



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**Β΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
«ΛΑΪΚΟ»**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΝΙΚΗΤΕΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ**

ΔΗΜΟΥ ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ-ΓΕΩΡΓΙΑ

Βιολόγος

Διδακτορική Διατριβή

ΑΘΗΝΑ 2020



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Β΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
«ΛΑΪΚΟ»**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΝΙΚΗΤΕΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ**

ΔΗΜΟΥ ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ-ΓΕΩΡΓΙΑ

Βιολόγος

Διδακτορική Διατριβή

ΑΘΗΝΑ 2020

Ημερομηνία Αιτήσεως: 31-10-2014

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 22-12-2014

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Τόμος Περικλής

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής Θώρακος Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθυντής της Πανεπιστημιακής Θωρακοχειρουργικής Κλινικής του ΕΚΠΑ στο «Αττικόν».

2. Κουράκλης Γρηγόριος

Καθηγητής Χειρουργικής, πρώην Διευθυντής της Β΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής.

3. Δημητρούλης Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, Β΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

Ημερομηνία Ορισμού Θέματος: 08-06-2015

Ημερομηνία Κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 04-12-2019

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών : Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Εφταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Τόμος Περικλής

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής Θώρακος Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθυντής της Πανεπιστημιακής Θωρακοχειρουργικής Κλινικής του ΕΚΠΑ στο «Αττικόν».

2. Κουράκλης Γρηγόριος

Καθηγητής Χειρουργικής, πρώην Διευθυντής της Β΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής.

3. Νικητέας Νικόλαος

Καθηγητής Χειρουργικής, Διευθυντής της Β΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής.

4. Κόντζογλου Κωνσταντίνος

Καθηγητής Χειρουργικής, Β΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

5. Αντωνίου Ευστάθιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, Β΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

6. Δημητρούλης Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, Β΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

7. Τσουρούφλης Γεράσιμος

Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής, Β΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: Άριστα

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Dimou Z, Michalopoulos E, Katsimpoulas M, Dimitroulis D, Kouraklis G, Stavropoulos-Giokas C and Tomos P. **Evaluation of a Decellularization Protocol for the Development of a Decellularized Tracheal Scaffold**. Anticancer Res. 2019 Jan; 39 (1):145-150.

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

1. **Βραβείο 2^{ης} καλύτερης αδημοσίευτης εργασίας** με τίτλο «ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ» στα πλαίσια του 2^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Νοσημάτων Θώρακος και Παθήσεων από το Περιβάλλον.
2. **Βραβείο ηλεκτρονικά αναρτημένης ανακοίνωσης** στην εργασία με τίτλο «ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ» στα πλαίσια του 11ου Πανελληνίου Συνεδρίου Χειρουργών Θώρακος-Καρδιάς-Αγγείων.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

A) ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ

- **1-2 Ιουνίου 2018: 3^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.**
Η ΧΡΗΣΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟ ΜΟΣΧΕΥΜΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.
Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμπούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.
- **10-13 Νοεμβρίου 2016: 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος και Παθήσεων από το Περιβάλλον.**
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.
Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμπούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

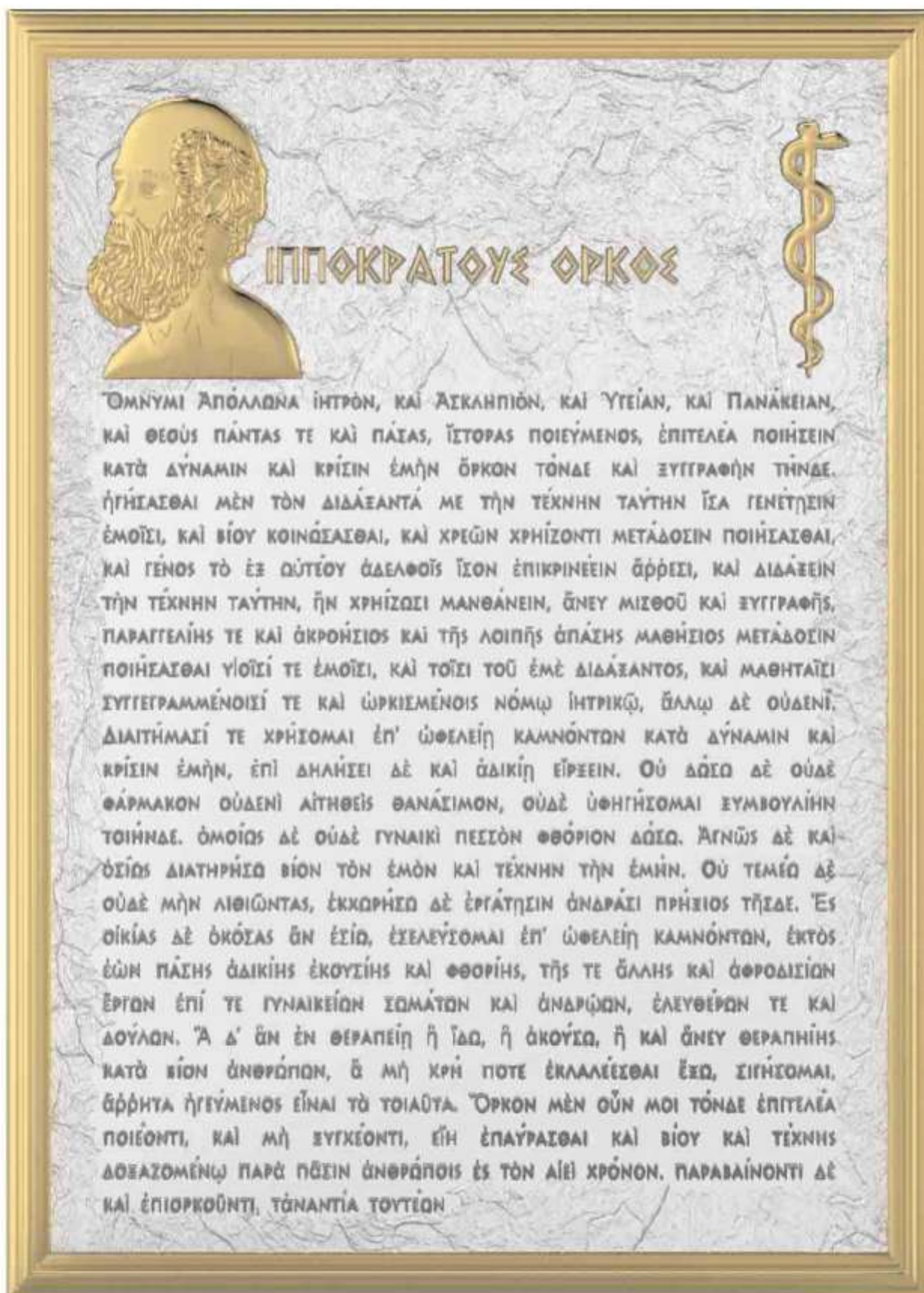
B) ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ

- **26-27 Μαΐου 2017: 2^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.**
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΥ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.
Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμπούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

- **11-14 Μαΐου 2017: 1st Hellenic Chinese Congress on Health.**
INVESTIGATION OF TRACHEA AS A POSSIBLE SCAFFOLD FOR THE TREATMENT OF SERIOUS RESPIRATORY DISEASES.
Z. Dimou, E. Michalopoulos, M. Katsiboulas, P. Tomos, C. Stavropoulos-Giokas.

- **24-26 Νοεμβρίου 2016: 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργών Θώρακος-Καρδιάς-Αγγείων.**
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.
Z. Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμπούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

- **23-24 Σεπτεμβρίου 2016: 1^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.**
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.
Z. Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Π.Τόμος, Μ.Κατσιμπούλας, Ι.Γόντικα, Π.Μαλλής, Θ.Χατζησταματίου, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.



Βιογραφικό Σημείωμα

Όνοματεπώνυμο	: Δήμου Ζαχαρούλα-Γεωργία
Πατρώνυμο	: Γεώργιος
Ημερομηνία Γέννησης	: 23/06/1986
Διεύθυνση κατοικίας	: Ποσειδώνος 2, Ν. Ηράκλειο (Αττική)
Τηλέφωνα επικοινωνίας	: 210-2790533 κιν: 6976187201
E-mail	: dimou.zeta@gmail.com

1. ΣΠΟΥΔΕΣ

2014: Υποψήφια Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα « Παραγωγή Ικρίωματος Τραχείας για την Αντιμετώπιση Σοβαρών Παθήσεων της Αναπνευστικής Οδού».

2010-2011: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ) στην Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό άριστα (9.18).

2004–2009: Πτυχίο Βιολογίας στην κατεύθυνση Βιομοριακών Επιστημών και Βιοτεχνολογίας της σχολής Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών Πανεπιστημίου Κρήτης με βαθμό Λίαν Καλώς (6.97).

2004: Αποφοίτηση από το 4ο Ενιαίο Λύκειο Ηρακλείου Αττικής με βαθμό 18.

2. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Proficiency (University of Michigan).

Γαλλικά: Diplome d'etudes en langue francaise 2eme degre.

3. ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ-ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Γνώσεις Υπολογιστών: ECDL Core Certificate (Βασικές Έννοιες της Πληροφορικής, Χρήση του Η/Υ και Διαχείριση Αρχείων, Επεξεργασία Κειμένου, Υπολογιστικά Φύλλα, Βάσεις Δεδομένων, Παρουσιάσεις, Υπηρεσίες Διαδικτύου).

4. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

09/2013 έως σήμερα: Εργασία στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α) και την Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (Ελ.Τ.ΟΠ.Α)

- Περιγραφή θέσης Το αντικείμενο εργασίας είναι η επεξεργασία και κρυσυντήρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων προερχόμενα από μονάδες ομφαλοπλακουντιακού αίματος (ΟΠ.Α) καθώς επίσης και η απομόνωση, καλλιέργεια και κρυσυντήρηση

Μεσεγγυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων προερχόμενα από την Βαρτόναιο γέλη, λιπώδη ιστό και μυελό των οστών σε Δωμάτια «Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής» (Good Manufacturing Practices rooms- GMP rooms). Επιπλέον, κατά το ανωτέρω χρονικό διάστημα, αντικείμενο εργασίας αποτελεί η αξιολόγηση και επεξεργασία μονάδων ΟΠ.Α για απομόνωση και κατάψυξη του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια, η αξιολόγηση δημιουργίας γέλης των αιμοπεταλίων, η δημιουργία συσκευασίας τελικού προϊόντος με πρωτόκολλο αποστολής του και η προετοιμασία παραδοτέων που αφορούν στο παραπάνω ερευνητικό έργο. Μέρος της απασχόλησης αποτελεί ο έλεγχος ποιότητας των μονάδων ομφαλοπλακουντιακού αίματος και των Μεσεγγυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων (καταμέτρηση αιμοποιητικών κυττάρων, τυποποίηση ABO/Rh μονάδων ομφαλικού αίματος, βακτηριακό έλεγχο των δειγμάτων, κυτταρομετρία ροής, τεχνικές διαφοροποίησης και κυτταρομετρικός έλεγχος των MSCs) καθώς επίσης και ο συντονισμός της επικοινωνίας της Ελ.Τ.ΟΠ.Α. με Μεταμοσχευτικά Κέντρα και Δεξαμενές δοτών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, με τελικό στόχο την επιλογή της καταλληλότερης μονάδας ομφαλικού αίματος για μεταμόσχευση σε οποιονδήποτε ασθενή-λήπτη.

31/3/2014-31/7/2014: Εργασία στο κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης Serum A.E.

05/2012-12/2012 : Εκπαίδευση ως εμβρυολόγος στο εργαστήριο εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) της Μονάδας Γονιμότητας της Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής ΡΕΑ.

2010-2011: Μεταπτυχιακό ερευνητικό έργο και εκπαίδευση σε τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης, μοριακής βιολογίας και κυτταροκαλλιέργειών στο εργαστήριο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

09/2008 έως 02/2009: Έρευνα και εκπαίδευση σε κυτταροκαλλιέργειες στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

02/2008 έως 05/2008: Πρακτική εξάσκηση σε τεχνικές μοριακής βιολογίας και γενετικής στο εργαστήριο Μοριακής Βάσης Νευρολογικών Νοσημάτων (Νευρολογία) του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

01/07/2006 έως 30/07/2006: Εθελοντική πρακτική εξάσκηση στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του 1ου Νοσοκομείου Ι.Κ.Α.-Ε.Τ.Α.Μ.

01/03/2006 έως 31/05/2006: Πρακτική εξάσκηση σε τεχνικές μοριακής βιολογίας και γενετικής στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας του Ηρακλείου Κρήτης.

5. ΣΥΝΕΧΗΣ ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ

A. ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

20/08/2018: ΣΧΟΛΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ISO

20/08/2018: ISO 9001 και Διαχείριση Ποιότητας

19/08/2018: ISO 14001 και Περιβαλλοντική Ασφάλεια

18/08/2018: Εισαγωγή στο ISO 22000 & HACCP

31/01/2017: Ενδοεπιχειρησιακή Εκπαίδευση με θέμα «Ειδικές Απαιτήσεις Διαπίστευσης σύμφωνα με το πρότυπο ISO 15189:2012 Εσωτερικές Επιθεωρήσεις».

25/11/2016: Πανελλήνια Ημερίδα Ιστορίας της Ιατρικής «Η Ιστορία της Φυσιολογίας από τους Προσωκρατικούς Φιλοσόφους μέχρι τον Γαληνό».

03/11/2012: Επιστημονική Ημερίδα στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή «Σύγχρονες Απόψεις στην Εξωσωματική Γονιμοποίηση».

20 Απριλίου 2010: Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης στη Μαιευτική και Γυναικολογία με θέμα «Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας-Πτωχές απαντήτριες». Πανεπιστήμιο Αθηνών-Νοσοκομείο “Αλεξάνδρα” Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική.

06/07/2009-17/07/2009: Θερινό Σχολείο Προσανατολισμού και Ενημέρωσης στις τελευταίες εξελίξεις στην Έρευνα και την Τεχνολογία το οποίο πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

2009–2010: Διαλέξεις Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στη Μαιευτική και Γυναικολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών – Αρεταίειο Νοσοκομείο Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική.

10/2008 – 07/2009: Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

B. ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1-2 Ιουνίου 2018: 3^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.

2-4 Νοεμβρίου 2017: 28^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο.

26-27 Μαΐου 2017: 2^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.

11-14 Μαΐου 2017: 1st Hellenic Chinese Congress on Health.

24-26 Νοεμβρίου 2016: 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργών Θώρακος-Καρδιάς-Αγγείων.

10-13 Νοεμβρίου 2016: 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος και Παθήσεων από το Περιβάλλον.

23-24 Σεπτεμβρίου 2016: 1^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.

1-3 Ιουλίου 2015: Scientific Symposium: 10 years Hellenic Cord Blood Bank-FACT Cellular Therapy/Regenerative Medicine Workshop.

4-7 Απριλίου 2012: 39ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού.

- 10-12 Δεκεμβρίου 2010: 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο γονιμότητας και Στεριότητας.
- 17-18 Σεπτεμβρίου 2010: 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδικής και Εφηβικής Γυναικολογίας.
- 29-30 Μαΐου 2010: Δημερίδα με θέμα «20 Χρόνια Προεμφυτευτική Διάγνωση».
- 28-31 Μαΐου 2009: 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας στην Αθήνα.
- 17-19 Οκτωβρίου 2008: 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδομητρίωσης και 3ο Συμπόσιο Ενδοσκόπησης στο Ηράκλειο Κρήτης.

6. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ

ΣΥΝΕΔΡΙΑ Α) ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ

1-2 Ιουνίου 2018: 3^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.

Η ΧΡΗΣΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟ ΜΟΣΧΕΥΜΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.

Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

10-13 Νοεμβρίου 2016: 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος και Παθήσεων από το Περιβάλλον.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.

Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

4-7 Απριλίου 2012: 39ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ IN VITRO ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ, ΣΤΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ, ΣΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ.

Α. Κορακάκη, Ε. Κιαπέκου, Ε. Ζαπάντη, **Z.-Γ. Δήμου**, Γ. Μαστοράκος, . Λουτράδης.

17-20 Μαΐου 2012: 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο στη Μαιευτική και Γυναικολογία.

Η ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ Η ΓΚΡΕΛΙΝΗ ΠΡΟΩΘΟΥΝ ΤΗΝ IN VITRO ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ, ΤΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ, ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ.

Κορακάκη Α., **Δήμου Z.-Γ.**, Κιαπέκου Ε., Ζαπάντη Ε., Λουτράδης .

B) ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ

26-27 Μαΐου 2017: 2^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΥ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.

Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμπούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

11-14 Μαΐου 2017: 1st Hellenic Chinese Congress on Health.

INVESTIGATION OF TRACHEA AS A POSSIBLE SCAFFOLD FOR THE TREATMENT OF SERIOUS RESPIRATORY DISEASES.

Z. Dimou, E. Michalopoulos, M. Katsiboulas, P. Tomos, C.Stavropoulos-Giokas.

24-26 Νοεμβρίου 2016: 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργών Θώρακος-Καρδιάς-Αγγείων.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.

Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Μ.Κατσιμπούλας, Π.Τόμος, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

23-24 Σεπτεμβρίου 2016: 1^ο Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.

Z.Δήμου, Ε.Μιχαλόπουλος, Π.Τόμος, Μ.Κατσιμπούλας, Ι.Γόντικα, Π.Μαλλής, Θ.Χατζησταματίου, Α.Σταυροπούλου-Γκιόκα.

7. ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

Βραβείο 2^{ης} καλύτερης αδημοσίευτης εργασίας με τίτλο «ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ» στα πλαίσια του 2^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Νοσημάτων Θώρακος και Παθήσεων από το Περιβάλλον.

Βραβείο ηλεκτρονικά αναρτημένης ανακοίνωσης στην εργασία με τίτλο «ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΟΒΑΡΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ» στα πλαίσια του 11ου Πανελλήνιου Συνεδρίου Χειρουργών Θώρακος-Καρδιάς-Αγγείων.

8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Mallis P, Gontika I, **Dimou Z**, Panagouli E, Zoidakis J, Makridakis M, Vlahou A, Georgiou E, Gkioka V, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E **Short Term Results of Fibrin Gel Obtained from Cord Blood Units: A Preliminary in Vitro Study**. Bioengineering (Basel). 2019 Aug 2; 6(3).

Protogerou V, Michalopoulos E, Mallis P, Gontika I, **Dimou Z**, Liakouras C, Stavropoulos-Giokas C, Kostakopoulos N, Chrisofos M, Deliveliotis C. **Administration of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet Lysate in Erectile Dysfunction: A Single Center Pilot Study**. Bioengineering (Basel). 2019 Mar 5; 6(1).

Dimou Z, Michalopoulos E, Katsimpoulas M, Dimitroulis D, Kouraklis G, Stavropoulos-Giokas C and Tomos P. **Evaluation of a Decellularization Protocol for the Development of a Decellularized Tracheal Scaffold**. Anticancer Res. 2019 Jan; 39 (1):145-150.

9. ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Διπλωματική Εργασία στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και Αναγεννητικής Ιατρικής, Α΄ Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική, Νοσοκομείο Αλεξάνδρα με τίτλο «Μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης, γκρελίνης και μεταφορμίνης στην in vitro ωρίμανση ωαρίων επίμυων και στη στεροειδογένεση σε βραχείας διάρκειας καλλιέργειες ωαρίων επίμυων».

Διπλωματική Εργασία στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο «Σύγκριση της πολλαπλασιαστικής και της μολυσματικής ικανότητας 20 στελεχών του Πρωτόζωου παράσιτου *Leishmania infantum* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Συσχέτιση των χαρακτηριστικών αυτών με την κλινική εικόνα της νόσου».

10. ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

Γκιόκα Σταυροπούλου Αικατερίνη: Διευθύντρια Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, Τηλ: +30-2106597340, Φαξ: +30-2106597342, Κιν: +30-6946462242, e-mail: estavrop@bioacademy.gr

Μιγαλόπουλος Ευστάθιος: Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Β', Υπεύθυνος Ελέγχου Ποιότητας, Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών Τηλ: +30-2106597331, Φαξ: +30-2106597342, Κιν: +30-6977986966, e-mail: smichal@bioacademy.gr

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (Ελ.Τ.ΟΠ.Α) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθήνας. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη διευθύντρια της Ελ.Τ.ΟΠ.Α, κα Αικατερίνη Σταυροπούλου- Γκικόκα, που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την παρούσα διατριβή καθώς και για την υπιστήριξή της σε αυτή την προσπάθεια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον συνάδελφο Δρ. Μιχαλόπουλο Ευστάθιο, υπεύθυνο ποιοτικού ελέγχου καθώς επίσης και επιβλέποντα του ερευνητικού τμήματος της Ελ.Τ.ΟΠ.Α για τη συνολική του βοήθεια, την επίβλεψη, την καθοδήγηση και εμπιστοσύνη για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ. Κατσιμπούλα Μιχάλη για τη βοήθεια και την ενεργή συμμετοχή του στο χειρισμό των ζωικών μοντέλων και στα πειράματα μεταμόσχευσης που έλαβαν χώρα στη παρούσα μελέτη.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του καθώς και για την άριστη συνεργασία μας, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Τόμο Περικλή, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής Θώρακος Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Πανεπιστημιακής Θωρακοχειρουργικής Κλινικής του ΕΚΠΑ στο «Αττικόν», καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Κουράκλη Γρηγόριο, Καθηγητή Χειρουργικής και πρώην Διευθυντή της Β΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής και κ. Δημητρούλη Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, της Β΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου και τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξαν για όλο αυτό το διάστημα καθώς χωρίς τη στήριξή τους θα ήταν δύσκολη η ολοκλήρωση του επιστημονικού μου αυτού έργου. Η συμβολή και η βοήθειά τους πάντα αποτελούν κίνητρο για την επίτευξη των στόχων μου.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα διατριβή στη μνήμη της γιαγιάς μου Καλλιρρόης, την οποία ποτέ δεν ξεχνώ, καθώς η παρότρυνση και η βοήθειά της αποτέλεσαν την κινητήριου δύναμή μου για την πραγματοποίηση αυτού του έργου.

