6. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118(2), 149-161. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.004
7. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*, 35(5), 1482-1490. doi: 10.1002/eji.200425405
8. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, et al. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*, 5(3), 267-277.
9. Ayatollahi M, Salmani MK, Geramizadeh B, Tabei SZ, Soleimani M and Sanati MH. (2012). Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World J Stem Cells*, 4(1), 1-8. doi: 10.4252/wjsc.v4.i1.1
10. Baker M. (2007). Scientific definition by political request.
11. Baksh D, Yao R and Tuan RS. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 25(6), 1384-1392. doi: 10.1634/stemcells.2006-0709
12. Balci D and Can A. (2013). The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Curr Stem Cell Res Ther*, 8(1), 60-72.
13. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. (2007). Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*, 110(7), 2764-2767. doi: 10.1182/blood-2007-04-087056
14. Barker N and Clevers H. (2007). Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology*, 133(6), 1755-1760. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.029
15. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 30(1), 42-48.
16. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ and Bellantuono I. (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*, 22(5), 675-682. doi: 10.1634/stemcells.22-5-675
17. Becker AJ, Mc CE and Till JE. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197, 452-454.
18. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, et al. (2007). Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 25(7), 1753-1760. doi: 10.1634/stemcells.2007-0068

19. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Asian H, et al. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 105(5), 2214-2219. doi: 10.1182/blood-2004-07-2921
20. Bhandari DR, Seo KW, Roh KH, Jung JW, Kang SK and Kang KS. (2010). REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 5(5), e10493. doi: 10.1371/journal.pone.0010493
21. Bieback K, Kern S, Kluter H and Eichler H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22(4), 625-634. doi: 10.1634/stemcells.22-4-625
22. Bocelli-Tyndall C, Barbero A, Candrian C, Ceredig R, Tyndall A and Martin I. (2006). Human articular chondrocytes suppress in vitro proliferation of anti-CD3 activated peripheral blood mononuclear cells. *J Cell Physiol*, 209(3), 732-734. doi: 10.1002/jcp.20789
23. Bongso TA, Fong CY, Ng CY and Ratnam SS. (1994a). Blastocyst transfer in human in vitro fertilization: the use of embryo co-culture. *Cell Biol Int*, 78(12), 1181-1189.
24. Bongso TA, Fong CY, Ng SC and Ratnam S. (1994b). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod*, 9(11), 2110-2117.
25. Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, et al. (2008). Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 3), 353-356. doi: 10.1042/bst0360353
26. Bork S, Pfister S, Witt H, Horn P, Korn B, Ho AD, et al. (2010). DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*, 9(1), 54-63. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00535.x
27. Bray LJ, George KA, Huttmacher DW, Chirila TV and Harkin DG. (2012). A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus. *Biomaterials*, 33(13), 3529-3538. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.045
28. Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, Buckley-Sturrock A, Sato Y, Rifkin DB, et al. (1989). Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest*, 61(5), 571-575.
29. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(10), 3828-3832.
30. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I and Fisk NM. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396-2402.
31. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. (2003). Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*, 9(5), 604-613. doi: 10.1038/nm848
32. Caplan AL. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650. doi: 10.1002/jor.1100090504
33. Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M and Musaro A. (2011). Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*, 70(1), 35-42. doi: 10.1016/j.arr.2009.08.001
34. Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, et al. (2010). Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 19(3), 317-322. doi: 10.1177/0961203309348983
35. Chamberlain G, Fox J, Ashton B and Middleton J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739-2749. doi: 10.1634/stemcells.2007-0197
36. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643-655.

37. Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA and Goodell MA. (2007). Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol*, 5(8), e201. doi: 10.1371/journal.pbio.0050201
38. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, et al. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, 707(12), 4817-4824. doi: 10.1182/blood-2006-01-0057
39. Chen G, Sato T, Ushida T, Ochiai N and Tateishi T. (2004). Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng*, 70(3-4), 323-330. doi: 10.1089/107632704323061681
40. Choudhery MS, Badowski M, Muise A and Harris DT. (2013). Utility of cryopreserved umbilical cord tissue for regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*, 8(5), 370-380.
41. Cooperman L and Michaeli D. (1984). The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*, 70(4), 638-646.
42. Cotsarelis G, Sun TT and Lavker RM. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*, 67(7), 1329-1337.
43. Da-Croce L, Gambarini-Paiva GH, Angelo PC, Bambirra EA, Cabral AC and Godard AL. (2013). Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell Tissue Bank*, 74(1), 65-76. doi: 10.1007/s10561-012-9301-9
44. de Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, Sartori MF, Baruffaldi Preis FW and Brini AT. (2009). Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy*, 77(6), 793-803. doi: 10.3109/14653240903079393
45. de Lima Prata K, de Santis GC, Orellana MD, Palma PV, Brassesco MS and Covas DT. (2012). Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. *Cytotherapy*, 74(6), 694-700. doi: 10.3109/14653249.2012.677820
46. DeLustro F, Condell RA, Nguyen MA and McPherson JM. (1986). A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res*, 20(1), 109-120. doi: 10.1002/jbm.820200110
47. Dennis JE and Charbord P. (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*, 20(3), 205-214. doi: 10.1634/stemcells.20-3-205
48. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A and Hoffman R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101(8), 2999-3001. doi: 10.1182/blood-2002-06-1830
49. Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Eleuterio E, Sulpizio M, Lanuti P, Riviello A, et al. (2014). Cryopreservation effects on Wharton's Jelly Stem Cells proteome. *Stem Cell Rev*, 70(3), 429-446. doi: 10.1007/s 12015-014-9501-8
50. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843.
51. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, S(4), 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905
52. Dong HH, Xiang S, Chen XP, Liang HF, Zhang W, Jing K, et al. (2009). The epithelial-mesenchymal transition promotes transdifferentiation of subcutaneously implanted hepatic oval cells into mesenchymal tumor tissue. *Stem Cells Dev*, 18(9), 1293-1298. doi: 10.1089/scd.2008.0321
53. Dundar NO, Dundar B, Cesur G, Yilmaz N, Sutcu R and Ozguner F. (2010). Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum. *Pediatr Int*, 52(4), 622-625. doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03100.x

54. Ergen AV and Goodell MA. (2010). Mechanisms of hematopoietic stem cell aging. *Exp Gerontol*, 45(4), 286-290. doi: 10.1016/j.exger.2009.12.010
55. Erices A, Conget P and Minguell JJ. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 709(1), 235-242.
56. Erickson GA, Bolin SR and Landgraf JG. (1991). Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev Biol Stand*, 75, 173-175.
57. Eslaminejad MB, Nazarian H, Falahi F, Taghiyar L and Daneshzadeh MT. (2009). Ex vivo Expansion and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Goat Bone Marrow Iran J Basic Med Sci., 12(2), 10.
58. Evans MJ and Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.
59. Felix JS, Doherty RA, Davis HT and Ridge SC. (1974). Amniotic fluid cell culture. I. Experimental design for evaluating cell culture variables: determination of optimal fetal calf serum concentration. *Pediatr Res*, 8(11), 870-874. doi: 10.1203/00006450-197411000-00003
60. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. (2009). Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol*, 183(2), 993-1004. doi: 10.4049/jimmunol.0900803
61. Fong CY, Subramanian A, Biswas A, Gauthaman K, Srikanth P, Hande MP, et al. (2010). Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reprod Biomed Online*, 21(3), 391-401. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.010
62. Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, Schindler JW, Jaenisch R, Carey V, et al. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*, 27(1), 84-90. doi: 10.1038/nbt.1517
63. Frenkel SR and Di Cesare PE. (2004). Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng*, 32(1), 26-34.
64. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK and Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4), 393-403.
65. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI and Frolova GP. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
66. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il and Petrakova KV. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16(3), 381-390.
67. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C and Klingemann H. (2007). Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 73(12), 1477-1486. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.048
68. Fuchs E and Segre JA. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 700(1), 143-155.
69. Fuchs E, Tumber T and Guasch G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116(G), 769-778.
70. Gelse K, Poschl E and Aigner T. (2003). Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(12), 1531-1546.
71. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW and Dazzi F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 705(7), 2821-2827. doi: 10.1182/blood-2004-09-3696
72. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 321( 17), 1174-1178. doi: 10.1056/nejm 198910263211707

73. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan KW, et al. (2004). Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol*, 32(4), 397-407. doi: 10.1016/j.exphem.2004.01.002
74. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. (1997). Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*, 337(6), 373-381. doi: 10.1056/nejm.199708073370602
75. Gong W, Han Z, Zhao H, Wang Y, Wang J, Zhong J, et al. (2012). Banking human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical use. *Cell Transplant*, 21 (1), 207-216. doi: 10.3727/096368911x586756
76. Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R and Le Blanc K. (2005). Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica*, 90(8), 1017-1026.
77. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81(8), 531-535.
78. Guillot PV, De Bari C, Dell'Accio F, Kurata H, Polak J and Fisk NM. (2008). Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources. *Differentiation*, 76(9), 946-957. doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00279.x
79. Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H and Fisk NM. (2007). Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells*, 25(3), 646-654. doi: 10.1634/stemcells.2006-0208
80. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. (2007). Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*, 179(3), 1595-1604.
81. Haynes J and Burnett AL. (1963). DEDIFFERENTIATE AND REDIFFERENTIATION OF CELLS IN HYDRA VIRIDIS. *Science*, 742(3598), 1481-1483.
82. Haynesworth SE, Goldberg VM and Caplan AL. (1994). Diminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging. In JA Buckwalter, VM Goldberg & SL- Y Woo (Eds.), *Musculoskeletal Soft-tissue Aging: Impact on Mobility* (Vol. 1, pp. 79-87). Rosemont, IL, USA: American Academy of Orthopaedic Surgeons.
83. Ho AD, Wagner W and Mahlknecht U. (2005). Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO Rep*, 6 Spec No, S35-38. doi: 10.1038/sj.embor.7400436
84. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(13), 8932-8937. doi: 10.1073/pnas.132252399
85. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395. doi: 10.1080/14653240500319234
86. Hwa Cho H, Bae YC and Jung JS. (2006). Role of toll-like receptors on human adipose- derived stromal cells. *Stem Cells*, 24(12), 2744-2752. doi: 10.1634/stemcells.2006-0189
87. Hwang JH, Shim SS, Seok OS, Lee HY, Woo SK, Kim BH, et al. (2009). Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci*, 24(4), 547-554. doi: 10.3346/jkms.2009.24.4.547
88. Iftimia-Mander A, Hourd P, Dainty R and Thomas RJ. (2013). Mesenchymal stem cell isolation from human umbilical cord tissue: understanding and minimizing variability in cell yield for process optimization. *Biopreserv Biobank*, 11(5), 291-298. doi: 10.1089/bio.2013.0027
89. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. (2003). Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*, 88(8), 845-852.

90. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 22(7), 1338-1345. doi: 10.1634/stemcells.2004-0058
91. Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, et al. (2006). Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*, 85(4), 212-225. doi: 10.1007/S00277-005-0047-3
92. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM and Sharkis SJ. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*, 6(6), 532-539. doi: 10.1038/ncb1132
93. Jeswani RM and Vani SN. (1991). A study of serum zinc levels in cord blood of neonates and their mothers. *Indian J Pediatr*, 58(5), 683-686.
94. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), 4120-4126. doi: 10.1182/blood-2004-02-0586
95. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, et al. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*, 13(4), 767-773. doi: 10.1089/ten.2006.0192
96. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR and Baumanns V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim*, 30(2), 219-227.
97. Jones S, Horwood N, Cope A and Dazzi F. (2007). The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol*, 179(5), 2824-2831.
98. Kali S, Noth U, Reimers K, Choi CY, Muehlberger T, Allmeling C, et al. (2004). [In vitro fabrication of tendon substitutes using human mesenchymal stem cells and a collagen type I gel], *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 36(4), 205-211. doi: 10.1055/S-2004-815745
99. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319-331. doi: 10.1634/stemcells.2006-0286
100. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H and Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294-1301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342
101. Kiel MJ and Morrison SJ. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, 8(4), 290-301. doi: 10.1038/nri2279
102. Kohlboeck G, Glaser C, Tiesler C, Demmelmaier H, Standi M, Romanos M, et al. (2011). Effect of fatty acid status in cord blood serum on children's behavioral difficulties at 10 y of age: results from the LISApplus Study. *Am J Clin Nutr*, 94(6), 1592-1599. doi: 10.3945/ajcn.111.015800
103. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 386-398. doi: 10.1634/stemcells.2005-0008
104. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 707(9), 3722-3729. doi: 10.1182/blood-2002-07-2104
105. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369-377.
106. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, et al. (2007). Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*, 21(2), 297-303. doi: 10.1038/sj.leu.2404470



107. Lansdorp PM, Dragowska W and Mayani H. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med*, 178(3), 787-791.
108. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371 (9624), 1579-1586. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X
109. Le Blanc K, Gottherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. (2005). Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*, 79(11), 1607-1614.
110. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gottherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363(9419), 1439-1441. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7
111. Lee G, White LS, Hurov KE, Stappenbeck TS and Piwnica-Worms H. (2009). Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 706(12), 4701-4706. doi: 10.1073/pnas.0900751106
112. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL and Chen TH. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), 1669-1675. doi: 10.1182/blood-2003-05-1670
113. Lee TJ, Jang J, Kang S, Jin M, Shin H, Kim DW, et al. (2013). Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 430(2), 793-797. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.067
114. Li YP, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, et al. (2008). Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol*, 180(3), 1598- 1608.
115. Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, Hennerbichler S, Gabriel C, Wolbank S, et al. (2012). Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells*, 7(4), 1061-1088. doi: 10.3390/cells1041061
116. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. (2008). Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*, 26(1), 279-289. doi: 10.1634/stemcells.2007-0454
117. Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D and Janes SM. (2009). Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res*, 69(10), 4134-4142. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-4698
118. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*, 91(8), 1017-1026.
119. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 90(4), 516-525.
120. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, 372(9655), 2023-2030. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61598-6
121. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 7(1), 55-70. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.014

122. Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R and Kasper C. (2011). Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev*, 7(1), 17-31. doi: 10.1007/s 12015-010-9165-y
123. Manca MF, Zwart I, Beo J, Palasingham R, Jen LS, Navarrete R, et al. (2008). Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. *Cytotherapy*, 70(1), 54-68. doi: 10.1080/14653240701732763
124. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, et al. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*, 97(4), 744-754. doi: 10.1002/jcb.20681
125. Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(12), 7634- 7638.
126. Mayani H, Dragowska W and Lansdorp PM. (1993). Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*, 82(9), 2664-2672.
127. Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, et al. (2010). Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp Neurol*, 223(1), 229-237. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.007
128. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M and Weissman IL. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 247(4873), 1632-1639.
129. McLaughlin D, Tsirimonaki E, Vallianatos G, Sakellaris N, Chatzistamatiou T, Stavropoulos- Gioka C, et al. (2006). Stable expression of a neuronal dopaminergic progenitor phenotype in cell lines derived from human amniotic fluid cells. *J Neurosci Res*, 83(7), 1190-1200. doi: 10.1002/jnr.20828
130. Mehrasa R, Vaziri H, Oodi A, Khorshidfar M, Nikogoftar M, Golpour M, et al. (2014). Mesenchymal stem cells as a feeder layer can prevent apoptosis of expanded hematopoietic stem cells derived from cord blood. *Int J Mol Cell Med*, 3(1), 1-10.
131. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W and Dilloo D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase- mediated tryptophan degradation. *Blood*, 703(12), 4619-4621. doi: 10.1182/blood-2003-11- 3909
132. Mendez J J, Ghaedi M, Steinbacher D and Niklason L. (2014). Epithelial Cell Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells in Decellularized Lung Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0647
133. Merino A, Mazzara R, Fuste B, Diaz-Ricart M, Rozman M, Lozano M, et al. (2003). Transfusion medicine illustrated. The mesenchymal stem cell revealed. *Transfusion*, 43(1), 1.
134. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, et al. (2006). Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*, 76(4), 309-316. doi: 10.1111/j.1600- 0609.2005.00611.x
135. Michalopoulos G and Pitot HC. (1975). Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res*, 94(1), 70-78.
136. Minguell JJ, Conget P and Erices A. (2000). Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*, 33(8), 881-887.
137. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631-642.
138. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA and Lecka-Czernik B. (2004). Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem

- cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*, 3(6), 379-389. doi: 10.1111/j. 1474-9728.2004.00127.x
139. Morrison SJ and Spradling AC. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 732(4), 598-611. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.038
  140. Mueller SM and Glowacki J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*, 82(4), 583-590.
  141. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, et al. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107(5), 1878-1887. doi: 10.1182/blood- 2005-06-2211
  142. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, et al. (2006). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*, 8(5), 437-444. doi: 10.1080/14653240600920782
  143. Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H, Yee EJ and McCune JM. (1990). Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med*, 172(4), 1055-1063.
  144. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, Francois S, Chapel A, Thierry D, et al. (2008). Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol*, 253(1-2), 16-22. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.06.002
  145. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R and Fibbe WE. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177(A), 2080-2087.
  146. Niemann C and Watt FM. (2002). Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol*, 12(4), 185-192.
  147. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T and Takahashi HE. (1999). Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab*, 77(3), 171-177.
  148. Niwa H, Miyazaki J and Smith AG. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24(4), 372-376. doi: 10.1038/74199
  149. O'Malley J, Woltjen K and Kaji K. (2009). New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Biotechnol*, 20(5), 516-521. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.005
  150. Ogawa K, Matsui H, Ohtsuka S and Niwa H. (2004). A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes Cells*, 9(5), 471-477. doi: 10.1111/j.1356- 9597.2004.00736.x
  151. Olivier V, Fauchaux N and Hardouin P. (2004). Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *Drug Discov Today*, 9(18), 803-811. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03222-2
  152. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M and Basilico C. (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5672-5677.
  153. Osipova EY, Shamanskaya TV, Kurakina OA, Nikitina VA, Purbueva BB, Ustugov AY, et al. (2011). Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells during Ex Vivo Expansion. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 1(3), 11.

154. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 457(7175), 141-146. doi: 10.1038/nature06534
155. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, Salmon M, et al. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*, 26(3), 150-156. doi: 10.1016/j.it.2004.11.014
156. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 283(5403), 845-848.
157. Perdikogianni C, Dimitriou H, Stiakaki E, Martimianaki G and Kalmanti M. (2008). Could cord blood be a source of mesenchymal stromal cells for clinical use? *Cytotherapy*, 10(5), 452- 459. doi: 10.1080/14653240701883079
158. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92( 11), 4857-4861.
159. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, et al. (1998). Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(3), 1142-1147.
160. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109(4), 1422-1432. doi: 10.1182/blood-2006-06-028704
161. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
162. Pittenger MF and Marshak DR. (2001). Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. In DR Marshak, DK Gardner & D Gottlieb (Eds.), *Stem Cell Biology* (1st ed., pp. 349-374). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
163. Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J and Prockop DJ. (2004). Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood*, 103(5), 1647-1652. doi: 10.1182/blood-2003-06-1967
164. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. (2000). Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*, 106(11), 1331-1339. doi: 10.1172/jci10329
165. Potten CS, Booth C and Pritchard DM. (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *IntJ Exp Pathol*, 78(4), 219-243.
166. Ragni E, Vigano M, Parazzi V, Montemurro T, Montelatici E, Lavazza C, et al. (2013). Adipogenic potential in human mesenchymal stem cells strictly depends on adult or foetal tissue harvest. *IntJ Biochem Cell Biol*, 45(11), 2456-2466. doi: 10.1016/j.biocel.2013.07.024
167. Raicevic G, Najar M, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. (2011). The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. *Cell Immunol*, 270(2), 207-216. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.05.010
168. Ramadan AA, Michael MI, Khadre SE, Aziz FA and Hamad SS. (1986). Dedifferentiation and differentiation during hind limb regeneration in *Bufo regularis* Reuss and sources of regenerative blastema formation. *Folia Morphol (Praha)*, 34(4), 377-385.
169. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G and Dazzi F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 83(1), 71-76. doi: 10.1097/01.tp.0000244572.24780.54
170. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B and Ringden O. (2007). Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol*, 65(4), 336-343. doi: 10.1111/j. 1365-3083.2007.01905.x

171. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B and Le Blanc K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*, 305(1), 33-41. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.013
172. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med* (Maywood), 233(7), 901-913. doi: 10.3181/0712-rm-356
173. Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, Saifzadeh S, Krishnakanth P, Berner A, et al. (2012). A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med*, 4(141), 141ra193. doi: 10.1126/scitranslmed.3003720
174. Reiter I, Tzukerman M and Maor G. (2002). Spontaneous differentiating primary chondrocytic tissue culture: a model for endochondral ossification. *Bone*, 37(2), 333-339.
175. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, et al. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*, 5(4), 378-386. doi: 10.1007/s12015-009-9094-9
176. Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA, et al. (2003). Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24(27), 4987-4997.
177. Romanov YA, Svintsitskaya VA and Smirnov VN. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 27(1), 105-110. doi: 10.1634/stemcells.21-1-105
178. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F and Verfaillie CM. (2008). Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*, 374(9), 1937-1944. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.03.006
179. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J and Weissman IL. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447(7145), 725-729. doi: 10.1038/nature05862
180. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, et al. (2007). Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 16(6), 931-952. doi: 10.1089/scd.2007.0036
181. Roy S, Arora S, Kumari P and Ta M. (2014). A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 68(3), 467-472. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.010
182. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, et al. (1995). Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(22), 10119-10122.
183. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW and Stevens CE. (1993). Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 81(7), 1679-1690.
184. Saji Y, Tamura S, Yoshida Y, Kiso S, Iizuka AS, Matsumoto H, et al. (2004). Basic fibroblast growth factor promotes the trans-differentiation of mouse bone marrow cells into hepatic
185. lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors. *J Hepatol*, 47(4), 545-550. doi: 10.1016/j.jhep.2004.06.017
186. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. (2012). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 48(2), 75-83. doi: 10.1007/s11626-011-9480-x
187. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM and Davies JE. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 23(2), 220-229. doi: 10.1634/stemcells.2004-0166

188. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, et al. (2010). Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*, 95(6), 867-874. doi: 10.3324/haematol.2009.011692
189. Schliephake H, Zghoul N, Jager V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, et al. (2009). Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res A*, 90(2), 429-437. doi: 10.1002/jbm.a.32104
190. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ and Azizi SA. (1999). Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther*, 70(15), 2539-2549. doi: 10.1089/10430349950016870
191. Secco M, Moreira YB, Zucconi E, Vieira NM, Jazedje T, Muotri AR, et al. (2009). Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood. *Stem Cell Rev*, 5(4), 387-401. doi: 10.1007/s12015-009-9098-5
192. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG and Prockop DJ. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20(6), 530-541. doi: 10.1634/stemcells.20-6-530
193. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. (2008). Human leukocyte antigen- G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*, 26(1), 212-222. doi: 10.1634/stemcells.2007-0554
194. Selvaggi TA, Walker RE and Fleisher TA. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89(3), 776-779.
195. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP and Brinckmann JE. (2005). In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, 23(9), 1357-1366. doi: 10.1634/stemcells.2005-0094
196. Shetty P, Bharucha K and Tanavde V. (2007). Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 31(3), 293-298. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.11.010
197. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y and Pei D. (2006). Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, 281(33), 23319-23325. doi: 10.1074/jbc.M601811200
198. Shockley KR, Rosen CJ, Churchill GA and Lecka-Czernik B. (2007). PPARgamma2 Regulates a Molecular Signature of Marrow Mesenchymal Stem Cells. *PPAR Res*, 2007, 81219. doi: 10.1155/2007/81219
199. Simonetti AB, Englert GE, Campos K, Mergener M, de David C, de Oliveira AP, et al. (2007). Nanobacteria-like particles: A threat to cell cultures. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 6.
200. Slavin S, Kurkalli BG and Karussis D. (2008). The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosurg*, 110(9), 943-946. doi: 10.1016/j.clineuro.2008.01.014
201. Smith A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441 {7097}, 1060-1060.
202. Smith KP, Luong MX and Stein GS. (2009). Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *J Cell Physiol*, 220(1), 21-29. doi: 10.1002/jcp.21681
203. Song J, Rolfe BE, Hayward IP, Campbell GR and Campbell JH. (2000). Effects of collagen gel configuration on behavior of vascular smooth muscle cells in vitro: association with vascular morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36(9), 600-610. doi: 10.1007/bf02577528

204. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN and Papamichail M. (2006a). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24(1), 74-85. doi: 10.1634/stemcells.2004-0359
205. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN and Papamichail M. (2006b). Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells*, 24(5), 1409-1410. doi: 10.1634/stemcells.2005-0654
206. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN and Papamichail M. (2006c). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 462-471. doi: 10.1634/stemcells.2004-0331
207. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC and Moretta L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), 1327- 1333. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997
208. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC and Moretta L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), 1484- 1490. doi: 10.1182/blood-2005-07-2775
209. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N and Galipeau J. (2006). Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*, 107(6), 2570-2577. doi: 10.1182/blood-2005-07-2793
210. Stenderup K, Justesen J, Clausen C and Kassem M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919-926.
211. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ and Andreeff M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*, 62(13), 3603-3608.
212. Sundin M, Ringden O, Sundberg B, Nava S, Gotherstrom C and Le Blanc K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*, 92(9), 1208-1215.
213. Takahashi K and Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(A), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
214. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*, 129(7), 1377-1388. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.028
215. Tanaka H, Wakisaka A, Ogasa H, Kawai S and Liang CT. (2003). Effects of basic fibroblast growth factor on osteoblast-related gene expression in the process of medullary bone formation induced in rat femur. *J Bone Miner Metab*, 21(2), 74-79. doi: 10.1007/s007740300012
216. Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM and Sankaranarayanan K. (2011). "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int*, 2011, 504723. doi: 10.4061/2011/504723
217. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), 542- 545. doi: 10.1038/nature730
218. Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al. (2003). An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem*, 134(A), 551-558.
219. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.



220. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(17), 7844-7848.
221. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP and Hearn JP. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 55(2), 254-259.
222. Till JE and McCulloch EA. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-222.
223. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danko ES and Scandurro AB. (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*, 26(1), 99-107. doi: 10.1634/stemcells.2007-0563
224. Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, et al. (2008). Bone marrow- derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*, 26(2), 562-569. doi: 10.1634/stemcells.2007-0528
225. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Brandt JE, Hoffman R, Law P, et al. (1994). Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*, 22(2), 215-222.
226. Troyer DL and Weiss ML. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26(3), 591-599. doi: 10.1634/stemcells.2007-0439
227. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ and Hwang SM. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, 19(6), 1450-1456. doi: 10.1093/humrep/deh279
228. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC and Guinan EC. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75(3), 389-397. doi: 10.1097/01.tp.0000045055.63901.a9
229. Tyndall A and Uccelli A. (2009). Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplant*, 43(11), 821-828. doi: 10.1038/bmt.2009.63
230. Uccelli A, Moretta L and Pistoia V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8(9), 726-736. doi: 10.1038/nri2395
231. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(26), 14720-14725. doi: 10.1073/pnas.97.26.14720
232. Vanikar AV, Trivedi HL, Feroze A, Kanodia KV, Dave SD and Shah PR. (2011). Effect of co- transplantation of mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells as compared to hematopoietic stem cell transplantation alone in renal transplantation to achieve donor hypo- responsiveness. *Int Urol Nephrol*, 43(1), 225-232. doi: 10.1007/s11255-009-9659-1
233. Vassilopoulos G, Wang PR and Russell DW. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 422(6934), 901-904. doi: 10.1038/nature01539
234. Vescovi AL, Gritti A, Galli R and Parati EA. (1999). Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells. *J Neurotrauma*, 16(8), 689- 693.
235. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, 100(5), 1611-1618. doi: 10.1182/blood-2002-01-0294
236. Wagner W, Bork S, Horn P, Kronic D, Walenda T, Diehlmann A, et al. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*, 4(6), e5846. doi: 10.1371/journal.pone.0005846
237. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22(7), 1330-1337. doi: 10.1634/stemcells.2004-0013

238. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, et al. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422(6934), 897- 901. doi: 10.1038/nature01531
239. Wang XY, Lan Y, He WY, Zhang L, Yao HY, Hou CM, et al. (2008). Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood*, 777(4), 2436-2443. doi: 10.1182/blood-2007-07-099333
240. Wegmeyer H, Broske AM, Leddin M, Kuentzer K, Nisslbeck AK, Hupfeld J, et al. (2013). Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev*, 22(19), 2606-2618. doi: 10.1089/scd.2013.0016
241. Weinand C, Xu JW, Peretti GM, Bonassar LJ and Gill TJ. (2009). Conditions affecting cell seeding onto three-dimensional scaffolds for cellular-based biodegradable implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 97(1), 80-87. doi: 10.1002/jbm.b.31376
242. Weinberg CB and Bell E. (1986). A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 237(4736), 397-400.
243. Wemig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448(7151), 318-324. doi: 10.1038/nature05944
244. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B and Hows JM. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 727(2), 368-374.
245. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135(G), 1118-1129. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.048
246. Wilson A and Trumpp A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6(2), 93-106. doi: 10.1038/nri1779
247. Winder SJ, Turvey A and Forsyth IA. (1992). Characteristics of ruminant mammary epithelial cells grown in primary culture in serum-free medium. *J Dairy Res*, 59(4), 491-498.
248. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D and Goebel WS. (2009). Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*, 59(2), 150-157. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.06.005
249. Xiao YL, Riesle J and Van Blitterswijk CA. (1999). Static and dynamic fibroblast seeding and cultivation in porous PEO/PBT scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*, 70(12), 773-777.
250. Xu X, Liu Y, Cui Z, Wei Y and Zhang L. (2012). Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation. *J Biotechnol*, 762(2-3), 224-231. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.09.004
251. Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin HJ, Lee M, Song H, et al. (2004). Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy*, 6(5), 476-486. doi: 10.1080/14653240410005041
252. Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, et al. (2013). Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int*, 2013, 428726. doi: 10.1155/2013/428726
253. Yoon KC, You IC, Im SK, Jeong TS, Park YG and Choi J. (2007). Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*, 114(9), 1637- 1642. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.12.014
254. Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, et al. (2004). Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*, 40(1), 1-80. doi: 10.1385/cbb:40:1:1
255. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T- cell anergy. *Blood*, 106(5), 1755-1761. doi: 10.1182/blood-2005-04-1496

256. Zhang M, Mai N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, et al. (2007). SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *Fasebj*, 27(12), 3197-3207. doi: 10.1096/fj.06-6558com
257. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Schantz JT, Fisk NM, Choolani MA, et al. (2009). Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 27(1), 126-137. doi: 10.1634/stemcells.2008-0456
258. Zheng C, Yang S, Guo Z, Liao W, Zhang L, Yang R, et al. (2009). Human multipotent mesenchymal stromal cells from fetal lung expressing pluripotent markers and differentiating into cell types of three germ layers. *Cell Transplant*, 18( 10), 1093-1109. doi: 10.3727/096368909X12483162197042
259. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228. doi: 10.1089/107632701300062859
260. Αναστασόπουλος Σ. (1998). «Παρατηρήσεις επί της μορφογένεσης των πίσω άκρων του άνουρου αμφιβίου *Bufo bufo*, ύστερα από χορήγηση βιταμίνης-Α και περιστροφή κατά 180°», Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής
261. Ando, H., Sawada, Y., Shimizu, H. and Sugiyama, T. (1989). "Pattern formation in Hydra tissue without developmental gradients". *Dev Biol*, 133, 405-414.
262. Βλάχου Αικατερίνη (2006) «Ιστολογική μελέτη υπεράριθμων άκρων σε προνύμφες άνουρων αμφιβίων», Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ
263. Baguna B. (1981). Planarian neoblasts., *Nature (London)* 290: 14-15
264. Balling R. (1991). CRABP and the teratogenic effects of retinoids. *Trends Genet* 7(2):35-6.
265. Basel P. (2007). Wound epidermis formation and function in urodele amphibian limb regeneration L. J. Campbell & C. M. Crews, 2007
266. Beauchemin, M., Del Rio-Tsonis, K., Tsonis, P. A., Tremblay, M., and Savard, P. (1998). "Graded expression of Emx-2 in the adult newt limb and its corresponding regeneration blastema". *J. Mol. Biol.* 279, 501-511.
267. Blomhoff R., Green M. H., Berg T. and Norum K. R. (1990) "Transport and Storage of Vitamin-A". *Science*. 250: 399 - 403.
268. Bollag, W. (1983). "Vitamin-A and retinoids. From nutrition to pharmacology in dermatology and oncology". *Lancet* I:860-863.
269. Bollag W. (1996). The retinoid revolution. Overview. *Faseb J* 10(9):938-9.
270. Brockes J. P. (1994) "New approaches to amphibian limb regeneration". *Trends in Genetics*. 10 (5): 169-173.
271. Brockes J.P., Kumar A. (2002). Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(8):566-574.
272. Bryant S.V., Iten L.E. (1976). Supernumerary limbs in amphibians: experimental production in *Notophthalmus viridescens* and a new interpretation of their formation. *Dev Biol* 50(1 ):212-234.
273. Bryant S.V. (1977): "Pattern regulation in amphibian limbs": Vertebrate limb and somite morphogenesis
274. Bryant S.V., French V., Bryant P.J. (1981). Distal regeneration and symmetry. *Science* 212:993-1002.
275. Bryant S.V. (1982): "Introduction to the Sumposium: Principles and problems of pattern formation in animals". *American Zoologist* 22: 3-5.
276. Bryant S.V., Gardiner D.M. (1992). Retinoic acid, local cell-cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. *Dev Biol* 152(1): 1-25.