Στη γιαγιά μου Καλλιρρόη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναγεννητική ιατρική είναι ένας εξελισσόμενος τομέας που συνδυάζει την ιστομηχανική και τις κυτταρικές θεραπείες και θεωρείται πλέον ότι μπορεί να ανοίξει νέες προοπτικές για ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον στην ιατρική επιστήμη. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η παραγωγή ικριώματος τραχείας για την αντιμετώπιση σοβαρών παθήσεων της αναπνευστικής οδού χωρίς τη χρήση βιοαντιδραστήρα. Ο επίκτητος ή ιατρογενής τραυματισμός των αεραγωγών και συγκεκριμένα της τραχείας είναι σχετικά συχνός και θεωρείται θανατηφόρος για τον ασθενή. Ως εκ τούτου, η αποκατάσταση/αντικατάσταση τμημάτων της τραχείας εξαιτίας είτε τραυματισμού είτε βλάβης είτε συγγενούς ανωμαλίας και η ενίσχυση της αναγεννητικότητας των ιστών συνεχίζει να αποτελεί ευρύ ερευνητικό πεδίο.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης αφαιρέθηκαν οι τραχείες από επίμυες και αποκυτταροποιήθηκαν με ήδη εφαρμοσμένα πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η απουσία γενετικού υλικού και η διατήρηση της μορφολογίας του ιστού. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης με ιστολογικό, ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο των ικριωμάτων.

Πραγματοποιήθηκαν χρώσεις των ιστών με Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη, Τολουιδίνη μπλε, τρίχρωμη χρώση (Masson's Trichrome), Elastic Van Gieson και 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Έπειτα, ποσοτικοποιήθηκαν το DNA, οι γλυκοζαμινογλυκάνες και η υδροξυπρολίνη τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε αποκυτταροποιημένες τραχείες. Επίσης, έγινε ποιοτική αξιολόγηση των ιστών με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Οι παραπάνω έλεγχοι επιβεβαίωσαν την απομάκρυνση πυρηνικών και κυτταρικών στοιχείων του ιστού ενώ παράλληλα έδειξαν τη διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας των ικριωμάτων.

Εμβιομηχανικός έλεγχος πίεσης-επιμήκυνσης (Ultimate Tensile Strength-UTS) εφαρμόστηκε σε χόνδρινους δακτυλίους και λωρίδες εγγενούς και αποκυτταροποιημένου ιστού. Ο αποκυτταροποιημένος ιστός εμφάνισε σημαντικά αυξημένη παραμόρφωση αστοχίας αλλά μειωμένη τάση αστοχίας και μέγιστο μέτρο ελαστικότητας σε σύγκριση με τον εγγενή ιστό, μόνο στη διαμήκη κατεύθυνση. Δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των εγγενών και των αποκυτταροποιημένων τραχειών στην περιφερειακή κατεύθυνση. Στις εγγενείς τραχείες, μεγαλύτερες τιμές παραμέτρων βρέθηκαν κατά μήκος σε σχέση με την περιφέρεια, με όλες τις

κατευθυντήριες διαφορές να έχουν μεγάλη στατιστική σημασία. Σε αντίθεση με τις εγγενείς τραχείες, δεν υπήρχαν διαφορές στην κατεύθυνση όσον αφορά στην τάση αστοχίας στις αποκυτταροποιημένες τραχείες, ενώ η παραμόρφωση αστοχίας ήταν σημαντικά υψηλότερη κατά μήκος και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας ήταν σημαντικά υψηλότερο περιφερειακά-εγκάρσια. Οι εμβιομηχανικές δοκιμές αποκάλυψαν ορισμένες διαφορές στις παραμέτρους αστοχίας μεταξύ εγγενών και αποκυτταροποιημένων τραχειών, υποδηλώνοντας ότι οι τελευταίες ήταν σημαντικά ασθενέστερες και πιο μαλακές αλλά πιο εκτάσιμες από τις πρώτες, αν και μόνο κατά μήκος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε *in vitro* κυτταροτοξικός έλεγχος των ικριωμάτων με τη χρήση ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων (hMSCs). Παρατηρήθηκε επιτυχής ανάπτυξη των κυττάρων γύρω από το αποκυτταροποιημένο ικρίωμα υποδηλώνοντας την απομάκρυνση μεγάλου μέρους των τοξικών βιολογικών και χημικών στοιχείων που θα ανέστειλλαν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη.

Τέλος, μετά τη διεξαγωγή των ανωτέρω ελέγχων, πραγματοποιήθηκε *in vivo* δοκιμασία ελέγχου βιοσυμβατότητας και επανακυτταροποίησης του αποκυτταροποιημένου ικριώματος σε επίμυες (n=8) για χρονικό διάστημα 1 μήνα. Οι αποκυτταροποιημένες τραχείες εμφυτεύτηκαν στη ράχη επίμυων ενώ βιοψίες λήφθηκαν ώστε να ελεγχθεί η επανακυτταροποίηση της τραχείας και η ανοσολογική απόκριση. Μετά την ευθανασία των επίμυων διεξήχθη ιστολογικός και φαινοτυπικός έλεγχος στους εμφυτευμένους ιστούς. Πραγματοποιήθηκε σήμανση με τους ανοσολογικούς δείκτες CD3, CD4, CD11-b και S100 καθώς και χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη για επιβεβαιωτικό έλεγχο. Στις αποκυτταροποιημένες τραχείες δε φάνηκε καθόλου έκφραση του δείκτη CD4 ενώ πολύ μικρή ήταν η παρουσία των CD3 και CD11b. Επομένως, οι αποκυτταροποιημένες τραχείες που εμφυτεύτηκαν παρουσίασαν μικρή ανοσολογική απάντηση γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης (H&E). Επίσης παρατηρήθηκε η έκφραση του S100 και η παρουσία κυττάρων που προσομοιάζουν ινοβλάστες, χαρακτηριστικό αναγέννησης και επανακυτταροποίησης του ιστού. Ο χόνδρινος ιστός παρουσίασε στοιχεία ανάπτυξης και αναγέννησης υποδεικνύοντας πως ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαντιδραστήρας για να αποκατασταθεί η δομή και η λειτουργία του ιστού Τα παραπάνω υποδεικνύουν την έναρξη ιστικής

αναγέννησης και την ύπαρξη χαμηλής ανοσογονικότητας του αποκυτταροποιημένου ικρίωματος.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η δημιουργία ενός κυτταρικού, ιστομηχανικού αεραγωγού μέσω αποκυτταροποίησης και επανακυτταροποίησης, χωρίς τη χρήση βιοαντιδραστήρα, ο οποίος να μπορεί να έχει τη δομή και τη λειτουργία του εγγενούς ιστού χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος ανοσολογικής απόκρισης. Αυτή η έρευνα είχε ως σκοπό να αξιολογήσει το αποκυτταροποιημένο ικρίωμα και να μελετήσει αν ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαντιδραστήρας για να αποκατασταθεί η δομή και η λειτουργία του ιστού ώστε στο μέλλον να υπάρχουν επιτυχείς λειτουργικές λύσεις για σοβαρές κλινικές διαταραχές της αναπνευστικής οδού.

SUMMARY

Regenerative medicine is an evolving domain that combines tissue engineering and cell therapies and is now considered that may open up new prospects for a promising future in medical science. The aim of this thesis is to produce tracheal scaffold in order to treat serious diseases of the respiratory system without the use of bioreactor. The acquired or iatrogenic injury of the airways and particularly of trachea is relatively common and is considered to be deadly for the patient. Therefore, the reconstruction/replacement of portions of the trachea due to injury, damage or congenital anomaly and the need to strengthen tissue regeneration are still a wide field of research.

To carry out the present study, rat tracheas were resected and decellularised with protocols that have already been used before. The absence of genetic material and the maintenance of the tissue morphology were then tested. The test was performed by evaluation of decellularisation through histological, quantitative and qualitative control of scaffolds.

Trachea tissues were stained with Hematoxylin-Eosin, Toluidine Blue, Masson's Trichrome, Elastic Van Gieson and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Furthermore, DNA, glycosaminoglycans and hydroxyproline were quantitated in both native and decellularised tracheas. Also, a qualitative evaluation of tissues was performed using scanning electron microscopy. These tests confirmed the removal of the nuclear and cellular elements of the tissue and the maintenance of the extracellular matrix of scaffolds.

Ultimate Tensile Strength (UTS) was applied to cartilage rings and strips of native and decellularised tissue. Compared to the former, the latter displayed significantly increased failure strain, but decreased failure stress and peak elastic modulus in the longitudinal direction. There were no differences between native and decellularised tracheas in the circumferential direction. In native tracheas, greater parameter values were found longitudinally than circumferentially, with all directional differences attaining high statistical significance. Unlike native tracheas, there were no directional differences in failure stress in decellularised tracheas, while failure strain was significantly higher longitudinally and peak elastic modulus was significantly higher circumferentially. Biomechanical testing revealed certain differences in failure parameters between native and decellularised tracheas,

suggesting that the latter were significantly weaker and softer, but more extensible than the former, albeit only longitudinally.

Subsequently, *in vitro* cytotoxic test of scaffolds was performed using human mesenchymal cells (hMSCs). Successful cell growth was observed around the decellularised scaffold suggesting the removal of most toxic biological and chemical elements that would inhibit cell proliferation and growth.

Finally, following the above tests, *in vivo* biocompatibility and recellularisation test of the decellularised scaffolds was performed in rats (n = 8) for 1 month. The decellularised tracheas were implanted in the rat back, while biopsies were taken to assess tracheal recellularisation and the risk of immune response. Following euthanasia of rats, histological and phenotypic testing was performed on implanted tissues. Control for the expression of CD3, CD4, CD11-b immunological markers and S100 marker was performed as well as hematoxylin-eosin staining for confirmatory check. No expression of CD4 cells was observed in decellularised tissue, whereas the presence of CD3 and CD11b was very low. Therefore, decellularised trachea implants showed a low immune response, which was also confirmed by histological staining of hematoxylin and eosin (H&E). S100 expression and presence of fibroblast-like cells was also observed, a characteristic of tissue regeneration and recellularization. Cartilage tissue exhibits elements of regeneration indicating that the body can function as a bioreactor in order to restore tissue structure and function. The above indicates initiation of tissue regeneration and the low immunogenicity of the decellularised scaffold.

The aim of this thesis was to create a cellular, tissue-engineered airway through the process decellularisation and recellularisation, without the use of a bioreactor, that could have the structure and function of native tissue without the risk of an immune response. The purpose of this study was to evaluate the decellularised scaffold and study whether the organism can function as a bioreactor in order to restore the structure and function of the tissue so that in future there will be successful functional solutions for serious clinical disorders of the respiratory tract.

<u>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΟΡΩΝ</u>		
Αίθυλο διάμινο τετραοϊκό οξύ	Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
Βαρτόνειος Γέλη	Wharton Jelly	WJ
Γλουταμίνη –L	L-glutamine	L-glu
Γλυκοζαμινογλυκάνες	Glycosaminoglycans	GAGs
Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων	Phosphate Buffer Saline	PBS
Δωδεκυλοθειικό νάτριο	Sodium Dodecyl Sulfate	SDS
Εμβρυικός Βόειος Ορός	Fetal Bovine Serum	FBS
Εμβρυονικά Στελεχιαία Κύτταρα	Embryonic Stem Cells	ESCs
Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία – ΕΚΟ	Extracellular Matrix	ECM
Επαγόμενα Πλειοδύναμα Στελεχιαία Κύτταρα	Induced Pluripotent Stem Cells	iPCs
Επιφανειακός Δείκτης	Cluster of Differentiation	CD
Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας	Major Histocompatibility Complex	MHC
Ομφάλιος Λώρος-Ο.Λ.	Umbilical Cord	U.C.
Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη	Penicillin-Streptomycin	P-S
Πολυδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα	Multipotent Mesenchymal Stem Cells	MSCs
-	α -Minimum Essentials Medium	α - MEM
-	3-[(3cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate	CHAPS
-	4',6-diamidino-2-phenylindole	DAPI
Χλωριούχο Νάτριο	Sodium chloride	NaCl
Αιματοξυλίνη-Εωσίνη	Hematoxylin-Eosin	H-E
Τάση Αστοχίας	Failure Stress	Σf
Παραμόρφωση Αστοχίας	Failure Strain	λf
Υψηλότερη Τιμή Ελαστικού Μέσου	Highest Elastic Modulus Value	M_p
Μέγιστο Μέτρο Ελαστικότητας	Peak Elastic Modulus	λ_p
Τριφωσφορική Αδενοσίνη	Adenosine Triphosphate	ATP
Ρυθμός Διπλασιασμού Κυττάρων	Cell Doubling Time	CDT

Πολυδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα από Μυελό των Οστών	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells	BMMSCs
Πολυδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα από Εμμηνορροϊκό Αίμα	Menstrual Blood Mesenchymal Stem Cells	MBMSCs
Πολυδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα από Λιπώδη Ιστό	Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells	ATMSCs
Πολυδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα από Αίμα Ομφάλιου Λώρου	Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells	UCMSCs
Πολυδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα από Ιστό Ομφάλιου Λώρου	Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells	WJMSCs

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

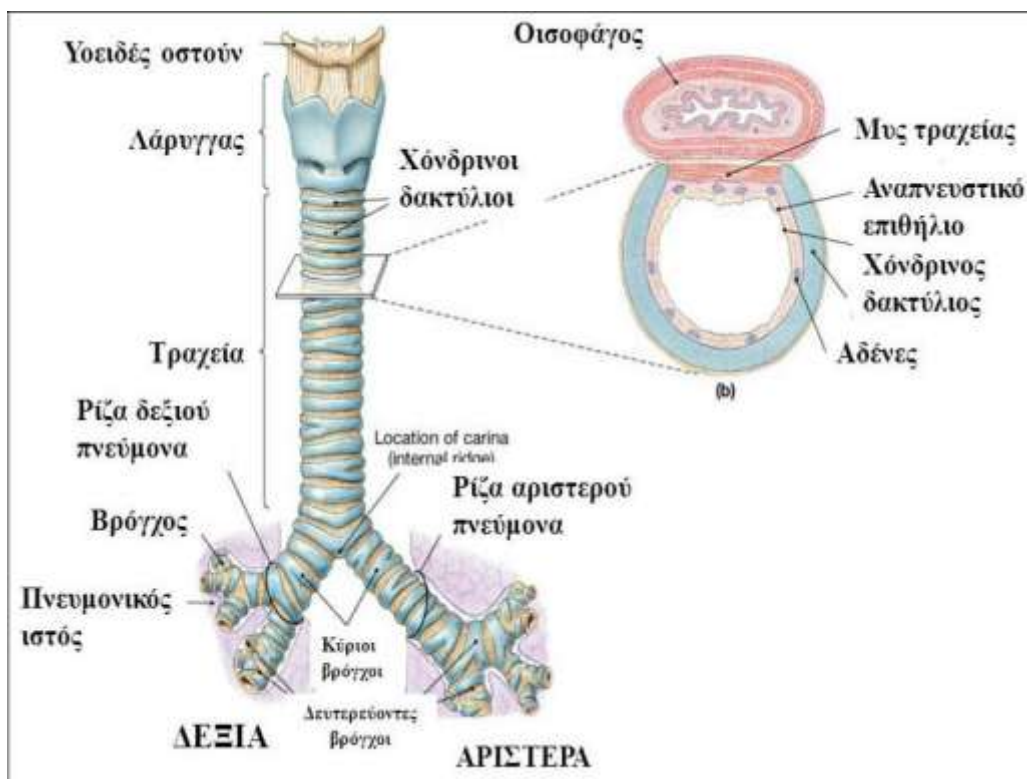
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	16
SUMMARY	19
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	26
1. Αναπνευστική Οδός- Τραχεία	26
1.1 Ανατομία της Τραχείας	26
1.2 Μορφογένεση της Τραχείας	27
1.3 Ιστολογικά ευρήματα της τραχείας	28
1.4 Λειτουργία της τραχείας	29
1.5 Αναπνοή μέσω της τραχείας	29
1.6 Κύτταρα Τραχείας	30
1.6.1 Ειδικοί Κυτταρικοί Τύποι Τραχείας	32
1.7 Αιμάτωση της Τραχείας	33
1.8 Παθολογικές Διαταραχές της Τραχείας	36
1.9 Τρέχουσες επιλογές για την αντικατάσταση και θεραπεία της τραχείας.	37
1.10 Κλινικές ανάγκες των αεραγωγών και ο ρόλος της αναγεννητικής ιατρικής.	40
2. Αναγεννητική Ιατρική και Ιστομηχανική	41
2.1 Αναγεννητική Ιατρική	41
2.2 Ιστομηχανική	42
2.3 Μελλοντική προοπτική Αναγεννητικής Ιατρικής-Ιστομηχανικής	45
2.4 Ικρίωματα	46
2.4.1 Χαρακτηριστικά ενός «αδανικού» ικριώματος για ιστομηχανική.....	46
2.4.1.1 Κατηγορίες Ικριωμάτων	47
2.5 Κύτταρα που Χρησιμοποιούνται στην Ιστομηχανική	50
2.6 Βιοαντιδραστήρες	53
3. Αποκυτταροποίηση	56
3.1 Περιγραφή των πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης	59
3.2 Επιδράσεις της αποκυτταροποίησης στον ιστό και αποτελεσματικότητα	65
3.3 Επαλήθευση της αφαίρεσης κυττάρων	66
3.4 Επίδραση των χημικών ουσιών της αποκυτταροποίησης στους ιστούς	67
4. Κλινική μεταμόσχευση τραχείας και ιστομηχανική	67
5. Ανασκόπηση ανακατασκευής τραχείας σε μεγάλα ζωικά μοντέλα	70

6. Προβλήματα προς αντιμετώπιση-Μελλοντικές προοπτικές	72
7. Σκοπός της μελέτης	75
ΕΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	76
8.Υλικά και Μέθοδοι	76
8.1. Συλλογή βιολογικού υλικού και ασφάλεια δείγματος	76
8.2. Αποκυτταροποίηση της τραχείας	76
8.3. Πρωτόκολλο Αποκυτταροποίησης	77
8.4. Ιστολογική Αξιολόγηση Αποκυτταροποίησης	81
8.4.1. Ιστολογικός έλεγχος	81
8.4.2. Μονιμοποίηση δειγμάτων.	81
8.4.3. Μικροτόμηση δειγμάτων	82
8.4.4 Χρώση Δειγμάτων	82
8.4.4.1. Χρώση με Αιματοξυλίνη-Εωσίνη (Hematoxylin-Eosin)	83
8.4.4.2 Χρώση με Masson's Trichrome	84
8.4.4.3 Χρώση με Elastic Van Gieson	86
8.4.4.4 Χρώση DAPI	88
8.4.5. Μικροσκοπία Δειγμάτων	92
8.4.6. Ανάλυση Εικόνων	92
8.5 Ποσοτική αξιολόγηση αποκυτταροποίησης	92
8.5.1 Ποσοτικοποίηση DNA του ιστού της τραχείας	92
8.5.2 Ποσοτικοποίηση κολλαγόνου	96
8.5.3 Ποσοτικοποίηση GAGs γλυκοζαμινογλυκανών.....	98
8.6 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης	100
8.7 Εμβιομηχανικός έλεγχος	104
8.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων και γεωμετρική αξιολόγηση	104
8.7.2 Μονοαξονική τάση: ρύθμιση και μέθοδοι	106
8.7.3. Επεξεργασία εμβιομηχανική δεδομένων	107
8.7.4. Στατιστική Ανάλυση	108
8.8 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των υλικών αποκυτταροποίησης	109
8.8.1 Απομόνωση ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων (hMSCs)	109
8.8.2 Πλύσιμο μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs)	111
8.8.3 Ανακαλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs)	111
8.8.4 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας με τεστ επαφής- Δοκιμασία A	112
8.8.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας –Δοκιμασία B	112

8.8.6 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας	115
8.8.7 Μέτρηση κυττάρων με πλάκα Neubauer	116
8.9 Έλεγχος βιοσυμβατότητας και επανακυτταροποίησης του αποκυτταροποιημένου ιστού <i>in vivo</i>	118
8.9.1. Ζωικά πρότυπα.....	120
8.9.2 Χειρουργεία εμφύτευσης και παρακολούθηση ζωικών προτύπων	122
8.9.3 Χειρουργείο λήψης εμφυτευμένου ιστού	124
8.9.4 Ανοσοϊστοχημεία.....	126
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	131
9.1. Αξιολόγηση Μορφολογικών Χαρακτηριστικών Αποκυτταροποιημένων Ιστών 131	
9.1.1 Χρώση με Αιματοξυλίνη–Εωσίνη (H&E).....	131
9.1.2. Χρώση με Masson’s Trichrome	134
9.1.3. Χρώση με Elastic Van Gieson.....	137
9.1.4 Χρώση DAPI	140
9.1.5. Χρώση με Tolouidine Blue	143
9.3. Ποσοτική αξιολόγηση των Αποκυτταροποιημένων Ιστών	150
9.3.1 Ευρήματα Ποσοτικοποίησης DNA.....	150
9.3.3. Ευρήματα Ποσοτικοποίησης Γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs)	153
9.3.4 Ευρήματα Ποσοτικοποίησης Υδροξυπρολίνης	156
9.4 Αξιολόγηση Ιστών με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης	161
9.5 Δεδομένα Εμβιομηχανικής Δοκιμής.....	163
9.6 Αξιολόγηση Κυτταροτοξικότητας Πρωτοκόλλου Αποκυτταροποίησης	174
9.6.1 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας με τεστ επαφής- Δοκιμασία Α	174
9.6.2 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας –Δοκιμασία Β	175
9.6.2.1 Προσδιορισμός Ρυθμού Πολλαπλασιασμού WJ MSCs (CDT).....	178
9.7 Έλεγχος βιοσυμβατότητας και ανοσιακής απόκρισης εμφυτευμένου ικριώματος τραχείας <i>in vivo</i>	180
9.8 Ιστολογικός έλεγχος αναγέννησης και επανακυτταροποίησης του ικριώματος. 189	
10.Συζήτηση	194
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	206

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**ΕΙΣΑΓΩΓΗ****1. Αναπνευστική Οδός- Τραχεία****1.1 Ανατομία της Τραχείας**

Η τραχεία είναι ένας ελαστικός σωλήνας ο οποίος ξεκινάει από το κατώτερο τμήμα του λάρυγγα, περίπου από τον έκτο τραχηλικό σπόνδυλο, έως τον τέταρτο θωρακικό σπόνδυλο όπου διακλαδίζεται και σχηματίζει τους βρόγχους οι οποίοι στη συνέχεια θα σχηματίσουν τους πνεύμονες. Το μέγεθος μιας τραχείας κυμαίνεται σε 1,5-2 εκατοστά πλάτος και 10-14 εκατοστά μήκος στον άνθρωπο. Το τοίχωμα της τραχείας αποτελείται από περίπου 20 ατελής δακτυλίους του υαλώδους χόνδρου. Οι δακτύλιοι αυτοί σχηματίζουν την πρόσθια και πλευρική περιφέρεια καθώς και τους λείους μυς στην οπίσθια πλευρά, τα οποία είναι ενσωματωμένα σε ινώδη μεμβράνη του ελαστικού συνδετικού ιστού (Εικόνα 1) (Crowley et al., 2014; Roomans, 2010).



Εικόνα 1: Ανατομία της τραχείας.

Ο μυς περιέχει εγκάρσιες και διαμήκεις ίνες. Οι εγκάρσιες ίνες συνδέουν τα άκρα των χόνδρινων δακτυλίων στην οπίσθια πλευρά. Οι βλεννογόνοι αδένες της τραχείας βρίσκονται στον συνδετικό ιστό μεταξύ της στοιβάδας των επιθηλίων και του χόνδρου ενώ μερικές φορές βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά και υπάρχουν άφθονοι στον εξωτερικό τραχειακό μυ. Η λειτουργία των αδένων που ανοίγουν μέσω πόρων/αγωγών στην εσωτερική επιφάνεια της τραχείας είναι να λιπαίνουν την εσωτερική επιφάνεια της τραχείας. Το επιθήλιο αποτελείται από ένα ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο με βλεφαρίδες και καλυκοειδή κύτταρα τα οποία επίσης παράγουν βλεννογόνο μεμβράνη. Η κατεύθυνση του παλμού των βλεφαρίδων προς τον λάρυγγα συμβάλλει στη μεταφορά σωματιδίων και κυτταρικών καταλοίπων μακριά από τους πνεύμονες και την αποβολή τους από το σώμα.

1.2 Μορφογένεση της Τραχείας

Κατά τη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας ανάπτυξης, η τραχεία αναπτύσσεται αρχικά από το κοιλιακό πρόσθιο εντερικό επιθήλιο σχηματίζοντας το τραχειοβρογχικό εγκόλπωμα. Στη συνέχεια μεγαλώνει ουραία πριν διακλαδιστεί σε εκβολές του πνεύμονα οι οποίες αργότερα θα επιμηκυνθούν για να σχηματίσουν τους κύριους βρόγχους. Ως εκ τούτου, το εσωτερικό τοίχωμα της τραχείας είναι ενδοδερμικής προέλευσης. Ο ενδοδερμικός σωλήνας υφίσταται μορφογενετικές κινήσεις, όπως η ανάπτυξη και η διακλάδωση, μόνο κάτω από την επίδραση του γύρω σπλαχνικού μεσοδέρματος (Brand-Saber et al., 2014). Αυτή η διαδικασία αποτελεί σημαντικό παράδειγμα αλληλεπίδρασης επιθηλίου-μεσεγχύματος που συμβαίνει συχνά κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης. Οι αλληλεπιδράσεις βασίζονται σε μεταγραφικούς παράγοντες και σε σήματα από τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 10 (FGF 10), Sprouty, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), παρόμοιος με ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας (IGF), αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF) (Warburton et al., 2000). Κατά τη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας ανάπτυξης, η τραχεία διακλαδίζεται για να σχηματίσει τη δεξιά και αριστερή προεκβολή του πνεύμονα. Ως εκ

τούτου, η ανάπτυξη της τραχείας θεωρείται προαπαιτούμενο για τον σχηματισμό των πνευμόνων μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων διακλάδωσης.

1.3 Ιστολογικά ευρήματα της τραχείας

Ανάλυση που έχει πραγματοποιηθεί στο επιθήλιο της τραχείας έχει δείξει την παρουσία αρκετών κυτταρικών τύπων. Η πιο κοινή διάκριση γίνεται μεταξύ μιας κατηγορίας κυττάρων, των “brush cells”, που αποτελούν εξειδικευμένους επιθηλιακούς χημειοαισθητήρες και των νευροενδοκρινικών κυττάρων, που μοιάζουν με τα εντεροενδοκρινικά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού, τα οποία διασπείρονται στο αναπνευστικό επιθήλιο. Η λειτουργία των νευροενδοκρινικών κυττάρων στην αναπνευστική οδό είναι επί του παρόντος υπό συζήτηση αν και έχουν προταθεί μηχανοευαίσθητες λειτουργίες και λειτουργίες ανίχνευσης οξυγόνου (Cutz E et al., 2007). Τα μη νευροενδοκρινικά κύτταρα είναι αυτά που ονομάζονται “brush cells” και βρίσκονται στο άνω τμήμα του αναπνευστικού συστήματος. Παραδόξως, τα κύτταρα που εκφράζουν τα μοριακά στοιχεία του μονοπατιού μεταβίβασης γεύσης, εμφανίζονται στην μορφολογία των “brush cells” (Merigo et al., 2005). Ο όρος “brush cell” δείχνει την παρουσία μικρολαχνών που περιέχουν βιλλίνη και κροσσίνη (Hofer et al. 1992). Πρόσφατα, χολινεργικά χημειοαισθητηριακά κύτταρα έχουν περιγραφεί στην τραχεία τα οποία εκφράζουν σχετικούς υποδοχείς και συστατικά του μονοπατιού μεταγωγής πικρής γεύσης (Krasteva et al., 2012). Αυτά τα κύτταρα είναι συνδεδεμένα με ίνες πνευμονογαστρικού νεύρου μέσω υποδοχέων νικοτινικής ακετυλοχολίνης. Έχει αποδειχθεί ότι τα “brush cells” επηρεάζουν τον έλεγχο της αναπνοής (Kummer et al., 2008). Κατά αυτό τον τρόπο είναι λειτουργικά για την προστασία του κατώτερου τμήματος της αναπνευστικής οδού μέσω της σύνθεσης του αυλικού υγρού μέσα στην τραχεία και τους βρόγχους.

1.4 Λειτουργία της τραχείας

Η φυσιολογική λειτουργία της τραχείας περιλαμβάνει 3 βασικά χαρακτηριστικά:

- Μεταφορά αέρα μεταξύ λάρυγγα και βρόγχων
- Ανταλλαγή θερμότητας και υγρασίας
- Απομάκρυνση σωματιδίων

Η μεταφορά του αέρα μέσω της τραχείας εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την εσωτερική διάμετρό της. Η αντίσταση του αέρα να ρέει μέσω του σωλήνα εκφράζεται με το νόμο του Hagen-Poiseuille. Ο νόμος αυτός ορίζει πως η αντίσταση του αέρα που ρέει είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την ακτίνα του σωλήνα υψωμένη στην τέταρτη δύναμη όταν η ροή γίνεται κανονικά. Σε υψηλότερους ρυθμούς, η ροή γίνεται πιο έντονη με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η αντίσταση. Οίδημα βλεννογόνου, συστολή των μυών των αεραγωγών, ενδοτραχειακοί σωλήνες ή όγκοι που μειώνουν τον χώρο των αεραγωγών θεωρούνται περιπτώσεις που αυξάνουν σημαντικά την αντίσταση της ροής του αέρα. Συγκεκριμένα, 50% μείωση της εσωτερικής διαμέτρου της τραχείας μπορεί να αυξήσει την αντίσταση 16 φορές ενώ όταν η ροή αέρα είναι πολύ έντονη μπορεί η αντίσταση να αυξηθεί έως και 32 φορές (Epstein et al., 2005).

1.5 Αναπνοή μέσω της τραχείας

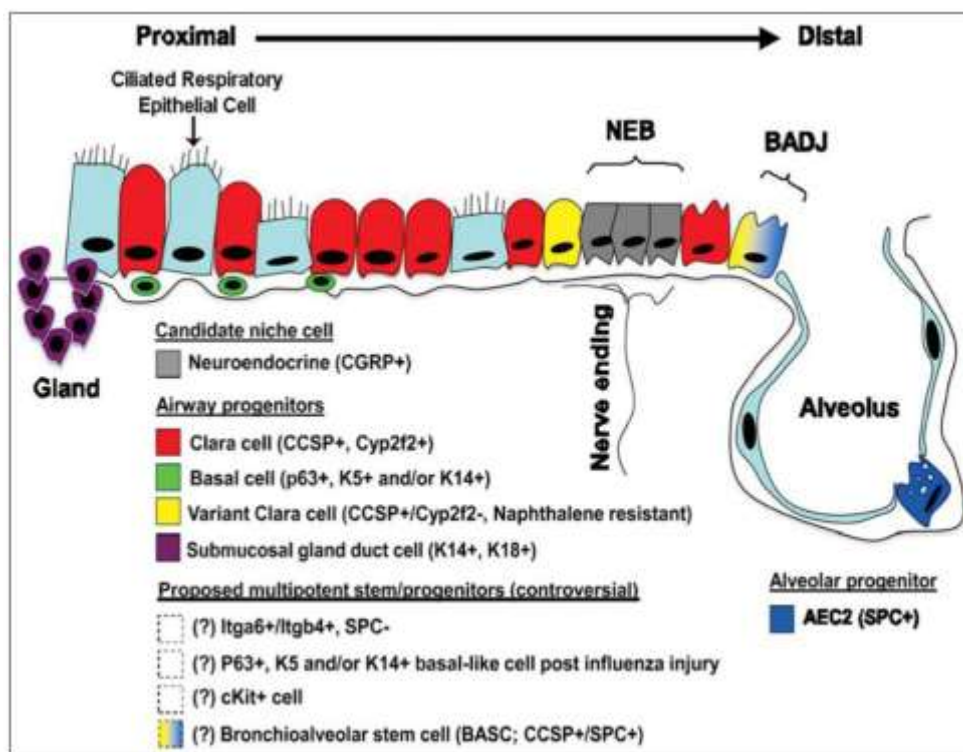
Κατά τη διαδικασία αναπνοής, το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα ζεσταίνει και υγρασιάζει τον εισπνεόμενο αέρα. Κατά τη διάρκεια ήρεμης αναπνοής σε θερμοκρασία δωματίου, ο αέρας θερμαίνεται σε περισσότερο από 37°C και υγρασιάζεται με 100% κορεσμό. Αυτή η διαδικασία αποτελεί το σημείο ισοθερμικού κορεσμού. Όσο πιο ξηρός και κρύος είναι ο εισπνεόμενος αέρας τόσο περισσότερο κινείται το σημείο ισοθερμικού κορεσμού προς την περιφέρεια του πνεύμονα με αποτέλεσμα να επάγεται η αφυδάτωση και η ψύξη του ιστού του πνεύμονα (Kandjov et al., 2001). Σε περίπτωση τραχειοστομίας και ενδοτραχειακών σωληναρίων κατά τις οποίες παρακάμπτεται το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, ο ιστός του πνεύμονα παγώνει και ξηραίνεται (Epstein et al., 2005). Αέρας σε θερμοκρασία 22°C και 50% υγρασία περιέχει περίπου 10 mg /L H_2O και το σημείο ισοθερμικού κορεσμού απορροφά επιπλέον 34 mg/L. Ο εκπνεόμενος αέρας παγώνει μέχρι τους 32°C περίπου στη ρινική οδό

όπου εξακολουθεί να έχει 34 mg / L υγρασία. Το ποσό αυτό προκαλεί μια ημερήσια απώλεια νερού τουλάχιστον 240 κ.εκ., ως μέρος της “αίσθησης εφίδρωσης” (“perspiratio insensibilis”), που αποτελεί την απαρατήρητη απώλεια υγρού μέσω δέρματος και πνεύμονα. Η ενέργεια που είναι απαραίτητη για να αντισταθμιστεί ο παγωμένος αέρας που εξατμίζεται αναλογεί σε 600 kJ την ημέρα που αποτελεί το 10% της συνολικής παραγωγής θερμότητας του σώματος (Finkbeiner et al., 1999)

1.6 Κύτταρα Τραχείας

Καθώς το επιθήλιο του αναπνευστικού συστήματος είναι εκτεθειμένο στο περιβάλλον με κίνδυνο τραυματισμού, θα πρέπει να είναι σε θέση να αναγεννάται φυσιολογικά. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ένας υποπληθυσμός βασικών κυττάρων στο ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο είναι ενεργοποιημένος και αντικαθιστά τα τραυματισμένα κύτταρα (Schoch et al., 2004). Τα στελεχιαία/προγονικά κύτταρα μπορεί να χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεταγραφικού παράγοντα Trp-63 (p63) και κυτοκερατίνες 5 και 14. Ο μεταγραφικός παράγοντας Trp-63 εμπλέκεται στην ανάπτυξη του αναπνευστικού συστήματος και κυρίως στην εγκατάσταση των βασικών κυττάρων. Σε αντίθεση με τα τρωκτικά στα οποία τα στελεχιαία/προγονικά κύτταρα βρίσκονται μόνο στην τραχεία, στον άνθρωπο υπάρχουν σε όλη την αναπνευστική οδό, συμπεριλαμβανομένων και των μικρών βρόγχων. Τα βασικά κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε κροσσωτά επιφανειακά κύτταρα και σε κύτταρα Clara. Τα κύτταρα Clara μπορεί να θεωρηθούν πολυδύναμα κύτταρα καθώς είναι ικανά να δημιουργούν λαγνοειδή κύτταρα. Παλαιότερα, αναφορές έδειχναν ότι στελεχιαία/προγονικά κύτταρα εντοπίζονταν στους οροβλεννογόνους αδένες του αναπνευστικού συστήματος. Πρόσφατα, ένας νέος τύπος στελεχιαίων/προγονικών κυττάρων έχει περιγραφεί στην τραχεία του ποντικού ο οποίος εντοπίζεται στους αγωγούς των τραχειακών αδένων. Κύτταρα αγωγού αδένων που έχουν απομονωθεί, έχουν δείξει ότι είναι πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα για το αναπνευστικό επιθήλιο του επίμυ, καθώς μπορούν να δημιουργήσουν ορώδη και βλεννογόνα σωληνάκια, κύτταρα αγωγού και κροσσωτό επιθήλιο επιφανείας. Αυτό που τα καθιστά μοναδικά είναι η ικανότητά τους να επιβιώνουν σε σοβαρή ισχαιμική κατάσταση. Αν και τα

δεδομένα είναι διαφορετικά στον άνθρωπο και στον επίμυ, αυτά τα ευρήματα συνεισφέρουν σημαντικά στην πληροφορία αναφορικά με τη φυσιολογία του επιθηλίου της τραχείας, κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις (Brand-Saber et al., 2014) (Εικόνα 3).



Εικόνα 2: Επιθηλιακά και προγονικά κύτταρα. Παρουσιάζεται σχηματική απεικόνιση προτεινόμενων επιθηλιακών υποψήφιων στελεχιαίων ή προγονικών κυττάρων στους εγγείς αεραγωγούς και τις απομακρυσμένες κυψελίδες. Κύτταρα των οποίων ο εντοπισμός ή η ύπαρξη δεν είναι ακόμα σαφής ή αποδεκτός υποδεικνύονται με διακεκομμένα κουτιά. Κυψελιδικό επιθηλιακό κύτταρο τύπου 2 (AEC2, type 2 alveolar epithelial cell), σύνδεσμος βρογχοκυψελιδικού αγωγού (BADJ, bronchoalveolar duct junction), πρωτεΐνη εκκρίσεως κυττάρων Clara (CCSP, Clara cell secretory protein), πεπτίδιο σχετιζόμενο με γονίδιο καλσιτονίνης (CGFP, calcitonin gene-related peptide); ιντεκρίνη (Itg, integrin) κυτοκερατίνη (K, cytokeratin), νευροεπιθηλιακό σώμα (NEB, neuroepithelial body), επιφανειοδραστική πρωτεΐνη (SPC, surfactant protein C) (Weiss et al., 2014).

1.6.1 Ειδικοί Κυτταρικοί Τύποι Τραχείας

Τα χονδροκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα είναι οι δυο κυτταρικοί τύποι που απαιτούνται στην παραγωγή τραχείας. Τα χονδροκύτταρα φτιάχνουν τους χόνδρινους δακτυλίους οι οποίοι παρέχουν στήριξη στην κατασκευή, προλαμβάνοντας την κατάρρευση του αυλού. Επίσης, παρέχουν ένα πλήρες βλεφαριδωτό επιθήλιο στον εσωτερικό αυλό του αεραγωγού που ενεργεί ως φράγμα ενάντια στη μόλυνση και το σχηματισμό ουλής και διευκολύνει την εκκαθάριση των εισπνεόμενων παραγόντων (Crowley et al., 2014). Σε μελέτη των Go και συνεργατών, εξετάστηκε η σημασία των χονδροκυττάρων και επιθηλιακών κυττάρων, που προέρχονται από μεσεγχυματικά, στην επιβίωση της αποκυτταροποιημένης τραχείας σε χοίρους. Η μελέτη έδειξε πως η έγχυση και των δυο κυτταρικών τύπων είναι απαραίτητη για την επιβίωση του μοσχεύματος συγκριτικά με την έγχυση μόνο του ενός κυτταρικού τύπου ή κανενός (Go et al., 2010; Zani et al., 2008).



Χονδροκύτταρα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι χόνδρινοι δακτύλιοι της τραχείας αποτελούνται κυρίως από υαλώδη χόνδρο ο οποίος βοηθάει στο να παραμένει ανοιχτή η αναπνευστική οδός παρά τις ενδοθωρακικές πιέσεις στις οποίες υποβάλλεται. Ο λείος μύς συνδέεται στις άκρες των μη ολοκληρωμένων χόνδρινων δακτυλίων και όταν γίνεται σύσπαση των μυών, τότε προκαλείται κάμψη και επιμήκυνση ρυθμίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο στη διαμόρφωση της διαμέτρου του αεραγωγού (Crowley et al., 2014). Σε αντίθεση με άλλους συνδετικούς ιστούς, ο χόνδρος δεν έχει αγγεία. Τα χονδροκύτταρα λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τους παράγοντες ανάπτυξης μέσω διάχυσης. Ο χόνδρος χαρακτηρίζεται από πολύ κακή αναγεννητική ικανότητα εξαιτίας της έλλειψης αγγείων (Raghunath et al., 2007).



Επιθηλιακά Κύτταρα

Σε μια κανονική τραχεία, η επιφάνεια του αυλού είναι επενδεδυμένη με ένα στρώμα κροσσωτού ψευδοπολύστιβου επιθηλίου που παίζει σημαντικό ρόλο στην κάθαρση της βλέννας και την πρόληψη της μόλυνσης (Satir et al., 2007; Stannard et al., 2006). Η απουσία αυτού του επιθηλιακού στρώματος μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ιστού κοκκοποίησης και την κατακράτηση των

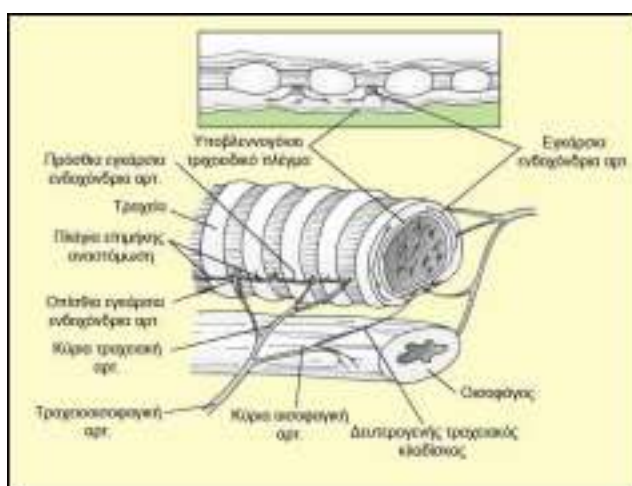
πτυέλων, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει θανατηφόρα απόφραξη αεραγωγών (Wu et al., 2007). Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι απαραίτητα για την αναγέννηση του κροσσώτου επιθηλίου σε ιστομηχανική τραχεία. Αυτά τα προγονικά κύτταρα μπορούν να προκύψουν από τους περιβάλλοντες εγγενείς ιστούς ή να παρέχονται εξωγενώς σε συνδυασμό με το ιστομηχανικό ικρίωμα (Go et al., 2010).

Η παρουσία κροσσώτου επιθηλίου στην εσωτερική στοιβάδα του αναπνευστικού συστήματος είναι πολύ σημαντική. Οι κροσσοί εξωθούν τη βλέννη, καθώς και όλα τα εισπνεόμενα σωματίδια, υγρά, μικροοργανισμούς διαμέσου της λαρυγγικής οδού. Ο ρόλος του είναι να δρα ως φυσικό εμπόδιο ενάντια στη μόλυνση, να ρυθμίζει τις μεταβολικές λειτουργίες της αναπνευστικής οδού, να ελκύει και να ενεργοποιεί αντιφλεγμονώδη κύτταρα, να ελέγχει την ισορροπία πνευμονικού υγρού και να ρυθμίζει το σχηματισμό των λείων μυών (Zani et al., 2008).

1.7 Αιμάτωση της Τραχείας

Η ασφαλής και επιτυχημένη ανατομή της τραχείας απαιτεί λεπτομερή περιγραφή και κατανόηση της παροχής αίματος στην τραχεία για την αποφυγή επακόλουθης τραχειακής ισχαιμίας (π.χ. τραχειακή στένωση και αναστομωτική κατάρρευση). Μια θεμελιώδης αρχή που ο χειρουργός των αεραγωγών πρέπει πάντα να έχει κατά νου είναι ότι οι αρτηρίες που τροφοδοτούν την τραχεία είναι κοντά στο τοίχωμα της

τραχείας πλευρικά και αγγειώνουν την τραχεία με τμηματικό τρόπο κατά μήκος της (Εικόνα 3). Καθώς οι τμηματικές αρτηρίες που τροφοδοτούν την τραχεία προσεγγίζουν το πλευρικό τραχειακότοίχωμα,



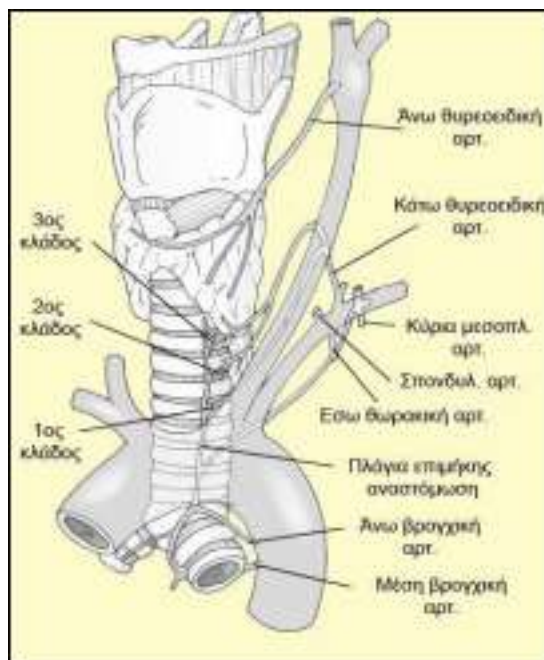
διαχωρίζονται ανώτερα και κατώτερα με διαμήκη τρόπο που σχηματίζει αναστομώσεις

Εικόνα 3: Απεικόνιση της τμηματικής τροφοδοσίας αίματος στην τραχεία και η σχέση μεταξύ της τραχείας και του οισοφάγου (Μπαλταγιάννης, 2017).