277. Campbell L. J., Crews C. M.(2007) "Wound epidermis formation and function in urodele amphibian limb regeneration" *Cell. Mol. Life Sci.*
278. Carlson B.M. (1975). The effects of rotation and positional change of stump tissues upon morphogenesis of the regenerating axoloti limb. *Dev. Biol.* 47:269-291.
279. Cardoso, M. C., Leonhardt, H., and Nadal-Ginard, B. (1993). "Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication". *Cell* 74, 979–992.
280. Chambon P. (1993) "The molecular and genetic dissection of retinoic signalling pathway". *Gene.* 135: 223-228.
281. Chambon P. (1996) "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors". *The FASEB Journal.* 10: 940 - 951.
282. Chambon P. (1999). Maternal vitamin-A is crucial in the development of mouse embryos. Paris, March 26.
283. Chandebois, R. (1980) "The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II. Distalization". *Dev. Growth Diff.* 22, 693.
284. Cormier S.A., Mello M.A., Kappen C. (2003). Normal proliferation and differentiation of Hoxc-8 transgenic chondrocytes in vitro.
285. Cowan C.M., Aalami O.O., Shi Y.Y., Chou Y.F., Mari C., Thomas R., Quarto N., Nacamuli R.P., Contag C.H., Wu B., Longaker M.T. (2005). Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover.
286. Costaridis P., Papageorgiou S., Kiortsis V., Zafeiratos C. (1990): " Types of supernumerary outgrowths produced after inverting the dorsoventral limb axis of the anuran *Bufo bufo*". *Roux's Arch. Dev. Biol* (1991) 200: 104-107.
287. Costaridis P., Zafeiratos C., Kiortsis V., Papageorgiou S. (1988): "Diverse supernumerary structures develop after inverting the anteroposterior limb axis of the anuran *Bufo bufo* ". *Dev.Biol.* 132: 502-511.
288. Cohan, S.Q. (1953) "Excessive intake of vitamin-A as a cause of congenital anomalies in the rat". *Science* 117:535–536
289. Collins, M. D. and Mao, G. E. (1999) "Teratology of Retinoids." *Annual Review of Pharmacological Toxicology.* 39: 399–430
290. Crawford K., Stocum, D.L. (1988). Retinoic acid proximalizes level specific properties responsible for intercalary regeneration in axoloti limbs. *Development* 104: 703 - 713.
291. Crawford K., Vincenti D. M.(1998)"Retinoic acid and thyroid hormone may function through similar and competitive pathways in regenerating axolotls", *J. Exp.Zool.*,vol282(6), Dec.15, 724-738
292. Kimura, Y., Madhavan, M., Call, M. K., Santiago, W., Tsonis, P. A., Lambris, J. D. and Del Rio-Tsonis, K. (2003) "Expression of complement 3 and complement 5 in newt limb and lens regeneration". *J. Immunol.* 170, 2331–2339.]
293. D’Jamoos, C., McMahon, G., and Tsonis, P. A. (1998). "Fibroblast growth factor receptors regulate the ability for limb regeneration in *Xenopus laevis*". *Wound Rep. Reg.* 6, 388–397.
294. De Luca Francesco, Uyeda J.A., Mericq V., Mancilla E.E., Yanovski J.A., Barnes K.M., Zile M.H., Baron J. (2000). Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 141(1):346-53. [2000 οi Francesco De Luca, Jennifer A. Uyeda, Veronica Mericq, Edna E. Mancilla, Jack A. Yanovski, Kevin M. Barnes, Maija H. Zile και Jeffrey Baron ]
295. Denker, L., Annerwall, E., Busch, C. and Erikson, U. (1990). Localisation of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid binding protein (CRABP) in early mouse embryo. *Development* 110, 343-352
296. Desbois, C., Aubert, D., Legrand, C., Pain, B. and Samarut, J. (1991) "A novel mechanism of action for v-ErbA: Abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors" *Cell* 67: 731-740 =[BΛAXOY7]

297. Driesch H. (1908). The science and philosophy of the organisms. Adam and Charles Black, London.
298. Duellman W.E., Trueb L. (1994). Biology of amphibians. Baltimore ; London: Johns Hopkins University Press
299. Duester Gross, Genetic Dissection of Retinoid Signaling Pathway During Development, (2003). Διδακτορική διατριβή.
300. Evans T.R., Kaye S.B. (1999). Retinoids: present role and future potential. Br J Cancer 80(1-2): 1-8.
301. Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptorsuperfamily. Science 240, 889–895.
302. Faber, J. (1971) “Vertebrate limb ontogeny, and limb regeneration: Morphogenetic parallels”. Adv. Morphogenesis: 9, 127 - 147
303. Formelli F., Barua A.B., Olson J.A. (1996). Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. Faseb J 10(9): 1014-1024.
304. French V., Bryant P.J., Bryant S.V. (1976). Pattern regulation in epimorphic fields. Science 193(4257):969-981.
305. Gardiner D.M., Bryant S.V. (1989). Organization of positional information in the axoloti limb. Journal Exp. Zoology 251: 47 - 55.
306. Gardiner D.M., Endo T., Bryant S.V. (2002). The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. Semin Cell Dev Biol 13(5):345-352.
307. Geelen J.A.G. (1979) “Hypervitaminosis-A induced teratogenesis”. CRC Crit. Rev. Toxicol., 6:351–375.
308. Geraudie J. and Ferretti P. (1998) "Gene Expression during Amphibian Limb Regeneration". International Review of Cytology. 180: 1 -43.
309. Ghyselinck, N. B., Dupé, V. Dierich, A., Messaddeq, N., Garnier, J. M., Rochette-Egly, C., Chambon, P. and Mark, M. (1997) “Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development” Develop Biol 41(3):425-447 National Occupational Exposure Survey (1981-1983)
310. Godsave S., Dekker E-J., Holling T., Pannese M. , Boncinelli E. and Durston A. (1994) "Expression Patterns of Hoxb Genes in the Xenopus Embryo Suggest Roles in Anteroposterior Specification of the Hindbrain and in Dorsoventral Patterning of the Mesoderm". Developmental Biology. 166: 465 - 476.
311. [O16] = Goode R.P., 1967 “The regeneration of limbs in adult anurans”. Embryol. exp. Morph., Vol. 18 (2): 259-267]
312. O11a= Goss, R. J. (1969) "Principles of regeneration". Acad. Press, London
313. O11b= Goss, R. J. (1980) “Prospects of regeneration in man”. Clin. Orthop.151, 270–282.
314. Holder N., (1981) “Regeneration and compensatory growth”. Brit. Med. Bulletin: 37, 227 – 232]
315. Hernandez-Lagunas L., Chimal-Monroy J., Diaz de Leon L. (1998) Retinoic acid modulates the expression of integrins in rat sternal chondrocytes in vitro.
316. Illingworth C., 1974, 1978 “Trapped fingers and amputated finger tips in children”. J. Pediatric Surgery: 9, 853 - 858 ]
317. Iten L.E., Bryant S.V. (1975). The interaction between the blastema and stump in the establishment of the anterior—posterior and proximal—distal organization of the limb regenerate. Dev Biol 44(1):119-147.
318. Javois, L.C. and Frazier-Edwards, A. (1991). Simultaneous effects of head activator on the dynamics of apical and basal regeneration in Hydra vulgaris (formally Hydra attenuata). Dev. Biol. 144, 78-85.
319. Javois, L.C. and Tombe, V.K. (1991). Head activator does not qualitatively alter head morphology in regenerates of Hydra-oligactis. Roux’s Arch. Devl. Biol. 199, 402-408.

320. Jiang H., Gyda M., Harnish D. C., Chandraratna R. A., Soprano K. J., Kochhar D. M. and Soprano, D. R. (1994) "Teratogenesis by retinoic acid analogs positively correlates with elevation of retinoic acid receptor beta-2 mRNA levels in treated embryos" *Teratology* 50: 38-43
321. Johnson L. G., Volpe C. T., (1995) *Patterns and Experiments in Developmental Biology*, Brown Publ., Boston
322. Jones, M. K., Tomikawa, M., Mohajer, B., and Tarnawski, A. S. (1999). Gastrointestinal mucosa regeneration: Role of growth factors. *Front. Biosci.* 4, D303–309.]
323. Καραμανλή Ε., (1980) «Συμβολή στη μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Bufo bufo*», Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Ζωολογίας
324. Κομητοπούλου Κ., Κουγιανού – Κουτσούκου, Σ. «Μοριακή Βιολογία Ανάπτυξης» (1999).
325. Kalthoff K. *Analysis of Biological Development* McGraw-Hill, Inc. New York, 1966
326. Kamel A., Ghorab H., Abd-El-Moez Mk., Anwar I., Attiah (1975): "The effect of Vitamin A on the growth of the tail bud of the toad *Bufo regularis* cultivated in vitro". *Bulletin of the faculty of science Assiut Univ.*, 4 (1): 93-100.
327. Kanamori, A. and Brown, D. D. (1992) "The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*" *J. Biol. Chem.* 267: 739-745
328. Kato, K., Orii, H., Watanabe, K. and Agata, K. (1999) "The role of dorsoventral interaction in the onset of planarian regeneration". *Development* 126, 1031–1040
329. Kikonyogo Alexandra, Abriola Darryl P., Dryjanski Marek and Pietruszko Regina (1999) Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist. USA.
330. Kirimoto A., Takagi Y., Ohya K., Shimokawa H. (2005) Effects of retinoic acid on the differentiation of chondrogenic progenitor cells, ATDC5.
331. Kiortsis V., Uehlinger V., Droin A. (1959) Quantitative study of tail regeneration with or without spinal cord in the salamander larva. *Experimentia* 15; 15:311 -3.
332. Kochhar, D. M., Jiang, H., Penner, J. D., Johnson, A. T. and Chandraratna, R. A. (1998) "The use of a retinoid receptor antagonist in a new model to study Vitamin-A-dependent developmental events" *Int. J. Dev. Biol.* 42: 601 – 608
333. Kochhar, D.M. (1973) "Limb development in mouse embryos. I Analysis of teratogenic effects of retinoic acid". *Teratology*, 7:289–298.
334. Korschelt E. (1927) "Regeneration and Transplantation", vol - 1 (Berlin: Borntrager)
335. Koussoulakos S., Sharma K.K., Anton H.J. (1988) Vitamin A induced bilateral asymmetries in *Triturus* forelimb regenerates. *Biol. Struct. Morphog.* 1:43 -48. =[MOYK8]
336. Koussoulakos S., Mina K., Panoutsakopoulou V., Kiortsis V. (1992) "Observations on digit regeneration in the amphibian *Triturus cristatus* after 180° rotation of digit blastemata". *Monogr. Dev. Biol. Basel*, Karger, 23: 157-164.
337. Koussoulakos S., and Anton H. J (1992) "Vitamin A as a probe for investigating growth, differentiation and morphogenesis". *Biol. Bull.*, 18(4): 312-331. =[ΑΝΑΣΤΑΣΟΠ5]
338. Koussoulakos S., Kiortsis V., 1993. Regeneration. *Birth of Experimental Zoology, Physiology, Recent Research Trends. Trends in Comparat Biochem Physiol*:201-218.
339. Κουσουλάκος Σ. (2002). Εισαγωγή στην αναπτυξιακή βιολογία και ιστολογία. Αθήνα.
340. Κουσουλάκος Σ. (2002). Ασκήσεις αναπτυξιακής βιολογίας και ιστολογίας. Αθήνα.
341. Κωσταρίδης Π. (1984) «Δημιουργία υπεράριθμων δακτύλων ύστερα από περιστροφή 180° στο πίσω άκρο του αμφίβιου *Bufo bufo*», Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Ζωολογίας
342. Lotan R.(1996). Retinoids in cancer chemoprevention. *Faseb J* 10(9): 1031-1039
343. Maden M. (1993): "The homeotic transformation of tails into limbs in *Rana temporaria* by retinoids". *Dev. Biol.*, (159)(2): 379-391.
344. Maden M., Hunt P., Eriksson U., Kuroiwa A., Krumlauf R. and Summerbell D. (1991) "Retinoic acid-binding protein, rhombomeres, and the neural crest" *Development* 111: 35-44