με τις τμηματικές αρτηρίες από πάνω και από κάτω. Εντός των ενδοκολπικών συνδέσμων, οι τραχειακές αρτηρίες εκτείνονται πάλι σε πρόσθιες και τα οπίσθιες διακλαδώσεις που κινούνται περιφερειακά εντός του τραχειακού τοιχώματος όπου αναστομώνονται με τις αντίστοιχες τραχειακές αρτηρίες από την ετερόπλευρη πλευρά. Αυτή η τμηματική ρύθμιση της ροής του αίματος οριοθετεί την περιφερική τραχειακή τομή έως 1-2 cm εκατέρωθεν της τραχειακής αναστόμωσης λόγω του κινδύνου αποαγγείωσης και ισχαιμίας με μεγαλύτερες διατομές.

Η αρτηριακή παροχή της τραχείας τη διαχωρίζει στην άνω (τραχηλική) και την κάτω (θωρακική) τραχεία. Οι τραχειοισοφαγικές διακλαδώσεις των κατώτερων θυρεοειδικών αρτηριών φέρνουν αίμα στην

τραχηλική τραχεία από τους δεξιούς και αριστερούς θυρεοειδικούς κορμούς που εκτείνονται από τις υποκλείδιες αρτηρίες (Εικόνα 4). Η θωρακική τραχεία και η καρδιά λαμβάνουν αίμα από το βρογχικές αρτηρίες που προκύπτουν απευθείας από την αορτή (Εικόνα 4). Συνήθως, υπάρχουν ανώτερες, μεσαίες και κατώτερες βρογχικές αρτηρίες υπεύθυνες για τη μεταφορά αίματος

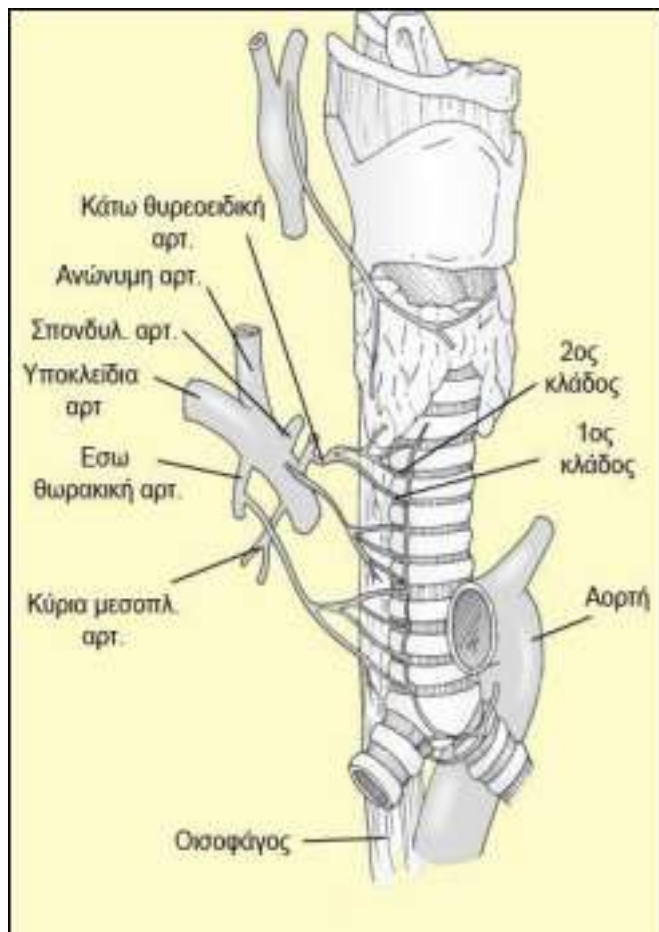


στην τραχεία και τη καρδιά (Paul et **Εικόνα 4:** Παροχή αίματος στην τραχεία.

al., 2018). Δεξιά εμπρόσθια πλάγια όψη (Μπαλταγιάννης, 2017).

Υπάρχουν πολλά μεγάλα αιμοφόρα αγγεία που βρίσκονται κοντά στην τραχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη διάρκεια των τραχειακών επεμβάσεων. Η βραχιοκεφαλική αρτηρία είναι η πρώτη διακλάδωση της αορτικής αψίδας. Οι σειρές αιμοφόρων αγγείων εκτείνονται διαμέσου του δεξιού κόλπου κατά μήκος της δεξιάς πρόσθιας όψης της τραχείας (Εικόνα 5). Πρέπει να δίνεται προσοχή κατά τη διάρκεια μεσοθωρακοσκόπησης ώστε να αποφεύγεται τυχόν παρανόηση της αζιγώδους φλέβας με έναν λεμφαδένα κατά τη διάρκεια της βιοψίας (Paul et al., 2018). Η σωστή διαχείριση των προαναφερθέντων από τον χειρουργό προσφέρουν ασφαλή και αποτελεσματικό επιχειρησιακό προγραμματισμό και επιτρέπουν την πρόβλεψη

κοινών ανατομικών διακυμάνσεων μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των ασθενών κατά τις χειρουργικές επεμβάσεις. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων χειρουργικών τεχνικών που υπόσχονται να βελτιώσουν τα αποτελέσματα των ασθενών εξαρτώνται από τον σεβασμό για την ανθρώπινη ανατομία (Paul et al., 2018). Τα όσα αναφέρθηκαν παρέχουν μια σταθερή βάση στην ανατομία της τραχείας και της σχέσης



της με τις κρισιμες μεσοθωρακικές δομές.

Εικόνα 5: Μεγάλα αγγεία στενά συνδεδεμένα με την τραχεία σε δεξιά πλάγια όψη. (Μπαλταγιάννης, 2017).

1.8 Παθολογικές Διαταραχές της Τραχείας

Οι παθήσεις της τραχείας αποτελούν ένα ασυνήθιστο αλλά κλινικά σημαντικό πρόβλημα. Τα προβλήματα με την τραχεία περιλαμβάνουν στένωση, φλεγμονή, κακώσεις, κακοήθειες, συγγενείς λαρυγγοτραχειακές δυσπλασίες και μερικές κληρονομικές καταστάσεις (Lange et al., 2011).

Η λειτουργία της τραχείας είναι εύκολα ελεγχόμενη από τα νεοπλάσματα, τραυματικές βλάβες και συγγενείς διαταραχές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα στένωση ή κατάρρευση που επηρεάζει την ποιότητα ζωής και την επιβίωση. Η πραγματική συχνότητα της συγγενούς στένωσης της τραχείας, μια σπάνια διαταραχή που συχνά οδηγεί σε σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια, είναι άγνωστη, καθώς πολλά βρέφη πεθαίνουν πριν γίνει η διάγνωση (Herrera et al., 2007). Σοβαρή μετα-τραχειοστομία και μετασχηματιστική τραχειακή στένωση είναι επίσης ασυνήθιστες παθήσεις με εκτιμώμενη εμφάνιση από 4,9 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο ετησίως (Nouraei et al., 2007).

Οι πρωτογενείς τραχειακοί όγκοι αντιπροσωπεύουν περίπου το 0,1% έως 0,4% όλων των νεοδιαγνωσθέντων καρκίνων ή το 2,6 των περιπτώσεων ανά εκατομμύριο ετησίως (Urdaneta et al., 2011). Πρωτεύοντες καρκίνοι της τραχείας είναι σπάνιοι όγκοι που μπορούν να προέρχονται από διαφορετικά συστατικά της τραχείας όπως το αναπνευστικό επιθήλιο και σιελογόνοι αδένες. Καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο, που είναι συχνό στους άνδρες, και το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα, που παρατηρείται και στα δυο φύλα αποτελούν αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των κακοήθων ασθενειών. Δυστυχώς, οι περισσότεροι διαγιγνώσκονται όταν ο εσωτερικός αυλός του αεραγωγού αποφράσσεται σε ποσοστό περισσότερο από 75% με αποτέλεσμα η αρχική διάγνωση να γίνεται αργά οδηγώντας σε προηγμένη εξέλιξη του όγκου και αδυναμία λειτουργίας (Macchiarelli, 2006). Η θεραπευτική αγωγή παρέχεται μόνο με χειρουργική εκτομή. Η κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι μια ασφαλής τελικο-τελική αναστόμωση μπορεί να επιτευχθεί εάν το προσβεβλημένο τμήμα της τραχείας δεν εκτείνεται πάνω από το μισό του ολόκληρου μήκους σε ενήλικες ή το ένα τρίτο σε παιδιά. Αν αυτές οι κρίσιμες τιμές ξεπεραστούν, τότε η χειρουργική αφαίρεση του όγκου εντός ασφαλών περιθωρίων των αεραγωγών δε μπορούν να πραγματοποιηθούν. Ως εκ τούτου, η μόνη λύση είναι η εφαρμογή καταπραϋντικών μέσων όπως η τοποθέτηση stent, η επέμβαση αφαίρεσης όγκου και η ακτινοθεραπεία για να καθυστερήσει η εξέλιξη του όγκου.

Η ρήξη του τραχειοβρογχικού δένδρου είναι ασυνήθης κάκωση που συνοδεύει το κλειστό ή ανοικτό τραύμα. Η κάκωση της τραχείας και των κύριων βρόγχων θεωρείται απειλητική για τη ζωή και με αυξημένη θνητότητα σε σοβαρές άμεσες και αψότερες επιπλοκές. Παρά την επαρκή προστασία της, η τραχεία συχνά υπόκειται σε ανοικτές, κλειστές ή ιατρογενείς κακώσεις. Βαριές κλειστές κακώσεις της τραχείας συνυπάρχουν με άλλες μείζονες εξωθωρακικές και ενδοθωρακικές κακώσεις. Η ρήξη του τραχειοβρογχικού δένδρου μπορεί να προκύψει σε οποιοδήποτε σημείο. Οι ρήξεις μπορούν να διαχωριστούν σε επιμήκεις (μεμβρανώδης μοίρα), εγκάρσιες (χόνδρινη μοίρα), μικτές και επιπλεγμένες οι οποίες αποτελούν και τη χειρότερη περίπτωση με τη δυσμενέστερη πρόγνωση (Dougenis; 2002). Ανάλογα με τη θέση ρήξης του αεραγωγού οι κακώσεις μπορούν να διαχωριστούν στις κλειστές κακώσεις όπου η ρήξη περιορίζεται στη λαρυγγοτραχειακή περιοχή και την τραχηλική μοίρα της τραχείας και στις ανοιχτές κακώσεις όπου η τραχηλική τραχεία αποτελεί το συνηθέστερο σημείο εντόπισης ρήξεων του τραχειοβρογχικού δένδρου. Η εικόνα των συμπτωμάτων των κακώσεων και κλινικών σημείων περιλαμβάνει δύσπνοια, υποδόριο εμφύσημα, πόνο, αλλαγή της χροιάς της φωνής, συριγμό, θλάση θωρακικού τοιχώματος και αιμόπτυση. Η γνώση της ανατομίας και των μηχανισμών κάκωσης καθώς και του πρωτεύοντα ρόλου του αεραγωγού στον τραυματία αποτελούν βασικές αρχές στην κατανόηση της αρχικής εκτίμησης και αντιμετώπισης του τραύματος του αεραγωγού. Στόχος πάντα είναι η διατήρηση της ακεραιότητας και της βατότητας του αεραγωγού και η αποφυγή τραχειοστομίας (Dougenis D., 2002)

1.9 Τρέχουσες επιλογές για την αντικατάσταση και θεραπεία της τραχείας.

Συγγενείς ανωμαλίες, τραύματα, καρκίνος, φλεγμονή, τραυματισμός έπειτα από παρατεταμένη διασωλήνωση και αυτοάνοσες διαταραχές είναι μερικές από τις αιτίες που οδηγούν στην ανάγκη για ανακατασκευή ή μεταμόσχευση τραχείας. Σήμερα, οι τραχειακές βλάβες στα παιδιά αποτελούν περίπου το 30% της τραχείας τους και στους ενήλικες το 50% της τραχείας τους. Όταν η τραχεία παρουσιάσει βλάβη μεγαλύτερη των ανωτέρω ποσοστών απαιτείται η αντικατάσταση της. (Crowley et al., 2014). Ο σοβαρός τραυματισμός ή η καταστροφή της τραχείας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική

μείωση της ποιότητας ζωής λόγω προβλημάτων αναπνοής, ομιλίας και κατάποσης. Η διαχείριση αυτών των συνθηκών σε εξειδικευμένες μονάδες είναι ιδανικές καθώς η χαμηλή εμφάνισή τους καταλήγει σε λίγα κέντρα που συγκεντρώνουν επαρκή εμπειρία για την εξασφάλιση βέλτιστων αποτελεσμάτων.

Αν και η στένωση της τραχείας και οι κακοήθεις στενώσεις μπορεί να αντιμετωπίζονται με διαστολή μπαλονιού και χρήση στεντ ή εμφύτευση σωλήνα T, οι επιπλοκές που σχετίζονται με το στεντ και η υποτροπιάζουσα στένωση είναι συχνές. Η συγγενής στεφανιαία στένωση μεγάλου τμήματος της τραχείας μπορεί τώρα να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά με τραχειοπλαστική, ωστόσο, επακόλουθη διαστολή της τραχείας και η χρήση στεντ είναι απαραίτητα (Butler et al., 2014). Η χειρουργική εκτομή παραμένει η μόνη οριστική θεραπεία για κακοήθεις τραχείας και τραχειοβρογχική στένωση. Η πρωτοβάθμια αναστόμωση από άκρο σε άκρο μπορεί να επιτευχθεί εάν το παθολογικό τμήμα της τραχείας δεν υπερβαίνει το μισό ολόκληρο του τραχειακού μήκος σε ενήλικες ή το ένα τρίτο στα παιδιά (Grillo et al., 2002). Το μέγιστο μήκος τραχείας που μπορεί να χειρουργηθεί περιορίζεται από την τάση στην αναστόμωση. Μακρύτερες βλάβες δεν επιδέχονται εκτομής ή πρωτοβάθμιας θεραπείας, και ως εκ τούτου οδηγούν σε αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Μέχρι σήμερα, η λειτουργική ανακατασκευή της τραχείας παραμένει μια πραγματική χειρουργική πρόκληση. Ενώ πολλές μελέτες έχουν αναφέρει την επιτυχή ανακατασκευή βλαβών μέρους ή μικρού τμήματος, η αντικατάσταση μεγάλων τραχειακών αλλοιώσεων παρουσιάζουν πρόβλημα λόγω της έλλειψης ικανοποιητικών τραχειακών υποκατάστατων.

Η άμεση αναστόμωση είναι αδύνατη όταν ένα τμήμα τραχείας μεγαλύτερο από 6 cm χρειάζεται εκτομή λόγω της υψηλής μηχανικής τάσης στο σημείο της αναστόμωσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές και θανατηφόρες μετεγχειρητικές επιπλοκές (Bauguera et al., 2013; Grillo et al., 2002). Συμβατικά, δεν υπάρχει ικανοποιητική λύση αυτής της διαταραχής. Παρόλο που μια αλλογενής τραχεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αντικατάσταση, αυτό συνοδεύεται από το μειονέκτημα της δια βίου ανοσοκατασταλτικής θεραπείας, γεγονός που αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο μόλυνσης. Τα ξενομοσχεύματα της τραχείας φέρουν, επίσης, το ίδιο μειονέκτημα. Επί του παρόντος, η μηχανική ιστών έχει αναδειχθεί ως δυναμική

εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος (Belsey et al., 1950). Ο "νέος" ιστός θα πρέπει να είναι σε θέση να επιδιορθώνεται, να αναδιαμορφώνεται, να επαναγγειοποιείται και να αναγεννάται, χωρίς τον κίνδυνο απόρριψης (Baiguera et al., 2010).

Οι τρέχουσες επιλογές αντικατάστασης ιστών περιλαμβάνουν τη χρήση συνθετικών υλικών, αυτόλογους ιστούς, μεταμόσχευση, ή ξενομεταμόσχευση (Fishman et al., 2011).

Οι τρέχουσες χειρουργικές επιλογές, εάν οι τεχνικές ανακατασκευής τραχείας θεωρηθούν ακατάλληλες λόγω έλλειψης αυτόλογων ιστών, περιλαμβάνουν αντικατάσταση αεραγωγών χρησιμοποιώντας τον οισοφάγο ως σωληνοειδές αυτομόσχευμα, υποκατάστατα προσθετικών υλικών ή τραχειακά αυτομοσχεύματα (Lange et al., 2011). Ωστόσο, η χρήση οισοφάγου απαιτεί πολλά βήματα για την επιδιόρθωσή του και παρουσιάζει σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα (Gallo et al., 2012; Grillo et al., 2002). Τέλος, παρά την αισιοδοξία σχετικά με τα παιδιατρικά τραχειακά μοσχεύματα οι πτωματικές τραχείες δεν είναι ευρέως διαδεδομένες λόγω ελλείψεων σε δότες (Jacobs et al., 1999).

Επίσης, η προμεταμοσχευτική προετοιμασία της τραχείας (σταθεροποίηση με χημικές ουσίες, κρυοσυντήρηση, ακτινοβολήση, λυοφιλοποίηση) είναι αποτελεσματική μόνο στη μείωση της ανοσογονικότητας βραχυπρόθεσμα ή μεσοπρόθεσμα αλλά σχετίζεται με κατάρρευση του αεραγωγού σε ορισμένους ασθενείς (Jacobs et al., 1999; Sotres-Vega et al., 2006; Hawkins et al., 2000). Το βασικό πρόβλημα στην αποκατάσταση λειτουργίας (όπως στις προχωρημένες διαταραχές του λάρυγγα) είναι η έλλειψη διαθεσιμότητας ανατομικών, φυσιολογικών και εμβιομηχανικά κατάλληλων ιστών. Έτσι, ως αποτέλεσμα της αδυναμίας παροχής λειτουργικών ή προσθετικών λύσεων στην αντικατάσταση του λάρυγγα, οι προχωρημένοι καρκίνοι στον λάρυγγα θεραπεύονται σε μεγάλο βαθμό με χημειοθεραπεία παρά τη σοβαρή βραχυπρόθεσμη και μακροχρόνια νοσηρότητα (η οποία, κατά παράδοξο τρόπο, μπορεί να περιλαμβάνει έναν μη λειτουργικό λάρυγγα) ή θνησιμότητα αυτής της μεθόδου (Pignon et al., 2000).

1.10 Κλινικές ανάγκες των αεραγωγών και ο ρόλος της αναγεννητικής ιατρικής.

Η τραχεία εμφανίζεται ως ένα απλός αγωγός από τον οποίο εισέρχεται ο αέρας στους πνεύμονες και ο οποίος επιτρέπει την ανταλλαγή αερίων. Ουσιαστικά όμως η τραχεία εξυπηρετεί πιο σημαντικές λειτουργίες καθώς το αναπνευστικό επιθήλιο με τη βλεννοκροσσωτή διάταξη καθαρίζει τον εισπνεόμενο αέρα από τους ανεπιθύμητους οργανισμούς. Λόγω της έκθεσης της σε εξωτερικές και εσωτερικές μηχανικές δυνάμεις, η τραχεία πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένη ευκαμψία και άλλες σημαντικές ιδιαιτερότητες που να επιτρέπουν τις κινήσεις του αυχένα και την πλευρική ακαμψία για να αντέχει στις θετικές και αρνητικές πιέσεις κατά τη διάρκεια της αναπνοής και άλλων διαδικασιών (Grillo., 2002)

Για τους παραπάνω λόγους, ένα υποκατάστατο τραχείας θα πρέπει να πληροί συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Θα πρέπει να είναι σταθερό και άκαμπτο, βιοσυμβατό, μη ανοσογόνο, με εσωτερική επένδυση κυττάρων για πρόληψη της μόλυνσης και επαρκή αγγείωση για να αποφευχθεί η νέκρωση του μοσχεύματος. Επιπλέον, τα παιδιατρικά μοσχεύματα θα πρέπει να προχωρούν παράλληλα με τη σωματική ανάπτυξη από τη στιγμή που θα εμφυτευθούν. Δυστυχώς, για την τραχεία δεν υπάρχει επαρκής αναφορά σχετικά με την αγγειακή παροχή. Η μόνη γνώση είναι ότι αποτελείται από ένα ευαίσθητο δίκτυο αγγείων που προέρχεται από τον κάτω δεξιό θυρεοειδή και τις βρογχικές αρτηρίες. Αυτό αποτελεί σημαντική πρόκληση για την επίτευξη επαρκούς αγγειακής υποστήριξης, ειδικά στις αλλογενείς μεταμοσχεύσεις.

Η αναγεννητική ιατρική και η μηχανική ιστών έχουν δείξει τη σκοπιμότητά τους σε πειραματικό αλλά και σε κλινικό περιβάλλον. Εκτός από την τραχεία, πρώιμα κλινικά δεδομένα είναι διαθέσιμα για την ουροδόχο κύστη, τα αιμοφόρα αγγεία, τους χόνδρους, το δέρμα και τις βαλβίδες της καρδιάς.

Παρά τη σχετικά απλή αρχιτεκτονική της τραχείας, η αντικατάστασή της έχει αμφισβητηθεί και καμιά από τις μέχρι τώρα μεθόδους δεν έχει φανεί καλύτερη από κάποια άλλη αντίστοιχη για το σκοπό αυτό. Οι δυσκολίες σχετίζονται με την ανατομική θέση της τραχείας, τη συνεχή έκθεσή της στο εξωτερικό περιβάλλον και την άμεση σύνδεση με το άνω αναπνευστικό σύστημα και τους πνεύμονες. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες βασικές αρχές για τις οποίες οι απόψεις συγκλίνουν.

Η συμβατική μεταμόσχευση της τραχείας έχει κάποια προφανή μειονεκτήματα. Ο δότης και ο λήπτης θα πρέπει να συμφωνούν ως προς το MHC προφίλ τους (αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας - MHC (Major Histocompatibility Complex)) αλλά ακόμα και σ' αυτή την περίπτωση, αυτοί οι ασθενείς χρειάζονται δια βίου ανοσοκατασταλτική φαρμακευτική αγωγή η οποία σχετίζεται με σοβαρές αρνητικές παρενέργειες και υψηλά ιατρικά έξοδα. Τοπικοί κανονισμοί και δεοντολογικές κατευθυντήριες γραμμές μπορεί πάντα να επηρεάσουν και να καθυστερήσουν τη διαδικασία αφού πρόκειται για μέθοδο εξαρτώμενη από δότη. Αυτό το είδος της αλλομεταμόσχευσης της τραχείας δε φαίνεται να είναι η πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδος για μελλοντική θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο της τραχείας. Οι τρέχουσες κατευθυντήριες γραμμές και τα παραδείγματα για τη μεταμοσχευτική ιατρική πρέπει να αξιολογηθούν εκ νέου προκειμένου να διευθετηθούν ερωτήματα και ηθικές ανησυχίες σχετικά με το χειρισμό της μηχανικής ιστών και οργάνων (Johannes et al., 2013).

2. Αναγεννητική Ιατρική και Ιστομηχανική

2.1 Αναγεννητική Ιατρική

Η έννοια της αναγεννητικής ιατρικής εισήχθη το 1999 με σκοπό να περιγράψει τον κλάδο της υγείας που συνδυάζει τους εξελισσόμενους τομείς της ιστομηχανικής και των κυτταρικών θεραπειών (Fishman et al., 2014) και θεωρείται πλέον ότι μπορεί να ανοίξει νέες προοπτικές και να δημιουργήσει ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον για την ιατρική επιστήμη. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη χειρουργικών (κυρίως) τεχνικών που επιτρέπουν την αντικατάσταση φθαρμένων ή κατεστραμμένων ιστών, σε συνδυασμό με την περιορισμένη διαθεσιμότητα λειτουργικών μοσχευμάτων, έστρεψαν το ενδιαφέρον στο πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής και της ιστομηχανικής (Atala et al., 2012; Badylak et al., 2012). Έχουν δε αναπτυχθεί τρεις κύριες προσεγγίσεις για την αναγεννητική ιατρική οι οποίες περιλαμβάνουν 1) την αναγέννηση των ιστών με τη χρήση ιστομηχανικών κριωμάτων (μήτρες) και μόνο, 2) έγχυση απομονωμένων κυττάρων (ως μια μορφή κυτταρικής θεραπείας), ή 3) τη χρήση των κυττάρων που εμφυτεύονται επί ή εντός κριωμάτων (επίσης γνωστή ως ένα κατασκευάσμα μήτρας-κυττάρων). Οι δύο

τελευταίες μέθοδοι είναι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες. Η χρήση απομονωμένων κύτταρων επιτρέπει το χειρισμό ή την τροποποίησή τους πριν από την έγχυση (π.χ. γονιδιακή θεραπεία) ωστόσο παρουσιάζει και σημαντικά μειονεκτήματα συμπεριλαμβανομένης της πιθανής ανοσολογικής απόρριψης, ή την απώλεια της κυτταρικής λειτουργίας κάτι το οποίο μπορεί να αποφευχθεί με την επίστρωση τέτοιων κυττάρων σε ικρίωματα (Fishman et al., 2014; Langer et al., 1993).

Η πρόσφατη πρόοδος στην αναγεννητική ιατρική έχει αποδείξει τη δυνατότητά της να ανταποκριθεί στις δύο μεγάλες προκλήσεις της μεταμόσχευσης οργάνων και ιστών, στην κλινική χειρουργική ανοχή και την παροχή μιας δυνητικά αστείρευτης πηγής των οργάνων, δηλαδή έτοιμα προϊόντα για μεταμόσχευση (Fishman et al., 2014).

Κατά συνέπεια η αναγεννητική ιατρική μπορεί να μεταβάλλει δραστικά τον τρόπο άσκησης της Ιατρικής σε πολλούς τομείς, όπως για παράδειγμα τη μεταμόσχευση οργάνων, την αποκατάσταση σοβαρών τραυμάτων γενικότερα αλλά και κακώσεων του μυοσκελετικού συστήματος ειδικότερα, την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου I, της καρδιακής ανεπάρκειας, διαφόρων εκφυλιστικών νοσημάτων και την αποκατάσταση βλαβών του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Vacanti et al., 2010). Φαίνεται δε ότι η εφαρμογή των αρχών της Ιστομηχανικής, σε συνδυασμό με τη χρήση των στελεχειαίων κυττάρων θα έχει τη μεγαλύτερη συμβολή προς αυτήν την κατεύθυνση (Takahashi et al., 2006).

2.2 Ιστομηχανική

Λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς στην παροχή λειτουργικού ιστού για αντικατάσταση, το ενδιαφέρον στρέφεται όλο και περισσότερο στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής και της μηχανικής ιστών (Badylak et al., 2012; Atala et al., 2012). Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στον τομέα της μηχανικής ιστών, μεταξύ άλλων και στον τομέα της ιστομηχανικής των αεραγωγών. Η ιστομηχανική εφαρμόζει τις αρχές και τις μεθόδους της βιοτεχνολογίας, της επιστήμης των υλικών, της μεταμόσχευσης των κυττάρων και των βιοεπιστημών, σε μια προσπάθεια να αναπτυχθούν *in vitro* βιολογικά υποκατάστατα ικανά να αποκαταστήσουν, να διατηρήσουν ή να βελτιώσουν τους ιστούς και τη

λειτουργία των οργάνων (Langer et al., 1993; Vacanti et al., 1999). Η μηχανική των ιστών απαιτεί κύτταρα και ικρίώματα πάνω στα οποία θα εγχυθούν τα κύτταρα (Atala et al., 2012, Badylak et al., 2012).

Το πρόσφατο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σ' ένα άλλο σκέλος της ιστομηχανικής και συγκεκριμένα τα σήματα, δηλαδή φαρμακευτικούς παράγοντες, ενδογενείς χημικές ουσίες ή κυτοκίνες, τα οποία επίσης φαίνεται να είναι κρίσιμα για τον σχηματισμό πλήρως λειτουργικών ιστών και οργάνων μέσω της ιστομηχανικής (Jungebluth et al., 2012).

Η ιστομηχανική μπορεί να εφαρμοστεί για να ανακατασκευαστούν κατεστραμμένοι ιστοί ή να αποκατασταθεί η λειτουργία των οργάνων. Για τη μηχανική των ιστών συνδυάζονται τέσσερα διαφορετικά συστατικά. Αυτά αποτελούνται από 1) τα κύτταρα είτε αυτόλογα είτε αλλογενή 2) βιολογικό ή συνθετικό ικρίωμα, 3) έναν βιοαντιδαστήρα *in vivo* ή *in vitro* και 4) βιοδραστικά μόρια/παράγοντες που πρέπει να ενισχύσουν και να στηρίξουν την ενδογενή αναγεννητική ικανότητα.

Οι προσεγγίσεις της ιστομηχανικής πλέον εφαρμόζονται για την ανάπτυξη της τραχειακής αντικατάστασης. Η ιστομηχανική είναι ένας διεπιστημονικός τομέας που εφαρμόζεται για την ανάπτυξη βιολογικών υποκατάστατων τα οποία επαναφέρουν, διατηρούν και βελτιώνουν τη λειτουργία των ιστών. Η ιστομηχανική είναι μοναδική ως προς αυτό καθώς χρησιμοποιεί τα κύτταρα του ίδιου του ασθενούς για την κατασκευή ικρίωματος μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο για απόρριψη του εμφυτεύματος και βελτιώνοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Η έρευνα για την ανάπτυξη τραχειακής αντικατάστασης έχει προχωρήσει πολύ αλλά περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Η Αναγεννητική Ιατρική είναι βέβαιο πως εισάγει μία καινούργια διάσταση στη θεραπευτική αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων (Oseni et al., 2012).

Λαμβάνοντας ως παράδειγμα την ιστομηχανική στην αποκατάσταση των αεραγωγών μπορεί να διαπιστωθεί ότι οι τεχνικές ιστομηχανικής ταξινομούνται σε τρεις τύπους οι οποίοι απεικονίζονται και αναλύονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6):

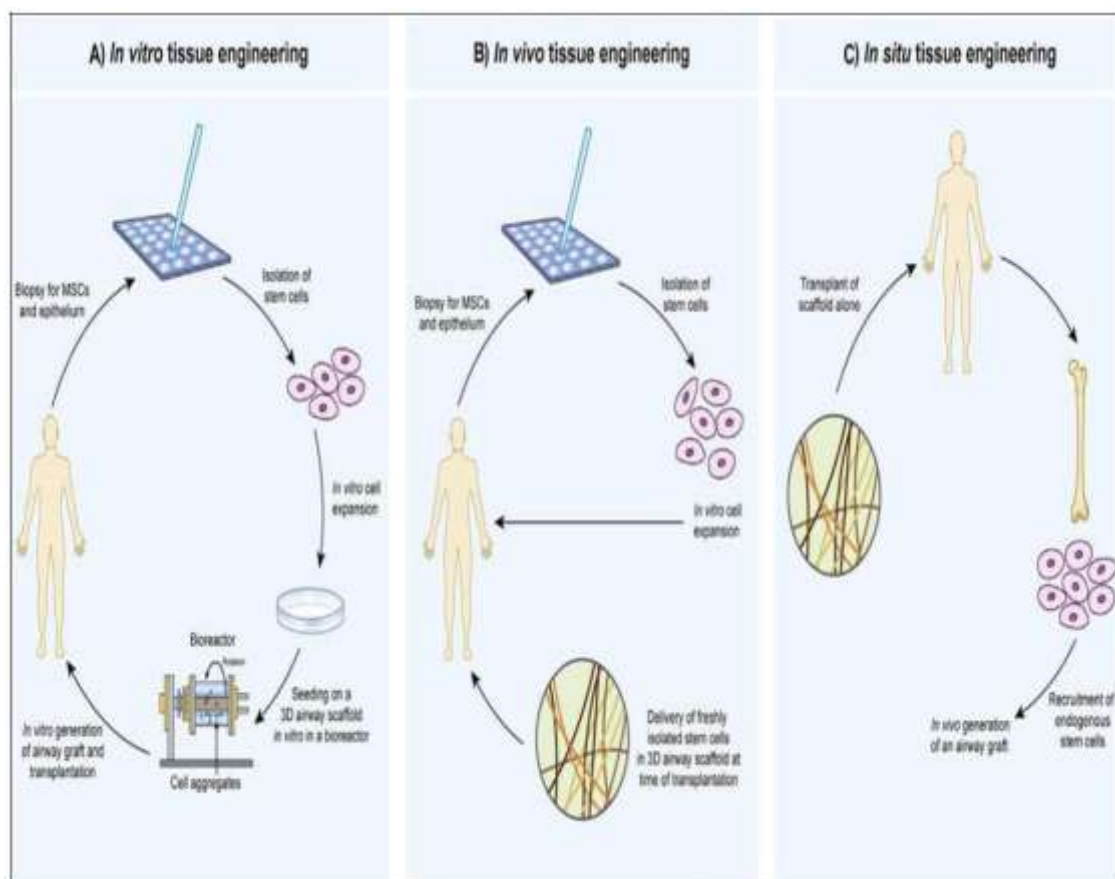
α) *in vitro*: ιστομηχανική των αεραγωγών: προγονικά κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε ένα ικρίωμα αεραγωγού στο εργαστήριο πριν την

εμφύτευση *in vivo*, είτε στατικά ή κοινώς χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο βιοαντιδραστήρα.

β) *in vivo*: ιστομηχανική των αεραγωγών: έγχυση ενός ικρίωματος αεραγωγών με προγονικά κύτταρα κατά το χρόνο της εμφύτευσης (ο ανθρώπινος ξενιστής είναι ένας «ζωντανός βιοαντιδραστήρας»).

γ) *in situ*: ιστομηχανική αεραγωγών: πρόσληψη των ενδογενών προγονικών κυττάρων του ξενιστή επί του ικρίωματος των αεραγωγών, τα οποία καλλιεργούνται χωρίς προγονικά κύτταρα του δότη. Τα προγονικά κύτταρα εμφανίζουν μοναδικές ιδιότητες αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης πολλών σειρών.

Κατά κανόνα όμως, η μηχανική ενός νέου ιστού απαιτεί κύτταρα, ένα ικρίωμα πάνω στο οποίο θα εγχυθούν, και ένα μέσο για την παροχή τροφής και την παροχή αίματος.



Εικόνα 6: Διαφορετικοί τύποι ιστομηχανικής. (A) *In vitro* (B) *In vivo* (C) *In situ* (Fishman et al 2014).

2.3 Μελλοντική προοπτική Αναγεννητικής Ιατρικής-Ιστομηχανικής

Η πρόσφατη πρόοδος στην αναγεννητική ιατρική έχει αποδείξει ότι υπάρχει δυνατότητα να αντιμετωπιστούν οι δύο μεγάλες προκλήσεις στις μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων, δηλαδή την κατάσταση χωρίς ανοσοκαταστολή (κλινική λειτουργική ανοχή) και μια προσφορά μιας δυνητικά ανεξάντλητης πηγής οργάνων (Orlando et al., 2011; Orlando et al., 2012). Ενώ ένα τέτοιο κατόρθωμα θεωρήθηκε προηγουμένως ανυπέρβλητο, η ομάδα των Fishman και συνεργατών (Fishman et al., 2014) έχει πρόσφατα αποδείξει ότι οι αεραγωγοί (τραχεία) των ασθενών μπορεί να αντικατασταθούν με επιτυχία χρησιμοποιώντας τεχνικές μηχανικής ιστών και, σε κάθε περίπτωση, η ποιότητα ζωής των ασθενών ήταν σημαντικά βελτιωμένη (Fishman et al., 2011; Jungebluth et al., 2011; Macchiarini et al., 2008; Baiguera et al., 2010; Elliott et al., 2012). Παρακολούθηση δεδομένων αυτών των περιπτώσεων σε δύο (Elliott et al., 2012) και πέντε χρόνια (Gonfiotti et al., 2014) έχουν πρόσφατα αναφερθεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επεκτείνοντας αυτό στην αντικατάσταση των οργάνων και των ιστών που εξαρτώνται από την ενεργή συστολή για να λειτουργούν σωστά (π.χ. λαρυγγίτιδα, γλώσσα και οισοφάγος) θα αυξήσουν σημαντικά τον αριθμό ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την παραπάνω τεχνολογία στην τραχειακή αντικατάσταση μόνο. Εν ολίγοις, η προοπτική να είναι σε θέση να δημιουργηθούν προσαρμοσμένοι, πλήρως λειτουργικοί, μη ανοσογονικοί ιστοί και όργανα από το μηδέν, μέσω μηχανικής ιστών, είναι ελκυστική πρόταση.

Αυτόλογοι ιστοί έχουν το κύριο πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν ανοσοκαταστολή, αλλά κλινικές εφαρμογές περιορίζονται επί του παρόντος σε στατικά όργανα και ιστούς, όπως το δέρμα, ή αυτά που μπορούν να λειτουργήσουν μόνο με παθητική κίνηση όπως η τραχεία, καρδιακές βαλβίδες, αιμοφόρα αγγεία, ουροδόχο κύστη και ουρήθρα (Dohmen et al., 2011; Hibino et al., 2010; Raya-Rivera et al., 2011). Έτσι, αν και αντικατάσταση των αεραγωγών (Jungebluth et al., 2011; Macchiarini et al., 2008; Baiguera et al., 2010; Elliott et al., 2012), των αιμοφόρων αγγείων (Olausson et al., 2012) ή ουρογεννητικού ιστού (Atala et al., 2006) έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τεχνικές βασισμένες σε βλαστοκύτταρα, η μηχανική άλλων ιστών όπως ολόκληρου λάρυγγα και των φωνητικών χορδών έχει μελετηθεί μερικώς

(Fishman et al., 2012; Johnson et al., 2010; Nomoto et al., 2012; Kanemaru et al., 2013; Cedervall et al., 2007; Svensson et al., 2011; Ma et al., 2013).

Αυτός ο τομέας, ωστόσο, συνεχίζει να επεκτείνεται και η μηχανική ιστών έχει ήδη προσφέρει ή είναι κοντά στην παροχή αντικατάστασης λειτουργικών ανθρώπινων οργάνων (Totonelli et al., 2012; Mertsching et al., 2009). Η ικανότητα παραγωγής επανανευρωμένων και επαναγγειωμένων ιστών θα επέκτεινε σημαντικά τις πιθανές κλινικές εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής και αποτελεί ένα θέμα που έχει συζητηθεί πολύ (Fishman et al., 2011; De Coppi et al., 2005; Fishman et al., 2012).

Η ιστομηχανική είναι μια εναλλακτική θεραπεία και έχει αποδειχθεί η δυνατότητα της σε διάφορες κλινικές μεθόδους. Διαφορετικές μεθοδολογίες και μακροπρόθεσμη παρακολούθηση θα εξακριβώσουν την ιδανική εφαρμογή. Η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης παρουσιάζει ιδιαίτερη δυναμική (Maghsoudlou et al., 2013; Nichols et al., 2013) και τα ικρίωματα τραχείας εμβολιάζονται με μια ποικιλία διαφορετικών κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (Petersen et al., 2010; Ott et al., 2010), εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (Lecht et al., 2014) μεσεγχυματικών (Wagner et al., 2014; Bonvillain et al., 2012) και πιο πρόσφατα iPSCs (Ghaedi et al., 2013). Ωστόσο περαιτέρω πρόοδος πρέπει να γίνει σε αυτόν τον τομέα τα επόμενα χρόνια.

2.4 Ικρίωματα

2.4.1 Χαρακτηριστικά ενός «ιδανικού» ικρίωματος για ιστομηχανική.

Για να χαρακτηριστεί ένα ικρίωμα ιδανικό προς μεταμόσχευση θα πρέπει να πληροί κάποιες βασικές προϋποθέσεις και να έχει συγκεκριμένες ιδιότητες. Βασικά χαρακτηριστικά είναι η βιοσυμβατότητα, η μη ανοσογονικότητα, η βιοδραστικότητα και οι χημειοελκτικές ιδιότητες που πρέπει να έχει. Τα ικρίωματα πρέπει να αποτελούν πρότυπο για την ανάπτυξη ιστού σε τρεις διαστάσεις, να διατηρούν ή/και να προωθούν την ανάπτυξη των σχετικών κυττάρων/ιστού, να επιδεικνύουν κατάλληλη μικροαρχιτεκτονική και λειτουργικές ιδιότητες, να κατέχουν κατάλληλη βιο-μηχανική αντοχή για το σκοπό που προορίζονται καθώς επίσης και λειτουργική αγγείωση για παροχή

οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών. Επίσης τα ικριώματα πρέπει να είναι απόλυτα ασφαλή για τον οργανισμό, δηλαδή να είναι μη τοξικά, μη καρκινογόνα και στείρα (Fishman et al., 2014).

2.4.1.1 Κατηγορίες Ικριωμάτων

Τα ικριώματα που χρησιμοποιούνται στην ιστομηχανική μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη σύνθεσή τους σε α) φυσικά ή αποκυτταροποιημένα και β) συνθετικά. Τα φυσικά ικριώματα μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με βάση την προέλευση του ιστού δηλαδή,

i. Αυτόλογο (Autologous): ικριώμα που προέρχεται από το ίδιο το άτομο για το οποίο κατασκευάζεται ο ιστός.

ii. Συγγενές (Syngeneic): ικριώμα που προέρχεται από άτομο με πρώτου βαθμού συγγένεια με αυτό για το οποίο κατασκευάζεται ο ιστός.

iii. Αλλογενές (Allogenic): ικριώμα που προέρχεται από άλλο άτομο, του ίδιου όμως είδους με αυτό για το οποίο κατασκευάζεται ο ιστός.

iv. Ξενογενές (Xenogenic): ικριώμα που προέρχεται από άλλο είδος από αυτό για το οποίο κατασκευάζεται ο ιστός.

Όσον αφορά την παρασκευή συνθετικών ικριωμάτων, έχουν διερευνηθεί και αξιολογηθεί πολλά διαφορετικά υλικά (Fishman et al., 2011; Lange et al. 2011; Crapo et al. 2011; Gilbert et al., 2006; Totonelli et al., 2012). Πολλή συζήτηση περιβάλλει το αν θα χρησιμοποιηθούν φυσικά προερχόμενα ικριώματα, τα οποία αποσκοπούν στη διατήρηση των βασικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας μέσω μιας διαδικασίας που είναι γνωστή ως αποκυτταροποίηση, έναντι συνθετικών ικριωμάτων (Fishman et al., 2014).

Κατά τα τελευταία έτη, έχει αποδειχθεί ότι αποκυτταροποιημένες μήτρες, που λαμβάνονται με ενζυματική μέθοδο, είναι μη-ανοσογόνες, μπορούν να συμπεριφέρονται ως ικριώματα, μπορούν να επικοισθούν *in vivo* από κύτταρα του ξενιστή και να προωθήσουν την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων, καθώς επίσης να οδηγήσουν στην σύνδεση των νέων κυττάρων και της μήτρας στον οργανισμό αποκαθιστώντας πλήρως τη λειτουργία του ιστού. (Fishman et al., 2013; Crapo et al. 2011). Επιπλέον τα ικριώματα που προέρχονται από αποκυτταροποιημένους ιστούς έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία τόσο σε προκλινικές μελέτες σε ζωικά πρότυπα, όσο και σε ανθρώπινες κλινικές

εφαρμογές, χωρίς να παρατηρηθεί σχηματισμός αντι-HLA αντισώματων (Elliott et al., 2012; Gonfiotti et al., 2014; Olausson et al., 2012).