345. Maden M. (1982): "Supernumerary limbs in Amphibians". *American Zoologist* 22: 131 – 142
346. Maden M. (1982). Vitamin-A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature* 295(5851):672-675.
347. Maden M. (1983). The effect of Vitamin-A on Limb Regeneration in *Rana temporaria*. *Dev. Biol* 98 : 409 - 416.
348. Ω61 = O30=M.Maden, 1983 [ΣΟΣ],, [Maden & Turner, 1978,,
349. Maden M. (1983). A test of the predictions of the boundary model regarding supernumerary limb structure. *J Embryol Exp Morphol* 76:147-155.
350. Maden M., Goodwin B.C. (1980). Experiments on developing limb buds of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Embryol Exp Morphol* 57:177-87.
351. Maden M., Hind M. (2003). Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Dev Dyn* 226(2):237-244.
352. Maden M., Turner R.N. (1978). Supernumerary limbs in the axolotl. *Nature* 273(5659):232-235.
353. Mahapatra Pk., Mohanty-Hejmadi P.(1994): "Vitamin-A-mediated homeotic transformation of tail to limbs, limb suppression and abnormal tail regeneration in the Indian jumping frog *Polypedates maculatus*". *Dev. Growth & Differ.*, 36(3): 307-317.
354. Marshall H. , Morrison A. , Studer M., Popperl H. and Krumlauf R. (1996) "Retinoids and Hox genes". *The FASEB Journal*. 10: 969 - 979.
355. Marshall H., Studer M., Popperl H., Aparicio S., Kuroiwa A., Brenner S. and Krumlauf, R. (1994) "A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene *Hoxb-1*". *Nature*, 370, 567–571.
356. Martelly I., Franquinet, R. (1984) "Planarian regeneration as a model of cellular activation studies". *Trends Biochem. sciences*: 9, 468 - 471
357. Martinez-Ceballos E., Chambon P., Gudas L.J. (2005). Differences in gene expression between wild type and *Hoxa1* knockout embryonic stem cells after retinoic acid treatment or leukemia inhibitory factor (LIF) removal.
358. Meinhardt H. (1983a) A bootstrap model for the proximodistal pattern formation in vertebrate limbs. *J Embryol Exp Morphol* 76:139-146.
359. Meinhardt H. (1983b) A boundary model for pattern formation in vertebrate limbs. *J Embryol Exp Morphol* 76:115-137.
360. Meinhardt, H., (1993) "A model for pattern formation of hypostome, tentacles and foot in *Hydra*: how to form structures close to each other, how to form them at a distance". *Dev. Biol.* 57: 321 - 333)]
361. Mohanty-Hejmadi P., Dutta Sk., Mahapatra P. (1992) "Limbs regenerated at site of tail amputation in Marbled baloon frog after Vitamin-A treatment". *Nature (London)*, 355 (6358): 352-353.
362. Molotkov, A. and Duester, G. J. (2003) "Genetic Evidence That Retinaldehyde Dehydrogenase Raldh1 (Aldh1a1) Functions Downstream of Alcohol Dehydrogenase Adh1 in Metabolism of Retinol to Retinoic Acid" *Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 38, 36085-36090, September 19
363. Monkemeyer J., Ludolph D. C., Cameron A. and Stocum D. L. (1992) "Retinoic acid - Induced Change in Anteroposterior Positional Identity in Regenerating Axolotl Limbs Is Dose-Dependent". *Developmental Dynamics*. 193: 286 - 294.
364. Morgan T. H., (1901) "Regeneration" (New York: Macmillan)
365. Morgan B.A., Tabin C., (1994) Hox genes and growth: early and late roles in limb bud morphogenesis. *Development suppl*: 181 - 186.
366. Morriss-Kay G.M. and Sokoiova N. (1996) "Embryonic development and pattern formation". *The FASEB Journal*. 10: 961 – 968
367. Morrish-Kay, G. M. (1993) "Retinoic acid and craniofacial development: Molecules and morphogenesis" *BioEssays* 15: 9-15



368. Mukai H. and Makioka T. (1978) "Studies on the regeneration of an Entoproct, *Barentsia discreta*". J. Exp. Zool: 205, 261 - 275
369. Muneoka K., Bryant S.V. (1982) Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. Nature 298(5872):369-371.
370. Muneoka K., Fox W.F., Bryant S.V. (1986) Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. Dev Biol 116(1):256- 260.
371. Muneoka K., Murad E.H. (1987) Intercalation and the cellular origin of supernumerary limbs in *Xenopus*. Development 99(4):521-526.
372. Μαυρόγιαννου Ε. (2003). Αντιπαράθεση ραχιαίων και κοιλιακών τοπικών πληροφοριών κατά την ανάπτυξη του άκρου του άνουρου *Rana temporaria*. Ο ρόλος του ρετινοϊκού οξέος. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Αθηνών.
373. Μουκούλη Μ. (2003). Αντιπαράθεση προσθιοπίσθιων τοπικών πληροφοριών κατά την ανάπτυξη του άκρου του άνουρου *Rana temporaria*. Ο ρόλος του ρετινοϊκού οξέος. Διπλωματική εργασία. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Αθηνών.
374. Nakanishi N., Sakamoto H., Nishikawa M., Hakuba A. (1999) Pathogenesis of encephaloschisis in retinoic-acid-treated hamster embryos I: a morphometric study of the craniofacial structures.
375. Napoli J.L. (1996) "Retinoic acid biosynthesis and metabolism". The FASEB Journal. 10:993- 1001.
376. Needham A. E. (1950). "Determination of the Form of Regenerating Limbs in *Asellus aquaticus*". Quarterly Journal of Microscopical Science, Vol. 91, part 4, December, 1950.]
377. Niazi, I. A., and Saxena, S. (1978). Abnormal hindlimb regeneration in tadpoles of the toad, *Bufo andersoni*, exposed to excess vitamin A. Folia Biol. (Krakow) 26, 3–11.
378. Niazi L., Saxena S. (1979): "Relationship between inhibiting influence of Vitamin-A and developmental stage of regenerating tail in toad tadpoles *Bufo andersonii*". Indian Journal of Experim. Biol., 17 (9): 866-868.
379. Niederreither Karen, Abu-Abed Suzan, Schuhbaur Brigitte, Petkovich Martin, Chambon Pierre & Dollé Pascal (2002). Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. Nature Genetics.
380. Niederreither K., McCaffery P., Drager U.C., Chambon P. and Dolle, P. (1997) "Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development". Mech Dev, 62, 67–78
381. Nogueira A.C., Carvalho R.R., Souza C.A., Chahoud I., Paumgartten F.J. (1995) . Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat.
382. Noguchi H., Kaname T., Sekimoto T., Senba K., Nagata Y., Araki M., Abe M., Nakagata N., Ono T., Yamamura K., Araki K. (2002) "Naso-maxillary deformity due to frontonasal expression of human transthyretin gene in transgenic mice".
383. Nye H.L.D. , Cameron J.A. , Chernoff E. A.G. and Stocum D.L. (2003) "Regeneration of the Urodele Limb: A Review". Developmental Dynamics. 226: 280 -294. =[MAYPO11]
384. Okada T. S. (1996) "A brief history of regeneration research—For admiring Professor Niazi's discovery of the effect of vitamin A on regeneration" J. Biosci., Vol. 21, Number 3, pp 261-271.
385. Okamoto, M. (1986) "Tumor induction and inhibition of lens regeneration in lentecto- mized newt". Growth Differ: 28, 415 (Abstract)
386. Okamoto, M. (1987) "Induction of ocular tumor by nickel subsulfide in the Japanese common newt, *Cynops pyrrhogaster*". Cancer Res: A7, 5213 – 5217]
387. Osumi-Yamashita N., Noji S., Nohno T., Koyama E., Doi H., Eto K., Taniguchi S. (1990) "Expression of retinoic acid receptor genes in neural crest-derived cells during mouse facial development".
388. Papageorgiou S. (1984) "A Hierarchical Polar Coordinate Model for Epimorphic Regeneration". J. theor. Biol. 109: 533 - 554.

389. Pavlov M.I., Sautier J.M., Oboeuf M., Asselin A., Berdal A. (2003) Chondrogenic differentiation during midfacial development in the mouse: in vivo and in vitro studies.
390. Pecorino, L. T., Lo, D. C., and Brockes, J. B. (1994). Isoform-specific induction of a retinoid-specific antigen after biolistic transfection of chimeric retinoic acid/thyroid hormone receptors into a regenerating limb. *Development* 120, 325–333.]//// Pecorino, L. T., Entwistle, A., and Brockes, J. P. (1996). Activation of a single retinoic acid receptor isoform mediates proximodistal respecification. *Curr. Biol.* 6, 563–569.]////
391. Pietsch P. (1987): "The effects of Retinoic Acid on mitosis during tail and limb regeneration in the axolotl larva *Ambystoma mexicanum*". *Roux's Archives of Develop. Biol.*, 196 (3): 169-175.
392. Pietsch P. (1993): "Retinoic Acid treatment inhibits mitosis in the preexisting spinal cord during tail regeneration of the axolotl larva, *Ambystoma mexicanum*". *Cytobios*, 76 (304): 7-11.
393. Pietsch P. (1991). Effects of retinoic acid on the muscle patterns produced during forelimb regeneration in larval salamanders (*Ambystoma*). *Cytobios* 66(264):41-61.
394. Poulin, M. L., Patrie, K. M., Bethelo, M. J., Tassava, R. A., and Chiu, I-M. (1993). "Heterogeneity in the expression of fibroblast growth factor receptor-2 during limb regeneration in the newt (*Notophthalmus viridescens*)". *Development* 119, 353–361.]
395. Prince V.E. (2002) "The Hox Paradox: More Complex(es) Than Imagined". *Developmental Biology*. 249: 1 -15.
396. Pettersen, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). "Multilineage potential of adult mesenchymal cells". *Science* 284, 143–147.]
397. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., and Goff, J. B. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells". *Science* 284, 1168–1170.]
398. Prockop, 1997 [= Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues". *Science* 276, 71–74.]
399. Reginelli et al., 1995 [= Reginelli, A. D., Wang, Y.-Q., Sassoon, D., and Muneoka, K. (1995). "Digit tip regeneration correlates with regions of *Msx1* (Hox 7) expression in fetal and adult mice". *Development* 121, 1065–1076].
400. Ross A.C., Stephensen C.B. (1996). Vitamin-A and retinoids in antiviral responses. *Faseb J* 10(9):979-985.
401. Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C. and De Luca, L.M. (2000) "Retinoids in embryonal development" *Physiol. Rev* 80, 1021-54, 2000, American Physiological Society.
402. Ruberte, E., Dolle, P., Chambon, P. and Morriss-Kay, G. (1991) "Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins-II (CRABP-II). Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos" *Development* 111, 45-60
403. Sakai Yasuo, Meno Chikara, Fujii Hideta, Nishino Jinsuke, Shiratori Hidetaka, Saijoh Yukio, Rossant Janet, Hamada Hiroshi (2002). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo.
404. Saxena S. (1994): Teratogenic effects of Vitamin-A on the ontogenetic development of toad *Bufo andersonii*. *J. Adv.Zool.* 15 (2): 68-75.
405. Scadding S.R. (1987): "Vitamin A inhibits amphibian tail regeneration". *Can. J. of Zool.*, 65 (2): 457-459.
406. Scadding S.R., Maden M. (1994). Retinoic acid gradients during limb regeneration. *Dev Biol* 162(2):608-617.
407. Schilthuis, J. G., Gann, A., and Brockes, J. P. (1993). Chimeric retinoic acid/thyroid hormone receptors implicate RAR- $\alpha$ 1 as mediating growth inhibition by retinoic acid. *EMBO J.* 12, 3459–3466.]

408. Sekiya I., Koopman P., Tsuji K., Mertin S., Harley V., Yamada Y., Shinomiya K., Niguji A., Noda M. (2001) "Transcriptional suppression of Sox9 expression in chondrocytes by retinoic acid".
409. Sessions S.K., Gardiner D.M., Bryant S.V. (1989). Compatible limb patterning mechanisms in urodeles and anurans. *Dev Biol* 131(2):294-301.
410. Stocum D.L. (1991). Limb regeneration: a call to arms (and legs). *Cell* 67(1):5-8.
411. Stocum D.L., Crawford K. (1987). Use of retinoids to analyze the cellular basis of positional memory in regenerating amphibian limbs. *Biochem Cell Biol* 65(8):750-761.
412. Shi Y.B., Fu L., Hsia S.C., Tomita A., Buchholz D. (2001) "Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling during anuran metamorphosis". *Cell Res.*11(4):245-252
413. Σιάπικα Α.Η. (2006). Μελέτη της επίδρασης του ρετινοϊκού οξέος και του αναστολέα του citral, στην ανάπτυξη του ρινικού χόνδρου και του σκελετού εμβρύων του είδους *Mus musculus*. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Αθηνών.
414. Tabin C.J. (1991). Retinoids, homeoboxes, and growth factors: toward molecular models for limb development. *Cell* 66(2): 199-217.
415. Tanaka, E. M., Gann, A. A. F., Gates, P. B., and Brockes, J. P. (1997). "Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein". *J. Cell Biol.* 136, 155–165.]
416. Tanaka, E. M., Drechel, D. N., and Brockes, J. P. (1999). "Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes". *Curr. Biol.* 9, 792–799.]
417. Tam et al., 1995 [= Tam, S. K., Gu, W., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1995). "Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 725, 72–79.]
418. Tassava, R. and Goss, R. J. (1966) "Regeneration rate and amputation level in Fish fins and Lizard tails". *Growth*: 30, 9-21.
419. Tassava, R. A., Johnson-Wint, B. and Gross, J. (1986) "Regenerate epithelium and skin glands of the adult newt react to the same monoclonal antibody". *J. Exp. Zool.* 239, 229–240.
420. Tata J.R. (2006) "Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone". *Mol. Cell. Endocrin.*, 246(1-2):10-20
421. Taylor A.C., Kollros J.J. (1946). Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* 94:7-23.
422. Torok et al., 1998 [= Torok, M. A., Gardiner, D. M., Shubin, N. H., and Bryant, S. V.(1998). "Expression of HoxD genes in developing and regenerating axolotl limbs". *Dev. Biol.* 200, 225–233.
423. Trevino C., Calof A., Muneoka K.(1992) Position specific growth regulation of 3T3 cells in vivo // position-specific regulation of growth occurs in a non-cell autonomous manner and is likely to be mediated by mitogenic signals that are localized within the limb environment.
424. Lo,D. C.,Allen, F. and Brockes, J. P. (1993) "Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7230–7234.]
425. Tsonis P. A. "Regeneration in Vertebrates" = *Developmental Biology* 221, 273–284 (2000)
426. Del Rio-Tsonis K. et al., 1998 [= Del Rio-Tsonis, K., Trombley, M. T., McMahon, G., and Tsonis, P. A. (1998). "Regulation of lens regeneration by fibroblast growth factor receptor-1". *Dev. Dyn.* 213, 140–146.
427. Del Rio-Tsonis, K., Tomarev, S. I., and Tsonis, P. A. (1999). "Regulation of prox-1 during lens regeneration". *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 40, 2039–2045.
428. Tsou, H.C., Xie, X.X., Yao, Y.J., Ping, X.L., Peacocke, M. (1997) "Expression of retinoid X receptors in human dermal fibroblasts" *Exp. Cell Res.* Nov 1;236(2):493-500.----
429. Uyeda T. Q. P., Nagasaki A., Yumura S., 2004 "Multiple parallelisms in animal kytokinesis" *Intern. Review of Cytology*. Vol. 240 (doi: 0074-7696/04)

430. van der Wees, J., Schilthuis, J., Koster, C., Diesveld-Schipper, H., Folkers, G., van der Saag, P., Dawson, M., Shudo, K., van der Burg, B. and Durston, A. "Inhibition of retinoic acid receptor-mediated signalling alters positional identity in the developing hindbrain" *Development*, January 2, 125(3): 545 – 556 (1998)
431. Vandersea M. W., McCarthy R. A., Fleming P., Smith D. (1998) Exogenous Retinoic Acid During Gastrulation Induces Cartilaginous and Other Craniofacial Defects in *Fundulus heteroclitus*.
432. Velloso, C. P., Brockes, J. P., and Jat, P. S. (1998). Immortalization of rat embryo fibroblasts by a 39-untranslated region. *Exp. Cell Res.* 240, 252–262.]
433. Venepally P., Reddy L.G., Sani B.P. (1996). Analysis of the effects of CRABP I expression on the RA-induced transcription mediated by retinoid receptors. *Biochemistry* 35(31):9974-82.
434. Vodyanik Maxim A., Yu Junying, Zhang Xin, Tian Shulan, Stewart Ron, Thomson James A., Slukvin Igor I., (2010), "A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells", *Cell Stem Cell*, vol.7, iss.6, 718-729.
435. Vorontsova M. A., Liosner L. S. D., (1960). "Asexual Propagation and Regeneration". New York: Pergamon Press., Oxford: Pergamon Press. p489]
436. Wallace, H. (1931) "Vertebrate limb regeneration". John Wiley and Sons, Chichester
437. Susan V., Bryant, Endo T. and Gaediner D. M. (2002) *Int. J. Dev. Biol.* 46: 887-896
438. Watanabe T., Goulding E. H., Pratt R. M., (1988) "Alterations in craniofacial growth induced by isotretinoin (13-cis-retinoic acid) in mouse whole embryo and primary mesenchymal cell culture".
439. Webster, W.S., Johnston, M.C., Lammer, E.J. and Sulik, K.S. "Isotretinoin embryopathy and the cranial neural crest: an in vivo and in vitro study". *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 6:211–222. (1986).
440. Wellik D.M., Capecchi M.R. (2003). Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton.
441. Willhite, C.C., and Balogh-Nair, V. "Teratogenic profile of retinylidene-methyl-nitrone and retinol in Swiss-Webster mice. *Teratogenesis Carcinogen*". *Mutagen.*, 5:355–363. (1985).
442. Willhite & Webster et al., 1986
443. Wolf G. (1996). A history of Vitamin-A and Retinoids. *The FASEB Journal* 10:1102-1107.
444. Wolf G. (2002) "The regulation of the thyroid-stimulating hormone of the anterior pituitary gland by thyroid hormone and by 9-cis-retinoic acid". *Nutr. Rev.*60(11):374-377
445. Wolpert L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 25(1): 1-47.
446. Wolpert L. (1970): "Positional information and pattern formation". Towards a theoretical Biology: 198 - 250 Ed. Edinburgh University Press
447. Xu P., Guo X., Zhang Y.G., Li Y.F., Cao J.L., Xiong Y.M. (2005) The effect of retinoic acid on induction of osteoporotic model rats and the possible mechanism .
448. Χατζησταματίου Κ. Θεοφάνης (2015). Διδακτορική Διατριβή «Απομόνωση, επέκταση και ελεγχόμενη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και του ομφάλιου λώρου. Κλινικές εφαρμογές ιστικής ανάπτυξης.» ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ, ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ)
449. Yoshizato K.(2007) "Molecular mechanism and evolutionary significance of epithelial -mesenchymal interactions in the body -and tail- dependent metamorphic transformation of anuran larval skin" *Intern.Rev.Cyt.*,260:213-260
450. Young J.Z. (1981). *The life of vertebrates*. Oxford; Clarendon Press. xv,645p.
451. Yueh Y.G., Gardner D.P., Kappen C. (1998) . Evidence for regulation of cartilage differentiation by the homeobox gene Hoxc-8.
452. Zile Maija H. (2001). *Function of Vitamin-A in Vertebrate Embryonic Development*.

453. Zafeiratou S., Costaridis P., Zafeiratos C. (1989): "Ontogenesis and regeneration of embryonic hindlimb bud of anuran amphibian *Bufo bufo* after transplantation on the tadpole tail". Recent Trends in Regeneration Research (V. Kiortsis, S. Koussoulakos, H. Wallace, Eds), 471-478.
454. Ζαφειράτος, Κ., (1966): «Επίδρασις της νωτιαίας χορδής επί της μορφογένεσεως των άκρων εις τα άνουρα αμφίβια», διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Ζωολογίας.
455. Ζηλάκος Π. Νικόλαος, 1989 Διδακτορική Διατριβή ("Επίδραση καρκινογόνων ουσιών στην αναγέννηση των άκρων του ουροδελούς αμφιβίου *Triturus cristatus*", ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ, ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ)
456. Kalluri R. and Weinberg R. A., 2009 J. Clin. Invest. 119:1420–1428 [doi:10.1172/JCI39104].
457. Kalluri, R., and Neilson, E.G. 2003. Epithelialmesenchymal transition and its implications for fibrosis. J. Clin. Invest. 112:1776–1784.
458. Hay, E.D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. Acta Anat. (Basel). 154:8–20.
459. Lipschutz, J.H. 1998. Molecular development of the kidney: a review of the results of gene disruption studies. Am. J. Kidney Dis. 31:383–397.
460. Rothenpieler, U.W., and Dressler, G.R. 1993. Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. Development. 119:711–720.
461. Hogan, B.L., and Kolodziej, P.A. 2002. Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. Nat. Rev. Genet. 3:513–523.
462. Potenta, S., Zeisberg, E., and Kalluri, R. 2008. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. Br. J. Cancer. 99:1375–1379.
463. Zeisberg, E.M., et al. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. Nat. Med. 13:952–961.
464. Kim, K., Lu, Z., and Hay, E.D. 2002. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. Cell Biol. Int. 26:463–476.
465. 62. Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A., and Hay, E.D. 2005. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. Cells Tissues Organs. 179:11–23.
466. Gibson William T. and Gibson Matthew C. (2009) "Cell Topology, Geometry, and Morphogenesis in Proliferating Epithelia" Current Topics in Developmental Biology, Volume 89 [ISSN 0070-2153, DOI: 10.1016/S0070-2153(09)89004-2]
467. Amonlirdviman, K., Khare, N. A., Tree, D. R., Chen, W. S., Axelrod, J. D., and Tomlin, C. J. (2005). Mathematical modeling of planar cell polarity to understand domineering nonautonomy. Science 307, 423–426.
468. Baena-Lopez, L. A., Baonza, A., and Garcia-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of Drosophila organs. Curr. Biol. 15, 1640–1644.
469. Banerjee, S., Sousa, A. D., and Bhat, M. A. (2006). Organization and function of septate junctions: An evolutionary perspective. Cell Biochem. Biophys. 46, 65–77.
470. Bertet, C., Sulak, L., and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodeling controls planar cell intercalation and axis elongation. Nature 429, 667–671.
471. Bilder, D. (2001). PDZ proteins and polarity: Functions from the fly. Trends Genet. 17, 511–519.
472. Black, S. D., and Vincent, J. P. (1988). The first cleavage plane and the embryonic axis are determined by separate mechanisms in *Xenopus laevis*. II. Experimental dissociation by lateral compression of the egg. Dev. Biol. 128, 65–71.
473. Blankenship, J. T., Backovic, S. T., Sanny, J. S., Weitz, O., and Zallen, J. A. (2006). Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. Dev. Cell 11, 459–470.