Σε σύγκριση με τα συνθετικά ικρίωματα, τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αποκυτταροποίησης κείται στην ομοιότητα της ανατομίας του αποκυτταροποιημένου ικρίωματος με το φυσικό ιστό, στη λειτουργικότητα, στην ενίσχυση της αγγειογένεσης και της μετανάστευσης των κυττάρων καθώς και στην εμβιομηχανική που μπορεί να επιτευχθεί, δηλαδή τη μελέτη της δομής, ανάπτυξης και λειτουργίας βιολογικών συστημάτων (Πίνακας 1) (Fishman et al., 2014; Beattie et al., 2009). Ένα πιθανό μειονέκτημα των αποκυτταροποιημένων αλλογενών ικριωμάτων επί του παρόντος, είναι η ανάγκη για πτωματικούς δωρητές προκειμένου να συλλεχθεί ιστός για αποκυτταροποίηση. Παρ' όλα αυτά, οι ιστοί μπορούν να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση αυξάνοντας έτσι τους πιθανούς δότες σε σύγκριση με τη συμβατική μεταμόσχευση.

ΦΥΣΙΚΑ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ	ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ
Βιολογικά ικρίωματα-που αποτελούνται από εξωκυττάρια ουσία (ECM) μιμούνται το φυσικό ιστό και μπορούν να φιλοξενήσουν ανάπτυξη.	Τεχνητά υλικά (π.χ. πολυκαπρολακτόνη)
Περιέχουν αντιγόνα του δότη: η αποκυτταροποίηση τα καθιστά μη ανοσογόνα.	Πιο πιθανό να προκαλέσουν μια ανοσιακή αντίδραση όταν εμφυτεύονται εντός του ξενιστή
Καλύτερη βιοσυμβατότητα	Η βιοσυμβατότητα εξαρτάται από το υλικό
Εξαιρετική μικροαρχιτεκτονική των ιστών	Η μικροαρχιτεκτονική δε μοιάζει με τον ιστό που χρησιμοποιείται για να αντικαταστήσει
Εξαιρετική βιοδραστικότητα αν οι αυξητικοί παράγοντες διατηρηθούν	Η βιοδραστικότητα εξαρτάται από το υλικό
Διατήρηση του μικροαγγειακού συστήματος	Απών αγγειακό σύστημα
Οι βιο-μηχανικές ιδιότητες εξαρτώνται από το υλικό	Οι βιο-μηχανικές ιδιότητες μπορούν να ελεγχθούν
Πιθανότητα μικροβιακής μόλυνσης κατά την προετοιμασία και την αποθήκευση	Μόλυνση λιγότερο πιθανή
Απαιτούνται ώρες για τη συγκομιδή και την προετοιμασία (εβδομάδες). Η προμήθεια εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των δωρητών ιστών	Η προετοιμασία τους είναι πιο γρήγορη και δεν απαιτείται διαθεσιμότητα αφού μπορούν να δημιουργηθούν εκ νέου.
Φθηνότερα να κατασκευαστούν	Πιο ακριβά για να κατασκευαστούν

Πίνακας 1: Σύγκριση φυσικών και συνθετικών ικριωμάτων (Fishman et al., 2014).

2.5 Κύτταρα που Χρησιμοποιούνται στην Ιστομηχανική

Τα βλαστικά κύτταρα αποτελούν βασικό συστατικό της αναγέννησης των ιστών λόγω της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται και να αυτοανανεώνονται. Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να στρατολογηθούν στην τραυματισμένη περιοχή μέσω δύο μηχανισμών: ενσωμάτωση σε μηχανικό ιστό ή προσέλευση στην περιοχή του τραύματος με τη βοήθεια βιοϋλικών και / ή διαλυτών παραγόντων (συμπεριλαμβανομένων παραγόντων ανάπτυξης, χημειοκινών και κυτοκίνες). Η ανάπτυξη ενός ικρίωματος απαιτεί την επιλογή των σωστών βιοϋλικών και τις μεθόδους κατασκευής, καθώς ο σχηματισμός ιστών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη βιοσυμβατότητα, βιοδραστικότητα (π.χ. προσκόλληση κυττάρων, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση), μηχανικές ιδιότητες και το 3-D περιβάλλον (π.χ. πορώδες, πόρος μεγέθους και διασύνδεση πόρων) του ικρίωματος. Το ικρίωμα πρέπει να διαθέτει τον κατάλληλο ρυθμό αποικοδόμησης που ταιριάζει με το ρυθμό σχηματισμού ιστού και να έχει μη τοξικά προϊόντα αποικοδόμησης. Οι βιοαντιδραστήρες μπορούν να παρέχουν μηχανικά ερεθίσματα σε κύτταρα που μιμούνται *in vivo* συνθήκες. Αυτές οι μηχανικές ενδείξεις είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας και την αναδιαμόρφωση του ιστού, για να παράγουν ένα μηχανικό ιστό που μοιάζει πολύ με τον εγγενή ιστό. Επιπλέον, οι βιοαντιδραστήρες βοηθούν στην παροχή θρεπτικών συστατικών, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την υποστήριξη των κυττάρων σε ένα κατασκευάσμα 3-D (Baiguera et al., 2013; Grillo et al., 2002).

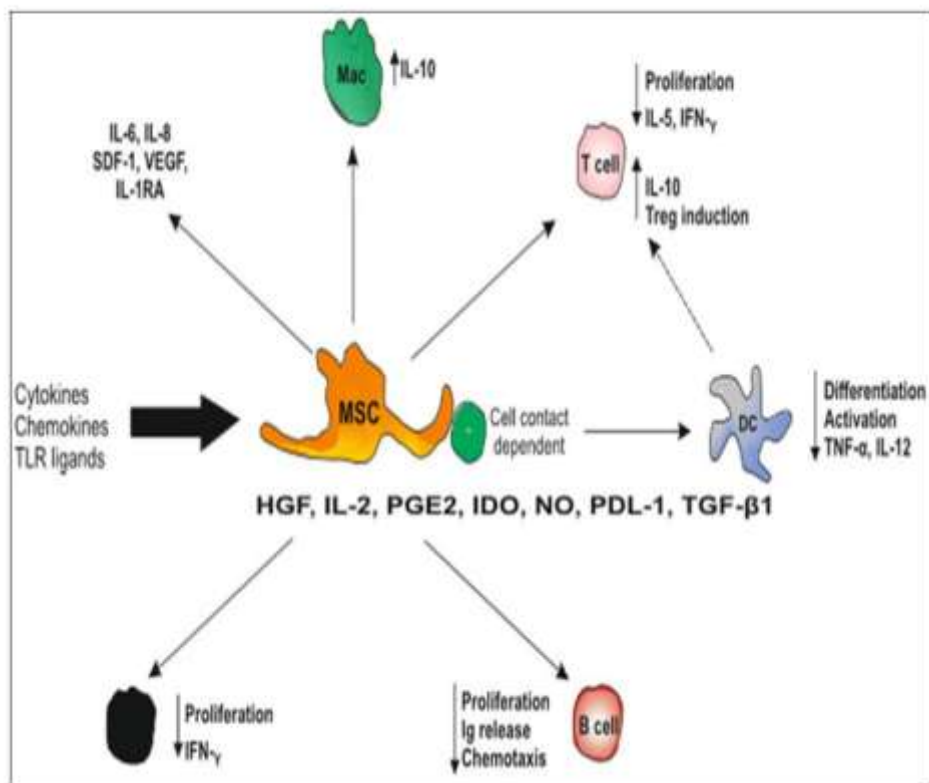
Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται σήμερα στην Ιστομηχανική είναι κυρίως τα πολυδύναμα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (MSCs). Τα MSCs είναι πολυδύναμα κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης που έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1976 από τους Friedenstein και συνεργάτες (Conese et al., 2013). Τα MSCs αυτοανανεούμενα πολυδύναμα, μη αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα. Οι πηγές MSCs συμπεριλαμβάνουν μυελό των οστών (BMMSC), ιστό του ομφάλιου λώρου (Wharton's Jelly derived-WJMSC), λιπώδη ιστό (ATMSC), αίμα ομφάλιου λώρου (UCMSCS) και εμμηνορροϊκό αίμα (MBMSC). Τα ανθρώπινα MSCs μπορούν να ληφθούν

απευθείας από τον ασθενή, οπότε η επακόλουθη χρήση αυτών των κυττάρων στο κλινικό περιβάλλον θα είχε το πλεονέκτημα ότι είναι αυτόλογη μεταμόσχευση και δεν υπάρχει κίνδυνος απόρριψης (D'Agostino et al., 2010). Τα WJMSCs είναι πολλά υποσχόμενα κύτταρα επειδή η πηγή είναι αρκετά διαθέσιμη και η συλλογή των κυττάρων είναι μη επεμβατική. Τα WJMSCs έχουν συμβατούς επιφανειακούς δείκτες και κυτταρικά χαρακτηριστικά με τα BMMSCs και ATMSCs. Έχουν καλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού και δεν έχει αναφερθεί καμία ογκογονικότητα μέχρι σήμερα. Τα WJMSCs μπορούν να παρουσιάσουν λιπογενή, οστεογονική και χονδρογονική διαφοροποίηση υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας (D'Agostino et al., 2010).

Αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται τόσο σε μεσεγχυματικές όσο και σε μη μεσεγχυματικές κυτταρικές σειρές. Η Επιτροπή Μεσεγχυματικών και Ιστικών Βλαστικών Κυττάρων της Διεθνούς Εταιρείας Κυτταρικής Θεραπείας (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy) πρότεινε ελάχιστα κριτήρια για τον καθορισμό των ανθρώπινων MSCs. Τα MSCs, όπως προαναφέρθηκε, έχουν τρεις σημαντικές ιδιότητες (Domicini et al. 2006; Gotts et al. 2013)

1. Ικανότητα διαφοροποίησης σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα.
2. Ικανότητα προσκόλλησης σε πλαστικές επιφάνειες κυτταροκαλλιέργειας
3. Έκφραση επιφανειακών δεικτών: CD 73, CD 90, CD 105
4. Καθόλου έκφραση επιφανειακών δεικτών : CD 14, CD 19, CD 34, CD 45, HLA-DR

Τα MSCs έχουν επίσης τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε κυψελιδικά κύτταρα, πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα, αγγειακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, αυτή η ικανότητα εξαρτάται από τη δόσολογία, το χρόνο και τον τρόπο εισαγωγής τους και ο ρόλος τους στην αναγέννηση των πνευμόνων σε νοσούντες πνεύμονες είναι ασαφής (Inamdar et al., 2013). Η εικόνα 7 συνοψίζει *in vitro* ανοσοδιαμορφωτικές επιδράσεις των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του εύρους των *in vitro* ανοσοδιαμορφωτικών αποτελεσμάτων που περιγράφονται για τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs). DC= δενδριτικό κύτταρο. HGF= αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων. IDO= 2,3-διοξυγενάση ινδολαμίνης. IFN- γ = ιντερφερόνη γ ; Ig= ανοσοσφαιρίνη. IL= Ιντερλευκίνη. IL-1RA= ανταγωνιστής υποδοχέα ιντερλευκίνης-1, Mac= μακροφάγα; NK= φυσικοί φονείς PGE2= προσταγλανδίνη E-2. SDF-1= παράγοντας 1 που προέρχεται από βλαστικά κύτταρα. TNF- α = παράγοντας νέκρωσης όγκου- α . TGF- β 1= παράγοντας ανάπτυξης μετασχηματισμού- β 1. TLR= δεσμευτικός υποδοχέας VEGF= αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας. (Sueblinvong et al., 2010).

Τα βλαστικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην οντογένεση και την αναγέννηση των ανθρώπινων ιστών. Μπορούν να οριστούν ως κύτταρα που έχουν την ικανότητα να ανανεώνεται μόνα τους, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν ιδιότητες διαφοροποίησης πολλαπλών κυτταρικών σειρών (Fishman et al., 2011). Τα βλαστικά κύτταρα, είτε πρόκειται για ενήλικα (π.χ. μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα) ή εμβρυονικά ή προερχόμενα από αμνιακό υγρό ή επαγόμενα πολυδύναμα, αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό για μελλοντικές προσεγγίσεις μηχανικής ιστών (Fishman et al., 2013). Η ανακάλυψη και ευρεία εφαρμογή των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs) αποτελεί έναν

εξελισσόμενο τομέα για την αναγεννητική ιατρική και πιθανόν προσφέρει μεγαλύτερη ελπίδα για την εκπλήρωση των όσων προαναφέρθηκαν (Fairchild et al., 2010; Takahashi et al., 2006). Τα πρόσφατα ευρήματα ότι πιθανόν αυτά τα κύτταρα είναι μη ανοσογόνα, σε αντίθεση με προηγούμενα ευρήματα, παρέχουν έναν επιπλέον λόγο για τη χρήση τέτοιων κυττάρων στη μελλοντικές προσεγγίσεις μηχανικής ιστών (Araki et al., 2013; Zhao et al., 2011). Η πρόσφατη ένδειξη ότι τα κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν *in vivo* σε ολοδύναμα ("*in vivo*" iPSCs) αποτελεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω ανάπτυξη (Abad et al., 2013), όπως στη χρήση του χημικού επαναπρογραμματισμού με τη χρήση μικρομοριακών σωματιδίων, που μπορεί να επιτρέψει να πραγματοποιηθεί επαναπρογραμματισμός *in situ* με ελεγχόμενο τρόπο (Hou et al., 2013). Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) μπορούν να δημιουργηθούν μέσω τεχνικών μεταφοράς εμπύρηνων σωματικών κυττάρων (κλωνοποίησης), ένα επίτευγμα που πιστεύαμε προηγουμένως ανυπέρβλητο (Tachibana et al., 2013). Αυτό δίνει τη δυνατότητα, μελλοντικά, να δημιουργηθούν εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που δεν απορρίπτονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς.

2.6 Βιοαντιδραστήρες

Ένας βιοαντιδραστήρας είναι μια συσκευή που προσπαθεί να προσομοιώσει ένα φυσιολογικό περιβάλλον με σκοπό να προωθήσει την ανάπτυξη κυττάρων ή ιστών *in vitro*. Ένα φυσιολογικό περιβάλλον μπορεί να καθορίζεται από πολλές διαφορετικές παραμέτρους, όπως για παράδειγμα τη θερμοκρασία και το οξυγόνο ή τη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα. Όμως μπορεί να εκτείνεται σε όλα τα είδη βιολογικών, χημικών, ή μηχανικών ερεθισμάτων. Για το λόγο αυτό υπάρχουν συστήματα που συμπεριλαμβάνουν την εφαρμογή δυνάμεων ή τάσεων στους ιστούς, ή ακόμη και ηλεκτρικού ρεύματος σε μοντέλα 2 ή 3 διαστάσεων.

Πολλοί διαφορετικοί τύποι βιοαντιδραστήρων έχουν περιγραφεί, συμπεριλαμβανομένων των βιοαντιδραστήρων με στροβιλιστή-φιάλη, με περιστρεφόμενο τοίχο, των βιοαντιδραστήρων συμπίεσης, στέλεχος, υδροστατικός, ροής-αιμάτωσης καθώς και συνδυαστικοί βιοαντιδραστήρες

(Plunkett et al., 2011). Η χρήση τους επιτρέπει την *in vitro* καλλιέργεια μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων ενώ παράλληλα, δίνει τη δυνατότητα 1) ελέγχου της ροής, της ανάμιξης και του pH του θρεπτικού υλικού, 2) της θερμοκρασίας, 3) της μεταφοράς αερίων, θρεπτικών συστατικών, μεταβολιτών και ρυθμιστικών μορίων, ούτως ώστε να βελτιστοποιείται η ανάπτυξη των κυττάρων και ο σχηματισμός ιστών *in vitro* (Lange et al., 2011). Μια διαδεδομένη μορφή που χρησιμοποιείται για τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες, αποτελείται από μικρούς πλαστικούς κυλινδρικούς θαλάμους με ρυθμιζόμενη εσωτερική υγρασία. Οι βιοαντιδραστήρες αυτοί χρησιμοποιούν βιοενεργά συνθετικά υλικά, όπως μεμβράνες από τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο, για να περιβάλλουν τα σφαιρικά κύτταρα. Έτσι δημιουργούν ένα περιβάλλον που διατηρεί υψηλά επίπεδα θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, είναι εύκολοι στο άνοιγμα και στο κλείσιμο, έτσι ώστε τα σφαιρίδια κυττάρων να μπορούν να αφαιρεθούν για εξέταση. Ο θάλαμος όμως μπορεί να διατηρήσει 100% υγρασία ακόμα και μετά το άνοιγμα καθώς η υγρασία είναι σημαντική για την διατήρηση της μέγιστης ανάπτυξης και της λειτουργικότητας των κυττάρων. Εναλλακτικά σχέδια βιοαντιδραστήρα θα είναι απαραίτητα για να κατασκευάσουν για πιο εξειδικευμένους ιστούς.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι, με τις παρούσες συνθήκες, η κατασκευή οποιουδήποτε λειτουργικού ιστού ή οργάνου με τη συμβολή της ιστομηχανικής, συμπεριλαμβανομένων των μοσχευμάτων των αεραγωγών, απαιτεί τη δοκιμή διαφόρων τύπων των βιοαντιδραστήρων. Πιθανόν δε να είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός και η *de novo* κατασκευή συσκευών, γεγονός που επιβραδύνει τις ιατρικές εξελίξεις και τις καθιστά εξαρτώμενες από την τεχνολογική πρόοδο ενώ παράλληλα αυξάνει και το κόστος των κλινικών εφαρμογών που προκύπτουν. Προηγούμενες εργασίες στον τομέα της ιστομηχανικής που επιχείρησαν να παρακάμψουν το εμπόδιο αυτό, βασίστηκαν στη χρήση των στατικών τεχνικών κυτταρικής καλλιέργειας για την *in vitro* παραγωγή μοσχεύματος. Ωστόσο, αυτό αναπαριστά μόνο εν μέρει, τι συμβαίνει στον οργανισμό όπου κύτταρα και μήτρες αλληλεπιδρούν σε ένα τρισδιάστατο δυναμικό μικροπεριβάλλον (Fishman et al 2014). Κατά συνέπεια απαιτείται η μελέτη και ανάπτυξη τεχνικών που θα μπορούσαν να αποτελέσουν αξιόπιστες εναλλακτικές λύσεις.

Οι συνθήκες λειτουργίας ενός βιοαντιδραστήρα, όπως το pH, η θερμοκρασία, η τάση οξυγόνου, η παροχή θρεπτικών ουσιών, μπορούν να είναι διαχειρίσιμες. Οι βιοαντιδραστήρες μπορούν να ταξινομηθούν σε στατικούς και δυναμικούς βιοαντιδραστήρες. Σε σύγκριση με τους στατικούς, το δυναμικό σύστημα καλλιέργειας έχει το πλεονεκτήματα μιας πιο ομοιογενούς κατανομής κυττάρων, επιτρέποντας τη ροή υγρών που βοηθάει την παροχή θρεπτικών ουσιών και την απομάκρυνση των αποβλήτων καθώς και την παροχή μηχανικών ερεθισμάτων (όπως π.χ. υδροδυναμική διατμητική τάση, συμπίεση, πίεση και τέντωμα) που καθοδηγούν την κατάλληλη κυτταρική διαφοροποίηση, την έκκριση της μήτρας και τον σχηματισμό ιστού (Vunjak-Novakovic et al., 1999). Μηχανικά σταθερός χόνδρινο ιστός και ένα κροσσωτό επιθήλιο στην εξωτερική επιφάνεια και την επιφάνεια του αυλού, αντίστοιχα, είναι σημαντικά για να διασφαλιστεί η σωστή λειτουργία των ιστών και να μειωθούν οι επιπλοκές. Η παρουσία αυτών των δύο συστατικών ιστού μπορούν να μειώσουν σημαντικά τον κίνδυνο στένωσης, απόφραξης των αεραγωγών και λοίμωξης λόγω διαταραχής της μεταφοράς βλέννας.

Για μια τεχνητή τραχεία, ο βιοαντιδραστήρας που χρησιμοποιείται θα πρέπει να παρέχει τις ακόλουθες λειτουργίες 1) πρέπει να αποτελείται από δύο ξεχωριστά διαμερίσματα για την έγχυση και την καλλιέργεια διαφορετικών τύπων κυττάρων στην εσωτερική και εξωτερική επιφάνεια του σωληνοειδούς κατασκευάσματος, 2) θα πρέπει να περιστρέφεται ώστε να κατανέμει ομοιογενώς τα κύτταρα στη μήτρα και να ενισχύει την οξυγόνωση, την παροχή θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των αποβλήτων, και 3) θα πρέπει να παρέχει ένα υδροδυναμικό ερέθισμα για την προώθηση της σωστής ανάπτυξης και διαφοροποίησης των κυττάρων (Bader et al., 2010). Είναι επίσης πολύ επιθυμητό να μπορεί ο βιοαντιδραστήρας να λειτουργεί υπό στείρες συνθήκες, να είναι πλήρως αυτοματοποιημένος, να μπορεί να ελέγχεται εξ αποστάσεως και να είναι συμβατός με την ορθή εργαστηριακή πρακτική.

Η πρώτη τεχνητή τραχεία που μεταμοσχεύθηκε κλινικά καλλιεργήθηκε εντός ενός ειδικά σχεδιασμένου βιοαντιδραστήρα που βοήθησε στην έγχυση κυττάρων, τη διανομή θρεπτικών ουσιών και την απομάκρυνση αποβλήτων παρέχοντας ταυτόχρονα την αναγκαία τάση διατμήσεως μέσω συνεχούς περιστροφής για την προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης (Machiarini et al., 2008). Ο βιοαντιδραστήρας επιτρέπει την έγχυση των χονδρογόνο-υπαγόμενων

μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων στις εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες του τραχειακού μοσχεύματος, αντίστοιχα.

Οι βιοαντιδραστήρες έχουν διαδραματίσει κεντρικό ρόλο στον τομέα της μηχανικής ιστών, διότι βοηθούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων και βιοϋλικών. Επιτρέπουν την παραγωγή μεγάλων και πυκνών ιστομηχανικών κατασκευών που δεν μπορούν να επιτευχθούν με χρήση συμβατικών συστημάτων στατικής καλλιέργειας και μπορούν να παρέχουν ένα δυναμικό περιβάλλον καλλιέργειας που δίνει φυσιολογικά και μηχανικά ερεθίσματα που μιμούνται τις *in vivo* συνθήκες.