474. Brodland, G. W. (2002). The differential interfacial tension hypothesis (DITH): A comprehensive theory for the self-rearrangement of embryonic cells and tissues. *J. Biomech. Eng.* 124, 188–197.
475. Brodland, G. W. (2006). Do lamellipodia have the mechanical capacity to drive convergent extension? *Int. J. Dev. Biol.* 50, 151–155.
476. Brodland, G. W., and Veldhuis, J. H. (2002). Computer simulations of mitosis and interdependencies between mitosis orientation, cell shape and epithelia reshaping. *J. Biomech.* 35, 673–681.
477. Brodland, G. W., and Wiebe, C. J. (2004). Mechanical effects of cell anisotropy on epithelia. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.* 7, 91–99.
478. Chen, H. H., and Brodland, G. W. (2000). Cell-level finite element studies of viscous cells in planar aggregates. *J. Biomech. Eng.* 122, 394–401.
479. Classen, A. K., Anderson, K. I., Marois, E., and Eaton, S. (2005). Hexagonal packing of *Drosophila* wing epithelial cells by the planar cell polarity pathway. *Dev. Cell* 9, 805–817.
480. Cowan, R., and Morris, V. B. (1988). Division rules for polygonal cells. *J. Theor. Biol.* 131, 33–42.
481. de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., and Johnston, L. A. (2004). *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* 117, 107–116.
482. Draviam, V. M., Shapiro, I., Aldridge, B., and Sorger, P. K. (2006). Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells. *EMBO J.* 25, 2814–2827.
483. Dubatolova, T., and Omelyanchuk, L. (2004). Analysis of cell proliferation in *Drosophila* wing imaginal discs using mosaic clones. *Heredity* 92, 299–305.
484. Dubertret, B., and Rivier, N. (1997). The renewal of the epidermis: A topological mechanism. *Biophys. J.* 73, 38–44.
485. Dumais, J. (2007). Can mechanics control pattern formation in plants? *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 58–62.
486. Farhadifar, R., Roper, J. C., Aigouy, B., Eaton, S., and Julicher, F. (2007). The influence of cell mechanics, cell–cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Curr. Biol.* 17, 2095–2104.
487. Fernandez-Minan, A., Martin-Bermudo, M. D., and Gonzalez-Reyes, A. (2007). Integrin signaling regulates spindle orientation in *Drosophila* to preserve the follicular-epithelium monolayer. *Curr. Biol.* 17, 683–688.
488. Flanders, D. J., Rawlins, D. J., Shaw, P. J., and Lloyd, C. W. (1990). Nucleus-associated microtubules help determine the division plane of plant epidermal cells: Avoidance of four-way junctions and the role of cell geometry. *J. Cell Biol.* 110, 1111–1122.
489. Genova, J. L., and Fehon, R. G. (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 161, 979–989.
490. Gibson, M. C., and Perrimon, N. (2003). Apicobasal polarization: Epithelial form and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 747–752.
491. Gibson, M. C., Patel, A. B., Nagpal, R., and Perrimon, N. (2006). The emergence of geometric order in proliferating metazoan epithelia. *Nature* 442, 1038–1041.
492. Glazier, J. A., and Graner, F. (1993). Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics* 47, 2128–2154.
493. Gong, Y., Mo, C., and Fraser, S. E. (2004). Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430, 689–693.
494. Goodbody, K. C., Venverloo, C. J., and Lloyd, C. W. (1991). Laser microsurgery demonstrates that cytoplasmic strands anchoring the nucleus across the vacuole of

- premitotic plant cells are under tension. Implications for division plane alignment. *Development* 113, 931–939.
495. Graner, F., and Glazier, J. A. (1992). Simulation of biological cell sorting using a twodimensional extended Potts model. *Phys. Rev. Lett.* 69, 2013–2016.
  496. Gray, H. (1995). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Medicine and Surgery*. Churchill Livingstone, New York.
  497. Gray, D., Plusa, B., Piotrowska, K., Na, J., Tom, B., Glover, D. M., and Zernicka-Goetz, M. (2004). First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization. *Curr. Biol.* 14, 397–405.
  498. Green, R. A., Wollman, R., and Kaplan, K. B. (2005). APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol. Biol. Cell* 16, 4609–4622.
  499. Grieneisen, V. A., Xu, J., Maree, A. F., Hogeweg, P., and Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449, 1008–1013.
  500. Hamant, O., Heisler, M. G., Jonsson, H., Krupinski, P., Uyttewaald, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlin, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E. M., Couder, Y., and Traas, J. (2008). Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science* 322, 1650–1655.
  501. Hariharan, I. K., and Bilder, D. (2006). Regulation of imaginal disc growth by tumorsuppressor genes in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 40, 335–361.
  502. Honda, H. (1978). Description of cellular patterns by Dirichlet domains: The twodimensional case. *J. Theor. Biol.* 72, 523–543.
  503. Honda, H. (1983). Geometrical models for cells in tissues. *Int. Rev. Cytol.* 81, 191–248.
  504. Honda, H., and Eguchi, G. (1980). How much does the cell boundary contract in a monolayered cell sheet? *J. Theor. Biol.* 84, 575–588.
  505. Honda, H., Yamanaka, H., and Dan-Sohkawa, M. (1984). A computer simulation of geometrical configurations during cell division. *J. Theor. Biol.* 106, 423–435.
  506. Hufnagel, L., Teleman, A. A., Rouault, H., Cohen, S. M., and Shraiman, B. I. (2007). On the mechanism of wing size determination in fly development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3835–3840.
  507. Huzita, H., and Scimemi, B. (1989). The algebra of paper folding (origami). In *Proceedings of the First International Meeting of Origami Science and Technology*, (H. Huzita, ed.), pp. 215–222.
  508. Ingber, D. E. (2006). Cellular mechanotransduction: Putting all the pieces together again. *FASEB J.* 20, 811–827.
  509. Jiang, D., Munro, E. M., and Smith, W. C. (2005). Ascidian prickle regulates both mediolateral and anterior–posterior cell polarity of notochord cells. *Curr. Biol.* 15, 79–85.
  510. Jurgens, G. (2005). Cytokinesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 281–299.
  511. Keys, D. N., Levine, M., Harland, R. M., and Wallingford, J. B. (2002). Control of intercalation is cell-autonomous in the notochord of *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 246, 329–340.
  512. Knust, E., and Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298, 1955–1959.
  513. Korn, R. W., and Spalding, R. M. (1973). The geometry of plant epidermal cells. *New Phytol.* 72, 1357–1365.
  514. Le Borgne, R., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (2002). *Drosophila* E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr. Biol.* 12, 95–104.
  515. Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275–280.



516. Lecuit, T., and Lenne, P. F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 633–644.
517. Lewis, F. T. (1928). The correlation between cell division and the shapes and sizes of prismatic cells in the epidermis of cucumis. *Anatom. Rec.* 38, 341–376.
518. Li, W., and Baker, N. E. (2007). Engulfment is required for cell competition. *Cell* 129, 1215–1225.
519. Lintilhac, P. M., and Vesecky, T. B. (1984). Stress-induced alignment of division plane in plant tissues grown in vitro. *Nature* 307, 363–364.
520. Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* 409, 522–525.
521. Lynch, T. M., and Lintilhac, P. M. (1997). Mechanical signals in plant development: A new method for single cell studies. *Dev. Biol.* 181, 246–256.
522. Ma, D., Amonlirdviman, K., Raffard, R. L., Abate, A., Tomlin, C. J., and Axelrod, J. D. (2008). Cell packing influences planar cell polarity signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18800–18805.
523. Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 640–645.
524. Miri, M., and Rivier, N. (2006). Universality in two-dimensional cellular structures evolving by cell division and disappearance. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 73, 031101.
525. Miyamoto, D. M., and Crowther, R. J. (1985). Formation of the notochord in living ascidian embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 86, 1–17.
526. Mombach, J. C., de Almeida, R. M., and Iglesias, J. R. (1993). Mitosis and growth in biological tissues. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics* 48, 598–602.
527. Morata, G., and Ripoll, P. (1975). Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* 42, 211–221.
528. Nagpal, R. (2001). In *Programmable Self-Assembly: Constructing Global Shape Using Biologically-Inspired Local Interactions and Origami Mathematics* p. 105. Ph.D. Thesis,
529. Department of Electrical Engineering and Computer Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.
530. Nagpal, R. (2002). Programmable pattern-formation and scale-independence. *Proceedings of the Fourth International Conference on Complex Systems (ICCS)*.
531. Newman, T. J. (2005). Modeling multi-cellular systems using sub-cellular elements. *Math. Biosci. Eng.* 2, 611–622.
532. Newman, T. J. (2008). Grid-free models of multicellular systems, with an application to large-scale vortices accompanying primitive streak formation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 81, 157–182.
533. O’Brochta, D. A., and Bryant, P. J. (1985). A zone of non-proliferating cells at a lineage restriction boundary in *Drosophila*. *Nature* 313, 138–141.
534. O’Connell, C. B., and Wang, Y. L. (2000). Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol. Biol. Cell* 11, 1765–1774.
535. Peshkin, M. A., Strandburg, K. J., and Rivier, N. (1991). Entropic predictions for cellular networks. *Phys. Rev. Lett.* 67, 1803–1806.
536. Prusinkiewicz, P., and Lindenmayer, A. (1990). *The Algorithmic Beauty of Plants*. Springer-Verlag, New York.
537. Rauzi, M., Verant, P., Lecuit, T., and Lenne, P. F. (2008). Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 1401–1410.
538. Rivier, N., and Lissowski, A. (1982). On the correlation between sizes and shapes of cells in epithelial mosaics. *J. Phys. A: Math. Gen.* 15, L143–L148.

539. Rivier, N., Schliecker, G., and Dubertret, B. (1995). The stationary state of epithelia. *Acta Biotheor.* 43, 403–423.
540. Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J., and Vale, R. D. (2002). *J. Cell Biol.* 158, 873–884.
541. Saburi, S., Hester, I., Fischer, E., Pontoglio, M., Eremina, V., Gessler, M., Quaggin, S. E., Harrison, R., Mount, R., and McNeill, H. (2008). Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat. Genet.* 40, 1010–1015.
542. Senoo-Matsuda, N., and Johnston, L. A. (2007). Soluble factors mediate competitive and cooperative interactions between cells expressing different levels of *Drosophila* Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18543–18548.
543. Shraiman, B. I. (2005). Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3318–3323.
544. Simpson, P. (1979). Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 69, 182–193.
545. Simpson, P., and Morata, G. (1981). Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* 85, 299–308.
546. Smith, L. G. (2001). Plant cell division: Building walls in the right places. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 33–39.
547. Smith, L. G., Hake, S., and Sylvester, A. W. (1996). The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* 122, 481–489.
548. Smith, R. S., Guyomarc'h, S., Mandel, T., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C., and Prusinkiewicz, P. (2006). A plausible model of phyllotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1301–1306.
549. Speicher, S., Fischer, A., Knoblich, J., and Carmena, A. (2008). The PDZ protein Canoe regulates the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts and muscle progenitors. *Curr. Biol.* 18, 831–837.
550. Strauss, B., Adams, R. J., and Papalopulu, N. (2006). A default mechanism of spindle orientation based on cell shape is sufficient to generate cell fate diversity in polarized *Xenopus* blastomeres. *Development* 133, 3883–3893.
551. Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R., and Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 35, 747–784.
552. Thery, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J. B., and Bornens, M. (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.* 7, 947–953.
553. Thery, M., Jimenez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M., and Julicher, F. (2007). Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* 447, 493–496.
554. Veeman, M. T., Nakatani, Y., Hendrickson, C., Ericson, V., Lin, C., and Smith, W. C. (2008). Chongmague reveals an essential role for laminin-mediated boundary formation in chordate convergence and extension movements. *Development* 135, 33–41.
555. Walker, K. L., Muller, S., Moss, D., Ehrhardt, D. W., and Smith, L. G. (2007). *Arabidopsis* TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Curr. Biol.* 17, 1827–1836.
556. Wallingford, J. B., Rowning, B. A., Vogeli, K. M., Rothbacher, U., Fraser, S. E., and Harland, R. M. (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405, 81–85.
557. Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260, 1124–1127.
558. Weliky, M., Minsuk, S., Keller, R., and Oster, G. (1991). Notochord morphogenesis in *Xenopus laevis*: Simulation of cell behavior underlying tissue convergence and extension. *Development* 113, 1231–1244.

559. Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D., and Luo, L. (2001). *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81–91.
560. Wright, N., and Alison, M. (1984). *The Biology of Epithelial Cell Populations*. Oxford University Press, New York.
561. Wu, V. M., Yu, M. H., Paik, R., Banerjee, S., Liang, Z., Paul, S. M., Bhat, M. A., and Beitel, G. J. (2007). *Drosophila* Varicose, a member of a new subgroup of basolateral MAGUKs, is required for septate junctions and tracheal morphogenesis. *Development* 134, 999–1009.
562. Yamashita, Y. M., Jones, D. L., and Fuller, M. T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301, 1547–1550.
563. Zajac, M., Jones, G. L., and Glazier, J. A. (2003). Simulating convergent extension by way of anisotropic differential adhesion. *J. Theor. Biol.* 222, 247–259.
564. Zallen, J. A., and Zallen, R. (2004). Cell-pattern disordering during convergent extension in *Drosophila*. *J. Phys.: Condens. Matter* 16, S5073–S5080
565. Kim S., Muyun C. and Sascha Hilgenfeldt (2014). Lewis' law revisited: the role of anisotropy in size-topology correlations *New Journal of Physics* 16 [doi:10.1088/1367-2630/16/1/015024]
566. Okabe A, Boots B, Sugihara K and Chiu S N 2009 *Spatial Tessellations: Concepts and Applications of Voronoi Diagrams* vol 501 (Chichester: Wiley)
567. Lyckegaard A, Lauridsen E M, Ludwig W, Fonda R W and Poulsen H F 2011 *Adv. Eng. Mater.* 13 165
568. Richard P, Oger L, Troadec J and Gervois A 2001 *Eur. Phys. J. E* 6 295
569. Clusel M, Corwin E I, Siemens A O N and Brujic J 2009 *Nature* 460 611
570. Torquato S 2002 *Random Heterogeneous Materials: Microstructure and Macroscopic Properties* vol 16 (New York: Springer)
571. Aste T, Di Matteo T, Saadatfar M, Senden T, Schröter M and Swinney H L 2007 *Europhys. Lett.* 79 24003
572. Miklius M P and Hilgenfeldt S 2012 *Phys. Rev. Lett.* 108 015502
573. Newhall K, Jorjadze I, Vanden-Eijnden E and Brujic J 2011 *Soft Matter* 7 11518–25
574. Newhall K A, Pontani L L, Jorjadze I, Hilgenfeldt S and Brujic J 2012 *Phys. Rev. Lett.* 108 268001
575. Lewis F T 1952 *Anat. Rec.* 112 137
576. Lewis F T 1928 *Anat. Rec.* 38 341
577. Lewis F T 1926 *Anat. Rec.* 33 331
578. Lewis F T 1930 *Anat. Rec.* 47 59
579. Lewis F T 1931 *Anat. Rec.* 50 235
580. Chiu S N 1995 *Mater. Charact.* 34 149
581. Rivier N and Lissowski A 1982 *J. Phys. A: Math. Gen.* 15 L143
582. LeCaër G and Ho J 1990 *J. Phys. A: Math. Gen.* 23 3279
583. Mombach J, Vasconcellos M and de Almeida R 1990 *J. Phys. D: Appl. Phys.* 23 600
584. Fortes M 1995 *J. Phys. A: Math. Gen.* 28 1055
585. Quilliet C, Talebi S A, Rabaud D, Käfer S C J and Graner F 2008 *Phil. Mag. Lett.* 88 651
586. Corwin E I, Clusel M, Siemens A O N and Brujic J 2010 *Soft Matter* 6 2949
587. Hilgenfeldt S 2013 *Phil. Mag.* 93 4018–29
588. Classen A, Anderson K, Marois E and Eaton S 2005 *Developmental Cell* 9 805
589. Zhu H 2001 *Phil. Mag. A* 81 2765
590. Carpenter A et al 2006 *Genome Biol.* 7 R100
591. Kametsky L, Jones T R, Fraser A, Bray M-A, Logan D J, Madden K L, Ljosa V, Rueden C, Eliceiri K W and Carpenter A E 2011 *Bioinformatics* 27 1179
592. Dickison W C 2000 *Integrative Plant Anatomy* 1st edn, (New York: Wiley) 16 New J. Phys. 16 (2014) 015024 S Kim et al

593. Gibson M, Patel A, Nagpal R and Perrimon N 2006 Nature 442 1038
594. Brakke K 2005 200 000 000 Random Voronoi Polygons in preparation
595. Miklius M P and Hilgenfeldt S 2011 Eur. Phys. J. E 34 1–13
596. Weaire D and Rivier N 1984 Contemp. Phys. 25 59
597. Weaire D L and Hutzler S 1999 The Physics of Foams (Oxford: Oxford University Press)
598. Graner F, Jiang Y, Janiaud E and Flament C 2000 Phys. Rev. E 63 011402
599. Kraynik A M, Nielsen M K, Reinelt D A and Warren W E 1999 Foams and Emulsions: Proceedings of the school on foams, emulsions and cellular materials (Cargese, May 1997) ed J F Sadoc and N Rivier (Boston, MA: Kluwer) pp 259–86
600. Hilgenfeldt S, Kraynik A M, Koehler S A and Stone H A 2001 Phys. Rev. Lett. 86 2685
601. Hilgenfeldt S, Kraynik A M, Reinelt D A and Sullivan J M 2004 Europhys. Lett. 67 484
602. Hilgenfeldt S, Arif S and Tsai J-C 2008 Phil. Trans. R. Soc. A 366 2145
603. Gordon R and Brodland G W 1987 Cell Biophys. 11 177
604. Taiz L 1984 Annu. Rev. Plant Physiol. 35 585
605. Caille N, Thoumine O, Tardy Y and Meister J-J 2002 J. Biomech. 35 177
606. Manning M L, Foty R A, Steinberg M S and Schoetz E-M 2010 Proc. Natl Acad. Sci. USA 107 12517
607. Hilgenfeldt S, Eriskens S and Carthew R 2008 Proc. Natl Acad. Sci. USA 105 907
608. Gemp I M, Carthew R W and Hilgenfeldt S 2011 Cadherin-dependent cell morphology in an epithelium: constructing a quantitative dynamic model PLoS Comput. Biol. 7 e1002115
609. Brodland G W, Conte V, Cranston P G, Veldhuis J, Narasimhan S, Hutson M S, Jacinto A, Ulrich F, Baum B and Miodownik M 2010 Proc. Natl Acad. Sci. USA 107 2211117
610. SITES
611. [http://champignons.moselle.free.fr/ani/sp/rana\\_temporaria\\_l.jpg](http://champignons.moselle.free.fr/ani/sp/rana_temporaria_l.jpg)
612. <http://www.herpetofauna-nrw.de/images/gf-2.jpg>
613. <http://www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminARetinoLhtml>
614. <http://www.vitaminherbuniversity.com/topic.asp?categoryid=I&topicid=1000>
615. [http://www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox\\_pro/rar.html](http://www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox_pro/rar.html)
616. <http://www.news.comell.edu>
617. <http://zygote.swarthmore.edu/env6.html>
618. [http://www.zoology.ubc.ca/courses/bio204/lab7\\_photos.htm](http://www.zoology.ubc.ca/courses/bio204/lab7_photos.htm)
619. <http://www.devbio.com/chap18/link1805.shtml> [= "The Polar Coordinate Model of Positional Information in the Developing and Regenerating Limb"].
620. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/rana/r.temporariaSnarrative.html>
621. <http://darwin.bio.uci.edu/~mric/index.html>
622. <http://students.biologv.lsa.umich.edu/bio20817/index.html>
623. <http://www.devbio.com/chap18/link1805.shtml>
624. <http://www.mp1-pwrc.usgs.gov/naamp3/index.html>
625. <http://www.msn.com>
626. <http://www.pubmed.com>
627. <http://www.vahoo.com>
628. <http://zygote.swarthmore.edu/env6.html>
629. RA017=17=[www.dietobio.com/vegetarisme/en/vit\\_a.html](http://www.dietobio.com/vegetarisme/en/vit_a.html)
630. RA018=18=[www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminARetinol.html](http://www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminARetinol.html)
631. RA019=19=[www.cas.atate.edu/droganjac/vitaminA.html](http://www.cas.atate.edu/droganjac/vitaminA.html)
632. RA020=20=[www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit\\_0260.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit_0260.shtml)
633. RA021=21=[www.who.int/nut/vad.htm](http://www.who.int/nut/vad.htm)
634. [SIAP1]<http://genex.hgu.mrc.ac.uk/Databases/Anatomy/Diagrams>
635. [SIAP2][www.nature.com/ng/journal/v21/n4/full/ng0499\\_444.html](http://www.nature.com/ng/journal/v21/n4/full/ng0499_444.html)

- 
636. SIAP3<http://zygote.swarthmore.edu/env6.html>
637. [animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus\\_musculus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus.html)
638. [SIAP4][www.brain.riken.go.jp/lobs/lcn/album/000e.html](http://www.brain.riken.go.jp/lobs/lcn/album/000e.html)
639. [SIAP5][www.dietobio.com/vegetarisme/en/vit\\_a.html](http://www.dietobio.com/vegetarisme/en/vit_a.html)
640. [SIAP6][www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminARetinol.html](http://www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminARetinol.html)
641. [SIAP7][www.cyberlipid.org/vita/vita0003.html](http://www.cyberlipid.org/vita/vita0003.html)
642. [SIAP8][www.cas.atate.edu/droganjac/vitaminA.html](http://www.cas.atate.edu/droganjac/vitaminA.html)
643. [SIAP9][www.who.int/nut/vad.htm](http://www.who.int/nut/vad.htm)
644. [SIAP10][www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit\\_0260.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit_0260.shtml)
645. [SIAP11][www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminARetinolcs.html](http://www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminARetinolcs.html)
646. [SIAP12][www.vitaminherbuniversity.com/topic.asp?categoryid=1&topicid=1000](http://www.vitaminherbuniversity.com/topic.asp?categoryid=1&topicid=1000)
647. [teratology.org/pubs/vitamina.htm](http://teratology.org/pubs/vitamina.htm)
648. [SIAP13]<http://www.news.cornell.edu>
649. [SIAP14][www.usc.edu/nsc/dental/ghisto/Cat/d](http://www.usc.edu/nsc/dental/ghisto/Cat/d)
650. [SIAP15][www.zoology.ubc.ca/courses/bio204/lab7\\_photos.htm](http://www.zoology.ubc.ca/courses/bio204/lab7_photos.htm)
651. [SIAP16][www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox\\_pro/zpa.html](http://www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox_pro/zpa.html)
652. [SIAP17][www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox\\_pro/rar.html](http://www.iephb.nw.ru/labs/lab38/spirov/hox_pro/rar.html)
653. [SIAP18][www.nature.com/nature/links/011220/011220-1.html](http://www.nature.com/nature/links/011220/011220-1.html)
654. [SIAP19][www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=dbio.section.5173](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=dbio.section.5173)
655. [SIAP20][www.mindfully.org/Nucs/Chemical-Nuclear/Cadmium-Radiation-Mice1986.htm](http://www.mindfully.org/Nucs/Chemical-Nuclear/Cadmium-Radiation-Mice1986.htm)
656. <http://wc.pima.edu>
657. <http://www.newworldencyclopedia.org>
658. <http://irl.cs.ucla.edu>
659. <http://www.mrothery.co.uk>
660. <http://www.abc.net.au>
661. <http://www.tiem.utk.edu>
662. <http://biologyreference.com>
663. <https://en.wikipedia.org>
-