3. Αποκυτταροποίηση

Βιολογικά ικρίωματα προερχόμενα από αποκυτταροποιημένους ιστούς και όργανα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και σε προκλινικές μελέτες σε ζώα και σε κλινικές εφαρμογές στον άνθρωπο (Badylak et al., 2004; Chen et al., 1999; Dellgren et al., 1999; Harper et al., 2011; Kolker et al., 2005; Lee et al., 2004; Metcalf et al., 2002, Wainwright et al., 1995). Η αποκυτταροποίηση μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση κυτταρικού και πυρηνικού υλικού από ιστό ή όργανο, ενώ ελαχιστοποιεί κάθε αρνητική επίδραση στη σύνθεση, τη βιολογική δραστηριότητα και τη μηχανική ακεραιότητα της υπόλοιπης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Extracellular Matrix-ECM) (Badylak et al., 2012). Η διαδικασία της αποκυτταροποίησης μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη σύνθεση, τη μηχανική συμπεριφορά των ικριωμάτων και την ανταπόκριση του ξενιστή προς αυτά καθώς επίσης μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τη μετέπειτα χρήση τους *in vitro* και *in vivo* (Conconi et al., 2005; Jungebluth et al., 2009; Partington et al., 2013; Meezan et al., 1975). Η απομάκρυνση των κυττάρων αφήνει πίσω του ένα σύνθετο μείγμα δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών που συνιστούν την ECM (π.χ., κολλαγόνο, λαμινίνη, φιβρονεκτίνη, ελαστίνη, γλυκοζαμινογλυκάνες και αυξητικούς παράγοντες) (Fishman et al., 2014).

Η απομάκρυνση των κυττάρων από έναν ιστό ή ένα όργανο πρέπει να διατηρεί το σύνθετο μείγμα δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM). Οι ιστοί από του οποίους προέρχεται η ECM, το

είδος προέλευσης, η μέθοδοι αποκυτταροποίησης και οι μέθοδοι αποστείρωσης για αυτά τα βιολογικά ικρίωματα ποικίλλει ευρέως. Κάθεμια από αυτές τις μεταβλητές επηρεάζει τη σύνθεση και τη δομή της ECM και κατά συνέπεια, επηρεάζει την απάντηση του ιστού ξενιστή στο ικρίωμα της ECM μετά την εμφύτευση. Είναι σημαντικό να υπάρχει γενική εικόνα από τις διάφορες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποκυτταροποίηση των ιστών και τις πιθανές επιδράσεις των διαφόρων πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης για τη βιοχημική σύνθεση, δομή, και τη μηχανική συμπεριφορά των συστατικών του ικρίωματος της ECM.

Τα ξενογενή και αλλογενή κυτταρικά αντιγόνα, εξ' ορισμού, αναγνωρίζονται ως ξένα από τον λήπτη και ως εκ τούτου προκαλούν φλεγμονώδη απόκριση ή απόρριψη του ιστού. Ωστόσο, τα στοιχεία της ECM διατηρούνται γενικά μεταξύ των ειδών και είναι καλά ανεκτά ακόμη και από ξενογενείς λήπτες (Bernard et al., 1983; Constantinou et al., 1991; Exposito et al., 1992). Η ECM από μια ποικιλία ιστών, συμπεριλαμβανομένων καρδιακών βαλβίδων (Bader et al., 1998; Booth et al., 2002; Grauss et al., 2005; Kasimir et al., 2003; Korossis et al., 2002; Rieder et al., 2004; Schenke-Lavland et al., 2003), αιμοφόρων αγγείων (Conklin et al., 2002; Dahl et al., 2003; Schmidt et al., 2000; Uchimura et al., 2003), δέρματος (Chen et al., 2004), νεύρων (Hudson et al., 2004; Kim et al., 2004), σκελετικών μυών (Borschel et al., 2004), τενόντων (Cartmell et al., 2000), συνδέσμων (Woods et al., 2005), υποβλεννογόνου του λεπτού εντέρου (Badylak et al., 1989; Badylak et al., 1995; Kropp et al., 1995), της ουροδόχου κύστης (Freytes et al., 2004; Gilbert et al., 2005) και του ήπατος (Lin et al., 2005) έχουν μελετηθεί για μηχανική ιστών και εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής. Ο στόχος ενός πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης είναι να αφαιρέσει αποτελεσματικά όλα τα κυτταρικά και τα πυρηνικά στοιχεία, ελαχιστοποιώντας τις δυσμενείς επιπτώσεις στην σύνθεση, τη βιολογική δραστηριότητα και τη μηχανική ακεραιότητα της υπόλοιπης ECM. Οποιοδήποτε στάδιο επεξεργασίας για την αφαίρεση κυττάρων θα μεταβάλει την φυσιολογική τρισδιάστατη αρχιτεκτονική της ECM. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την αποκυτταροποίηση των ιστών περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων. Οι φυσικές μέθοδοι μπορεί να περιλαμβάνουν διέγερση ή υπερήχηση, μηχανική πίεση ή κατάψυξη και απόψυξη. Αυτές οι μέθοδοι διαταράσσουν την κυτταρική

μεμβράνη, απελευθερώνουν τα περιεχόμενα των κυττάρων και διευκολύνουν την επακόλουθη απομάκρυνση των κυτταρικών περιεχομένων από την ECM. Αυτές οι φυσικές θεραπευτικές αγωγές είναι γενικά ανεπαρκείς για την επίτευξη πλήρους αποκυτταροποίησης και πρέπει να συνδυαστεί με μια χημική μέθοδο. Ενζυματικές επεξεργασίες, όπως η χρήση του ενζύμου θρυψίνης, και χημική επεξεργασία, όπως ιοντικά διαλύματα και απορρυπαντικά, μπορούν να διαταράξουν τις κυτταρικές μεμβράνες και τους δεσμούς που είναι υπεύθυνοι για τις ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές συνδέσεις. Οι ιστοί συντίθενται τόσο από κυτταρικό υλικό όσο και από το ECM με μεταβλητούς βαθμούς συνοχής που εξαρτάται από το είδος του ιστού. Η ECM πρέπει να διαταράζεται επαρκώς κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποκυτταροποίησης ώστε να είναι επαρκής η έκθεση όλων των κυττάρων στους παράγοντες αποκυτταροποίησης και να παρέχεται μια διαδρομή για την απομάκρυνση του κυτταρικού υλικού από τον ιστό. Η σκοπιμότητα των περισσότερων διαδικασιών αποκυτταροποίησης είναι να ελαχιστοποιήσουν τη διαταραχή και έτσι να διατηρήσουν τη φυσιολογικές, μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες του ιστού.

Η πλήρης αποκυτταροποίηση των περισσότερων ιστών απαιτεί ένα συνδυασμό φυσικών, ενζυματικών και χημικών επεξεργασιών, και το κλινικό πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τον ιστό. Γενικά είναι επιθυμητό να χρησιμοποιείται το πιο ήπιο πρωτόκολλο που να αποδίδει ένα ακυτταρικό υλικό χωρίς αλλοίωση του δομικού και λειτουργικού στοιχείου της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM).

Η αφαίρεση των πρωτεϊνών προσκόλλησης και των γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs) από το ικρίωμα μπορεί να επιβραδύνει τη μετανάστευση κυττάρων στο ικρίωμα και τη βιοδραστικότητα του ίδιου του ικριώματος. Διαταραχή του δικτύου του κολλαγόνου μπορεί να αλλάξει τη μηχανική συμπεριφορά και την κινηματική των ινών κολλαγόνου του ικριώματος, η οποία μπορεί να έχει επίδραση στη φέρουσα ικανότητα του ικριώματος και να τροποποιήσει το μηχανικό περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται τα κύτταρα. Η αποικοδόμηση είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που

σχετίζεται με τη μηχανική συμπεριφορά και τη βιοδραστικότητα του ικριώματος που θα μπορούσε να επηρεαστεί από τις μεθόδους αποκυτταροποίησης. Οι χημικές επεξεργασίες θα μπορούσαν να θέσουν σε κίνδυνο την ECM του ικριώματος με τρόπο

ενζυματική αποικοδόμηση *in vivo*, και θα οδηγούσε σε ταχεία μείωση της δύναμης του ικριώματος. Όλες αυτές οι παράμετροι μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη και αναλύονται στη συνέχεια.

Είναι απίθανο να αφαιρεθεί το 100% όλων των κυτταρικών συστατικών από έναν ιστό ή ένα όργανο με οποιοδήποτε συνδυασμό μεθόδων. Ωστόσο, φαίνεται ότι οι μέθοδοι που απομακρύνουν το μεγαλύτερο μέρος ή το σύνολο του ορατού κυτταρικού υλικού δίνουν ως αποτέλεσμα ένα βιολογικό υλικό που είναι ασφαλές για εμφύτευση.

3.1 Περιγραφή των πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών μεθόδων αποκυτταροποίησης που περιγράφεται στη βιβλιογραφία, συμπεριλαμβανομένων των χημικών, βιολογικών και φυσικών επεξεργασιών (Crapo et al., 2011). Τα πιο ισχυρά και αποτελεσματικά πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό φυσικών, χημικών και ενζυμικών προσεγγίσεων.

Οι χημικοί παράγοντες περιλαμβάνουν διάφορα οξέα και βάσεις (π.χ. υπεροξικό οξύ), διαλύματα υψηλού ιοντικού άλατος τα οποία προκαλούν οσμωτικό σοκ στα κύτταρα (π.χ., υπερτονικός ορός), απορρυπαντικά (π.χ., δεοξυχολικό νάτριο, δωδεκυλοθειικό νάτριο και Triton X-100), αλκοόλες (π.χ., γλυκερόλη) και άλλους διαλύτες (π.χ., ακετόνη). Συνήθως λειτουργούν με την πρόκληση διαταραχής των κυτταρικών μεμβρανών και τη μετουσίωση πρωτεϊνών. Οι βιολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση ενζυματικών (π.χ., δεοξυριβονουκλεάσης, ριβονουκλεάσης και θρυψίνης) και μη ενζυματικών παραγόντων (π.χ., EDTA). Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν μεταβολές της θερμοκρασίας (π.χ., κατάψυξης-απόψυξης), μεταβολές της πίεσης και μηχανική ανάδευση του ιστού (ο τελευταίος είναι επίσης γνωστός ως "δυναμική" αποκυτταροποίηση).

Ένα πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης γενικά ξεκινά με λύση της κυτταρικής μεμβράνης χρησιμοποιώντας φυσικές μεθόδους ή ιοντικά διαλύματα, ακολουθούμενα από διαχωρισμό κυτταρικών συστατικών από την ECM χρησιμοποιώντας ενζυμικές επεξεργασίες, διαλυτοποίηση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών κυτταρικών συστατικών χρησιμοποιώντας

απορρυπαντικά, και τελικά την αφαίρεση των κυτταρικών θραυσμάτων από τον ιστό. Αυτά τα βήματα μπορούν να συνδυαστούν με μηχανική διέγερση για την αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους. Μετά την αποκυτταροποίηση, πρέπει να αφαιρεθούν όλα τα εναπομείναντα χημικά ώστε να αποφευχθεί μια αρνητική απάντηση ιστού ξενιστή στα υλικά αυτά. Η αποτελεσματικότητα της αποκυτταροποίησης και της διατήρησης της ECM μπορεί να αξιολογηθεί με διάφορες μεθόδους. Οι μηχανισμοί της φυσικής, ενζυματικής και χημικής αποκυτταροποίησης για μια ποικιλία ιστών εξετάζονται παρακάτω.

Το πιο αποτελεσματικό πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης για κάθε ιστό ή όργανο, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους του ιστού, τον τύπο και σύνθεση του ιστού, το είδος των δοτών, την ηλικία των δοτών, τους παράγοντες αποκυτταροποίησης που χρησιμοποιούνται, τη συγκέντρωση τους, τη διάρκεια της έκθεσης του ιστού σε αυτούς τους παράγοντες και τον τρόπο με τον οποίο χορηγούνται (π.χ. στατικό έναντι μηχανικής ανάδευσης έναντι αποκυτταροποίησης με έγχυση) (Crapo et al., 2011).

Ένας από τους κύριους περιορισμούς είναι η ευρύς ετερογένεια που παρατηρείται μεταξύ των διαφορετικών πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, καθιστώντας δύσκολο να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών μελετών. Για κάθε μελέτη ιστού, είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης ώστε να επιτευχθεί αποδεκτή απομάκρυνση κυττάρων.

Στις περισσότερες μελέτες μηχανικής αεραγωγών, χρησιμοποιείται η μέθοδος με τη χρήση απορρυπαντικού-ενζύμου που περιλαμβάνει ένα συνδυασμό από το δεσοξυχολικό νάτριο και τη δεσοξυριβονουκλεάση (Baiguera et al., 2011; Meezan et al., 1975). Η βιομηχανική δοκιμή του ικρίωματος μετά τη θεραπεία αποτελεί ένδειξη της παρουσίας και της ακεραιότητας των υπολοίπων δομικών πρωτεϊνών. Συνοπτικά οι μέθοδοι αποκυτταροποίησης είναι οι εξής:



Φυσικές μέθοδοι

Φυσικές μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διευκόλυνση της αποκυτταροποίησης των ιστών περιλαμβάνουν την κατάψυξη, την άμεση πίεση, ηχομόνωση και διέγερση. Η κατάψυξη “Snap” έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για αποκυτταροποίηση των τενόντων, των συνδετικών ιστών (Jackson et al., 1987; Jackson et al., 1991; Jackson et al., 1990; Jackson et al., 1988; Roberts et al., 1991) και των νευρικών ιστών (Gulati et al., 1988). Με την ταχεία κατάψυξη ενός ιστού, σχηματίζονται ενδοκυτταρικοί κρύσταλλοι πάγου που διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη και προκαλούν λύση κυττάρων. Ο ρυθμός αλλαγής της θερμοκρασίας πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου να διαταράξει την ECM. Ενώ η κατάψυξη μπορεί να είναι μια αποτελεσματική μέθοδος κυτταρικής λύσης, πρέπει να ακολουθηθεί από διαδικασίες για την απομάκρυνση του κυτταρικού υλικού από τον ιστό. Τα κύτταρα μπορούν να λυθούν με εφαρμογή άμεσης πίεσης στον ιστό, αλλά αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική μόνο για τους ιστούς ή τα όργανα που δεν χαρακτηρίζονται από πυκνά οργανωμένη ECM (π.χ., ήπαρ, πνεύμονα). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί μηχανική δύναμη για την αποκόλληση των στιβάδων ιστών από όργανα που χαρακτηρίζονται από φυσικά επίπεδα ανατομής όπως το έντερο και η ουροδόχος κύστη. Αυτές οι μέθοδοι είναι αποτελεσματικές και προκαλούν ελάχιστη αποδόμηση στην τρισδιάστατη αρχιτεκτονική της ECM μέσα σε αυτούς τους ιστούς.



Χημικές μέθοδοι

- **Αλκαλικές και όξινες θεραπείες**

Αλκαλικές και όξινες θεραπείες χρησιμοποιούνται σε πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης για τη διαλυτοποίηση του κυτταροπλασματικού συστατικού των κυττάρων καθώς και για την απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων όπως το RNA και DNA. Για παράδειγμα, οξικό οξύ, υπεροξικό οξύ (PAA), υδροχλωρικό οξύ, θειικό οξύ και υδροξείδιο του αμμωνίου (NH₄OH) μπορεί να διαταράξουν αποτελεσματικά τις κυτταρικές μεμβράνες και τα ενδοκυτταρικά οργανίδια (De Filippo et al., 2002; Falke et al., 2003; Probst et al., 1997; Yoo et al., 1998).

Ωστόσο, αυτές οι χημικές ουσίες απομακρύνουν επίσης σημαντικά μόρια όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) και το κολλαγόνο από ιστούς.

- **Μη ιονικά απορρυπαντικά**

Τα μη ιονικά απορρυπαντικά έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης λόγω των σχετικά ήπιων επιδράσεων στη δομή των ιστών. Μη ιονικά απορρυπαντικά διαταράσσουν τις αλληλεπιδράσεις λιπιδίων-λιπιδίων και λιπιδίων-πρωτεϊνών, αλλά αφήνουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης άθικτες έτσι ώστε οι πρωτεΐνες εντός ενός ιστού ή οργάνου μετά από μη ιοντική απορρυπαντική επεξεργασία να μπορούν να παραμένουν σε λειτουργική κατάσταση (Seddon et al., 2004)

Το Triton X-100 είναι το πιο ευρέως μελετημένο μη ιονικό απορρυπαντικό για πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης. Η έκθεση του ιστού στο Triton X-100 κυμαίνεται από αρκετές ώρες έως 14 ημέρες (Grauss et al., 2003). Αποκυτταροποίηση των ιστών με Triton X-100 έδειξε μικτά αποτελέσματα. Παρόλο που το Triton X-100 μπορεί να είναι αποτελεσματική μέθοδος αποκυτταροποίησης, η αποτελεσματικότητά του εξαρτάται από τον ιστό που αποκυτταροποιείται και οι άλλες μέθοδοι με τις οποίες συνδυάζεται σε ένα δεδομένο πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης.

- **Ιοντικά απορρυπαντικά**

Τα ιοντικά απορρυπαντικά είναι αποτελεσματικά για τη διαλυτοποίηση και των κυτταροπλασματικών και των πυρηνικών κυτταρικών μεμβρανών, αλλά τείνουν να μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες διαταράσσοντας τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Seddon et al., 2004) Τα πλέον χρησιμοποιούμενα ιονικά απορρυπαντικά είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) και δεοξυχολικό νάτριο και Triton X-200 (Ketchedjian et al., 2005).

Το SDS είναι πολύ αποτελεσματικό για την αφαίρεση κυτταρικών συστατικών από τον ιστό. Σε σύγκριση με άλλα απορρυπαντικά, το SDS προκαλεί πλήρη απομάκρυνση πυρηνικών υπολειμμάτων και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, όπως η βιμεντίνη (Woods et al., 2005). Το SDS τείνει να διαταράξει τη δομή του φυσικού ιστού και προκαλεί μείωση της

συγκέντρωσης των GAGs και μείωση της ακεραιότητας του κολλαγόνου. Ωστόσο, δεν φαίνεται ότι το SDS αφαιρεί το κολλαγόνο από τον ιστό. Το δεσοξυχολικό νάτριο είναι επίσης πολύ αποτελεσματικό για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων, αλλά τείνει να προκαλέσει μεγαλύτερη διαταραχή στην αρχική αρχιτεκτονική του ιστού σε σύγκριση με το SDS. Δεν υπάρχουν αναφορές για αποκυτταροποίηση ιστού με χρήση μόνο δεσοξυχολικού νατρίου, οπότε είναι δύσκολο να γνωρίζουμε την επίδραση του στην εναπομένουσα ECM ενός ιστού. Το δεσοξυχολικό νάτριο συνδυάζεται επίσης με αρκετά αμφολυτερονικά απορρυπαντικά για την αποκυτταροποίηση νευρικού ιστού, ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι μόνο ο συνδυασμός Triton X-200 με τα αμφοτερονικά απορρυπαντικά παρήγαγαν μια τελείως αποκυτταροποιημένη νευρική ECM (Hudson et al., 2004).

- **Διφασικά απορρυπαντικά**

Τα αμφοτερονικά απορρυπαντικά παρουσιάζουν τις ιδιότητες και των μη ιοντικών και των ιοντικών απορρυπαντικών. Τα διφασικά απορρυπαντικά έχουν μεγαλύτερη τάση να μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες σε σχέση με τα μη ιοντικά απορρυπαντικά. Παραδείγματα αμφοτερονικών απορρυπαντικών περιλαμβάνουν 3 - [(3-χολαμιδοπροπυλ) διμεθυλαμμωνιο] -1-προπανοσουλφονικό (CHAPS), για το οποίο έχει μελετηθεί η αποκυτταροποίηση των αιμοφόρων αγγείων και τη σουλφοβεταΐνη-10 (SB-10) και -16 (SB-16), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αποκυτταροποίηση των νεύρων (Hudson et al., 2004). Επεξεργασμένη αρτηρία με CHAPS έχει σαν αποτέλεσμα, ιστολογικά, φυσιολογική μορφολογία κολλαγόνου και ελαστίνης καθώς και η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο φαίνεται ότι παραμένει παρόμοια με αυτή της εγγενούς αρτηρίας. Η θεραπεία με CHAPS οδηγεί σε σημαντική μείωση της πίεσης διάρρηξης και μέγιστη πίεση του αρτηριακού ιστού, αλλά η μείωση είναι συγκρίσιμη με την πίεση διάρρηξης των αρτηριών που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με Triton X-100 και υποτονική / υπερτονική λύση (Dahl et al., 2003).

- **Τρι (n-βουτυλο) φωσφορικό (Tri (n-butyl) phosphate)**

Το φωσφορικό τρι (n-βουτυλο) (TBP) είναι ένας οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται για να απενεργοποιήσει τους ιούς στο αίμα χωρίς να επηρεάζει τη δραστηριότητα του παράγοντα πήξης. Το TBP φαίνεται να είναι ένας πολλά υποσχόμενος χαιτροπικός παράγοντας για την αποκυτταροποίηση που έχει ελάχιστη επίδραση στο μηχανική συμπεριφορά της ECM και αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω (Woods et al., 2005).

- **Υποτονικές και υπερτονικές θεραπείες**

Οσμωτικό σοκ με υποτονικό ή υπερτονικό διάλυμα όπως το απιονισμένο νερό ή το διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος χρησιμοποιείται για να λύσει τα κύτταρα μέσα στους ιστούς και τα όργανα (Goissis et al., 2000; Martins-Green et al., 1995; Vyavahare et al., 1997). Μια θεραπεία σε ένα υποτονικό διάλυμα (10 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA) για 11 ώρες που ακολουθείται από μια επεξεργασία 11 ωρών σε ένα υπερτονικό διάλυμα (50 mM Trizma HCl, 1 M NaCl, 10 mM EDTA) μπορεί να προκαλέσει λύση κυττάρων, αλλά γενικά δεν απομακρύνει τα προκύπτοντα κυτταρικά υπολείμματα από τον ιστό (Dahl et al., 2003). Πρόσθετες ενζυματικές ή χημικές επεξεργασίες είναι τυπικά απαραίτητες για τη διευκόλυνση της απομάκρυνσης κυτταρικών υπολειμμάτων. Η απομάκρυνση των υπολειμμάτων DNA από τον ιστό μπορεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω της "κολλώδους" φύσης του DNA και την τάση του να προσκολλάται στις πρωτεΐνες της ECM.

- **Χηλικοί παράγοντες**

Οι χηλικοί παράγοντες, όπως το EDTA και EGTA, σχηματίζουν ένα δακτυλιοειδές μοριακό σύμπλεγμα που δεσμεύεται σταθερά και απομονώνει ένα κεντρικό μεταλλικό ιόν. Έχει αποδειχθεί ότι τα δισθενή κατιόντα, όπως τα Ca^{2+} και Mg^{2+} , είναι απαραίτητα για την κυτταρική σύνδεση με κολλαγόνο και φμπρονεκτίνη στον υποδοχέα Arg- Gly-Asp (Klebe et al., 1974; Klebe et al., 1975; Gailit et al., 1988; Moore et al., 1994). Συνδέοντας τα δισθενή κατιόντα που υπάρχουν στις κυτταρικές συγκολλήσεις στην ECM, αυτές, διευκολύνουν

την απομάκρυνση του κυτταρικού υλικού από τον ιστό. Το EDTA τυπικά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με θρυψίνη.



Ενζυματικές μέθοδοι

Οι ενζυματικές τεχνικές αποκυτταροποίησης περιλαμβάνουν τη χρήση της πέψης πρωτεάσης, παράγοντες χηλικοποίησης ασβεστίου, και νουκλεασών (Gamba et al., 2002; McFetridge et al., 2004; Teebken et al., 2000). Η θρυψίνη είναι ένα από τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα πρωτεολυτικά ένζυμα σε πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης. Η αποτελεσματικότητα των ενζυματικών επεξεργασιών για απομάκρυνση ή διαχωρισμό του κυτταρικού υλικού από την ECM μελετήθηκε σε διάφορους ιστούς (Grauss et al., 2005).

Οι ενζυματικές μέθοδοι αποκυτταροποίησης φέρουν και δυσμενή επίδραση στα εξωκυτταρικά συστατικά των ιστών και των οργάνων. Παρατεταμένη έκθεση σε θρυψίνη/EDTA μειώνει σε μεγάλο βαθμό την περιεκτικότητα σε ελαστίνη και GAGs με την πάροδο του χρόνου, με τις θεικές GAGs (θεική χονδροϊτίνη, θεική κερατάνη και θεική δερματάνη) να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη μείωση. Τέτοιες θεραπείες μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της αντοχής σε εφελκυσμό του ιστού έως 50%. Η υπόλοιπη ECM μετά από ένα ενζυματικό πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης εξακολουθεί να υποστηρίζει την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* παρά την απομάκρυνση των συστατικών της ECM (Schenke-Layland et al., 2003). Είναι επιθυμητό να περιοριστεί η διάρκεια της έκθεσης σε θρυψίνη/EDTA για την ελαχιστοποίηση των διαταραχών πάνω στην υπερδομή και τη σύνθεση της ECM.

3.2 Επίδρασεις της αποκυτταροποίησης στον ιστό και αποτελεσματικότητα

Η αποτελεσματικότητα μιας δεδομένης μεθόδου αποκυτταροποίησης ή το πρωτόκολλο εξαρτάται από τον ιστό που μας ενδιαφέρει. Είναι πιθανό ότι οι μικρές αλλαγές στην εφαρμογή των πρωτοκόλλων έχουν επίδραση στην αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης κυτταρικού υλικού που δεν είναι εξ ολοκλήρου σαφής όπως η εφαρμογή τρισδιάστατης ανάδευσης από τους Schenke-Layland και συνεργάτες (Schenke-Layland et al., 2003). Η

αποτελεσματικότητα της αποκυτταροποίησης και οι μεταβολές στην ECM ποικίλλουν ανάλογα με την πηγή του ιστού, τη σύνθεση του ιστού, την πυκνότητα των ιστών και άλλους παράγοντες (Cartmell et al., 2000; Woods et al., 2005). Για κάθε ιστό που μελετάται, θα είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης για την επίτευξη αποδεκτής απομάκρυνσης κυττάρων.

3.3 Επαλήθευση της αφαίρεσης κυττάρων

Υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της απομάκρυνσης του κυτταρικού υλικού από ιστούς. Τυπική ιστολογική χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως πρώτη γραμμή επιθεώρησης για τον προσδιορισμό εάν μπορούν να παρατηρηθούν πυρηνικές δομές. Ιστολογικές χρώσεις όπως Masson's Trichome, Movat's Pentachrome, ή Safranin O μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξέταση ιστών για την παρουσία διαφόρων κυτταροπλασματικών και εξωκυτταρικών μορίων. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι για συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως η ακτίνη και η βιμεντίνη (Woods et al., 2005). Για την παρουσία του DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί η χρώση του δείγματος με DAPI ή Hoechst, τα οποία είναι και τα δύο φθορίζοντα μόρια που δεσμεύονται με τα συσσωματώματα αδενίνης-θυμίνης (AT) στη μικρή εγκοπή του DNA (Kakkar et al., 2005; Kapuscinski et al., 1978; Latt et al., 1975; Quintana et al., 1991). Επιπλέον, μέθοδοι με ιωδιούχο προπίδιο και PicoGreen έχουν αναπτυχθεί για να παρέχουν ποσοτικά στοιχεία σχετικά με την παρουσία DNA σε ένα δείγμα (Kral et al., 2005). Οι τεχνικές ανίχνευσης DNA έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της πορείας του DNA από αλλομοσχεύματα μετά από μεταμόσχευση και για τον προσδιορισμό υπάρχουσας ποσότητας οποιοδήποτε DNA στον αποκυτταροποιημένο ιστό (Jackson et al., 2002). Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή ηλεκτρονική μικροσκοπική μέθοδος μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται για να εξεταστεί η ύπαρξη υπολειμμάτων πυρηνικού υλικού ή κυτταροπλασματικών υπολειμμάτων αλλά συνήθως χρησιμοποιούνται σπάνια λόγω της τεχνικής πολυπλοκότητας και των δαπανών αυτών των διαδικασιών για εργασίες ρουτίνας. Επιπλέον, για να καθορίσει τι έχει αφαιρεθεί, είναι επίσης απαραίτητο

να επιβεβαιωθεί ότι τα επιθυμητά συστατικά της ECM διατηρούνται, όπως οι πρωτεΐνες προσκόλλησης ινωδονεκτίνη και λαμινίνη, GAGs, αυξητικοί παράγοντες, ελαστικές ίνες και κολλαγόνο που είναι απαραίτητα για την εγκαθίδρυση της μήτρας από τα κύτταρα της επιλογής *in vitro* ή *in vivo*. Ο μηχανικός έλεγχος της ECM μετά τη θεραπεία παρέχει την κατανόηση της παρουσίας και της ακεραιότητας των δομικών πρωτεϊνών μέσα στο ικρίωμα. Αν και οι παραπάνω μέθοδοι παρέχουν σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα των μεθόδων αποκυτταροποίησης, οι βιολογικές συνέπειες των μικρών ποσοστών πυρηνικού υλικού ή κυτταροπλασματικών υπολειμμάτων εντός του ικριώματος είναι ασαφείς. Δεν υπάρχουν αναφορές που δείχνουν μια άμεση σχέση μεταξύ αυτών των κυτταρικών υπολειμμάτων και της αρνητικής αντίδρασης του ξενιστή μέχρι σήμερα.

3.4 Επίδραση των χημικών ουσιών της αποκυτταροποίησης στους ιστούς

Οι μέθοδοι αποκυτταροποίησης που περιγράφηκαν παραπάνω περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών ουσιών, οι οποίες χρησιμοποιούνται λόγω της ικανότητας τους να μη βλάπτουν τα κύτταρα. Εάν παραμείνουν τα χημικά εντός του ιστού σε υψηλές συγκεντρώσεις μετά την αποκυτταροποίηση, τότε είναι πιθανό ότι θα είναι τοξικά για τα κύτταρα του ξενιστή όταν το ικρίωμα εμφυτεύεται *in vivo*. Υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης δοκιμασιών για την ποσοτικοποίηση της παρουσίας υπολειμματικών χημικών ουσιών στο αποκυτταροποιημένο ικρίωμα. Ομοίως, ορισμένες από τις διαδικασίες που έχουν περιγραφεί παραπάνω περιλαμβάνουν ένζυμα που προέρχονται συνήθως από πηγές βοοειδών (δηλ., DNάση, RNάση, θρυψίνη). Αυτά τα ένζυμα μπορούν δυνητικά να προκαλούν μια ανεπιθύμητη ανοσοαπόκριση από τον ξενιστή.

4. Κλινική μεταμόσχευση τραχείας και ιστομηχανική

Σήμερα, περισσότερες από δώδεκα κλινικές μεταμοσχεύσεις τραχείας έχουν πραγματοποιηθεί (Vogel et al., 2013). Ωστόσο, δεν απέκτησαν όλοι οι

ασθενείς που έλαβαν το μόσχευμα, κανονική ζωή, και ορισμένοι λήπτες πέθαναν λόγω νόσου που δεν σχετίζεται με τη μεταμόσχευση.

Το 2008, οι Macchiarelli και συνεργάτες ανέφεραν την πρώτη κλινική μεταμόσχευση ιστό-μηχανικής τραχείας παγκοσμίως σε μια γυναίκα ηλικίας 30 ετών (Macchiarelli et al., 2008). Η μεταμοσχευμένη τραχεία κατασκευάστηκε από αποκυτταροποιημένη ανθρώπινη τραχεία που είχε εμβολιασθεί με βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα του δέκτη και χονδροκύτταρα προερχόμενα από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, ακολουθούμενα από καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα για 96 ώρες. Η ανθρώπινη τραχεία αποκυτταροποιήθηκε μέσω της χημικής-ενζυματικής μεθόδου. Σε παρακολούθηση 4 μηνών, ο λήπτης δεν έδειξε σημάδια απόρριψης και είχε σημαντικά βελτιωμένη ποιότητα ζωής χωρίς την ανάγκη για ανοσοκαταστολή. Μια 5ετής παρακολούθηση διεξήχθη για να διερευνηθεί η μακροπρόθεσμη σταθερότητα του μοσχεύματος. Διαπιστώθηκε ότι ο λήπτης είχε αναπτύξει μια επαναλαμβανόμενη ουλώδη στένωση στον φυσικό ιστό κοντά στο σημείο αναστόμωσης της μεταμοσχευμένης ιστομηχανικής τραχείας (Gonfioti et al., 2014). Ωστόσο, αυτό δεν εμπόδισε τον ασθενή από την κανονική καθημερινή ζωή. Λειτουργικές δοκιμές έδειξαν ότι ο ασθενής είχε επανακτήσει κανονική πνευμονική λειτουργία και εκτοπιστική δύναμη. Αυτό το αποτέλεσμα σημαίνει ότι τα αυτόλογα κύτταρα σε συνδυασμό με την αποκυτταροποιημένη αλλογενή τραχεία μπορεί να παρέχουν, στο μέλλον, μια επιτυχημένη λειτουργική λύση για μεταμόσχευση τραχείας. Ωστόσο, αυτή η τεχνική εξακολουθεί να αντιμετωπίζει αρκετές αδυναμίες, συμπεριλαμβανομένης της περιορισμένης προσφοράς αλλογενών τραχειών και του μεγάλου χρόνου της διαδικασίας αποκυτταροποίησης, που πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν αρχίσει να χρησιμοποιείται σε συνήθη κλινική πρακτική.

Το 2012, οι Elliott και συνεργάτες ανέφεραν μια διετή παρακολούθηση σε ένα 10χρονο αγόρι που του μεταμοσχεύθηκε τεχνητή τραχεία (Elliott et al., 2012). Η αποκυτταροποιημένη τραχεία του δότη ήταν εμβολιασμένη με αυτόλογα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονταν από μυελό των οστών και από επιθηλιακά επιθέματα. Επιπλέον, ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη, ο διεγερτικός παράγοντας κοκκιοκυτταρικής αποικίας και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β προστέθηκαν για να ενισχύσουν την αγγειογένεση, τη στρατολόγηση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων και τη χονδρογένεση, αντίστοιχα. Στοιχεία για σχηματισμό αγγείων παρατηρήθηκαν

μία εβδομάδα μετά την επέμβαση και ισχυρή απόκριση ουδετερόφιλων εντοπίστηκε στις πρώτες οκτώ εβδομάδες. Επανεπιθηλιοποίηση, κροσσωτά αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα και αποκατάσταση της μηχανικής αντοχής παρατηρήθηκαν μόνο 12, 15 και 18 μήνες, αντίστοιχα, μετά από χειρουργική επέμβαση. Στη συνέχεια, ο λήπτης ανέκτησε κανονικό πνεύμονα και έζησε μια κανονική ζωή όπως αναφέρεται στην τετραετή παρακολούθηση (Hamilton et al., 2015). Η μοναδική σημαντική παρέμβαση πραγματοποιήθηκε στα τέλη του 2013, όταν ο λήπτης υπέστη λοίμωξη και στένωση εντός των στεντ της τραχείας και του μη μεταμοσχευμένου αριστερού κύριου βρόγχου. Παρόλο που αυτή η πρώτη παιδιατρική μεταμόσχευση μηχανικής τραχείας έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη καλύτερων ιστομηχανικών τραχειών με χαμηλότερο κόστος.

Οι Berg και συνεργάτες ανέφεραν τη μεταμόσχευση αποκυτταροποιημένης τραχείας που προέρχεται από πτωματικό δότη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αποκυτταροποίησης με χημική-ενζυματική σε έναν ασθενή ηλικίας 76 ετών (Berg et al., 2013). Το ικρίωμα ιστού που κατασκευάστηκε εμβολιάστηκε με αυτόλογα επιθηλιακά κύτταρα βλεννογόνου και χονδρογονικά που προήλθαν από διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα μυελού των οστών. Τα επιθηλιακά κύτταρα και τα χονδρογονικά διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μυελού των οστών ήταν εμβολιασμένα ομοιογενώς στην εσωτερική και την εξωτερική επιφάνεια του μοσχεύματος, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας έναν περιστρεφόμενο βιοαντιδραστήρα. Το μεταμοσχευμένο μόσχευμα παρείχε έναν ανοικτό αεραγωγό στον ασθενή αλλά μολύνθηκε με μύκητες μετά από μια εβδομάδα. Δυστυχώς, ο ασθενής υπέστη καρδιακή ανακοπή και πέθανε 23 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση. Το μεταμοσχευμένο μόσχευμα συλλέχθηκε για ιστολογική ανάλυση και διαπιστώθηκε ότι ήταν μερικώς καλυμμένο με πλακώδες επιθήλιο χωρίς βλεφαρίδες και εμφάνισαν σημάδια σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων. Θετικά κύτταρα για ακτίνη-α λείου μυός, υδαρείς αδένες και νευρικές ίνες ανιχνεύθηκαν στον υποβλεννογόνο και παρατηρήθηκαν χονδροκύτταρα στον χόνδρο.

Οι Jungebluth και συνεργάτες ανέφεραν μεταμόσχευση μηχανικών ιστών τραχειοβρογχικού μοσχεύματος από βιοτεχνητό νανοσύνθετο (πολυεδρικό ολιγομερές πολύοργανο πολυ (ανθρακική-ουρία) ουρεθάνη) (POSS-PCU)

εμβολιασμένο με αυτόλογα μονοπύρηννα κύτταρα μυελού των οστών (Jungebluth et al., 2011). Το POSS-PCU έχει εξαιρετικές ιδιότητες, καθώς είναι βιοσυμβατό, μη βιοαποδομήσιμο, ήπια ανοσογόνο, μηχανικά ισχυρό, εύκολα εύκαμπτο και μη τοξικό, καθιστώντας το κατάλληλο για εφαρμογές μηχανικής ιστών (Ferhatnia et al., 2013). Το κατασκεύασμα επώαστηκε σε βιοαντιδραστήρα για 36 ώρες και συμπληρώθηκε με αποικία κοκκιοκυττάρων. Σε σύγκριση με το αποκυτταροποιημένο ικρίωμα, ένα τεχνητό ικρίωμα είναι εύκολο να προσαρμοστεί για να ικανοποιήσει τη ζήτηση των ασθενών και είναι εύκολα διαθέσιμο με μικρότερο χρόνο προετοιμασίας. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι ο λήπτης υπέστη βακτηριακές και μυκητιασικές λοιμώξεις την πρώτη εβδομάδα μετά τη μεταμόσχευση. Η επανεπιθηλίωση και η νεοαγγείωση ανιχνεύθηκαν σε βιοψία που ελήφθη μετά από δύο μήνες. Μετά από πέντε μήνες, ο λήπτης ζούσε κανονικά με μια σχεδόν κανονική αναπνευστική οδό και καλύτερη πνευμονική λειτουργία. Ο κύριος επιστήμονας αυτής της μελέτης, ο Paolo Macchiarini, κατηγορήθηκε για επιστημονικό παράπτωμα, αλλά απαλλάχτηκε από τον ισχυρισμό του Ινστιτούτου Karolinska το 2015. Ωστόσο, η εξωτερική έρευνα που διεξήχθη για τις τρεις επεμβάσεις τεχνητής τραχείας που πραγματοποιήθηκαν από τον Paolo Macchiarini στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Karolinska μεταξύ 2011 και 2012 έδειξε ότι ήταν ένοχος για επιστημονικό παράπτωμα (The Macchiarini Case, 2016). Συνολικά, ο Macchiarini έχει πραγματοποιήσει 9 περιπτώσεις μεταμόσχευσης συνθετικής τραχείας από το 2011 έως το 2014. Επτά από τους εννέα ασθενείς που έλαβαν το τραχειακό μόσχευμα έχουν πεθάνει.

5. Ανασκόπηση ανακατασκευής τραχείας σε μεγάλα ζωικά μοντέλα

Η ανακατασκευή τμηματικών τραχειακών ελαττωμάτων παραμένει δύσκολη λόγω της κακής δημιουργίας συνθετικών υλικών, έλλειψης δοτών αυτογενών ιστών και άλυτων ζητημάτων με την αλλομεταμόσχευση (Ott et al., 2011). Τις τελευταίες 2 δεκαετίες, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για την αναζήτηση της βέλτιστης ιστομηχανικής τραχείας. Πολλές μελέτες σε ζώα έχουν επικεντρωθεί στην ανακατασκευή μικρών ελαττωματικών τμημάτων στα τρωκτικά (Ott et al., 2011). Περαιτέρω τεχνικές βελτιώσεις με επακόλουθες

δοκιμές σε μεγάλα ζώα απαιτούνται πριν αυτές οι μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές μελέτες.

Ζωικά μοντέλα έχουν συμβάλει στην μελέτη για ασθένειες των αεραγωγών και είναι απαραίτητες για τη μεταφραστική έρευνα. Τα μοντέλα τρωκτικών έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε τραχειακές μελέτες για τη βελτίωση της κατανόησης των βασικών εννοιών και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Σε αντίθεση, η μελέτη στα μεγάλα ζώα έγκειται στην επικύρωση της πρακτικότητας και της κλινικής εφαρμογής των υποκατάστατων τραχείας. Σε σύγκριση με τα ζωικά πρότυπα μικρότερου μεγέθους, η δομή των αεραγωγών σε μεγαλύτερα θηλαστικά όπως ο σκύλος, ο χοίρος, τα πρόβατα είναι περισσότερο παρόμοια με αυτή των ανθρώπων από άποψη μεγέθους, μορφολογίας και φυσιολογίας (Ten Hallers et al., 2004; Scheerlinck et al., 2008). Αποτελούν το καλύτερο πεδίο δοκιμών για να διασφαλιστεί ότι οι μεταγενέστερες μελέτες στον άνθρωπο γίνονται ηθικά. Αν και τα πειράματα σε ζώα μπορεί να είναι κακοί προγνωστικοί δείκτες της ανθρώπινης αντίδρασης σε μια προτεινόμενη θεραπεία (Bracken al., 2009), περιστατικά όπως το σκάνδαλο στο Ινστιτούτο Καρολίνσκα δίνουν έμφαση στη σημασία των δοκιμών αποτελεσματικότητας σε μεγάλα ζωικά μοντέλα πριν από την έναρξη οποιασδήποτε κλινικής δοκιμής (Macchiarelli et al., 2016). Όλες οι ερευνητικές μελέτες σε ανθρώπους θα πρέπει να υποβάλλονται προς έγκριση από τα ρυθμιστικά συμβούλια όπως το Θεσμικό Συμβούλιο Αναθεώρησης (Institutional Review Board) για την προστασία των συμφερόντων της μελέτης, και να διατηρούν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής έτσι ώστε οι μελλοντικοί ασθενείς μπορούν να υποβληθούν σε βέλτιστη θεραπεία.

Αρκετές προσεγγίσεις στην τραχειακή ανακατασκευή έχουν ήδη πραγματοποιηθεί στην κλινική πρακτική οι οποίες συνοψίζονται σε πολλές αναφορές (Ch'ng et al., 2014; Rich et al., 2012.). Επιτυχημένες αναφορές ανακατασκευής μεγάλων ελαττωμάτων περιλαμβάνουν κυρίως αναφορές περιστατικών και περιπτώσεων με περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα. Περαιτέρω προκλινικές μελέτες απαιτούνται για τη βελτίωση πολλών τεχνικών και τη διερεύνηση στρατηγικών θεραπείας που μπορούν να εφαρμοστούν ευρέως στο κλινικό περιβάλλον (Goh et al., 2018).

Παρά τις δεκαετίες έρευνας και τις πολλές προσπάθειες, μια ασφαλής, πρακτική και ανθεκτική αντικατάσταση για μεγάλα τραχειακά ελαττώματα δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα. Ελαττώματα μεγάλου τμήματος ορίζονται εκείνα που έχουν μέγεθος 4,5 cm ή μεγαλύτερα καθώς ελαττώματα που υπερβαίνουν αυτό το μήκος απαιτούσαν επιπλέον κινητοποίηση των γύρω ιστών για να επιτευχθεί αναστόμωση από «άκρο σε άκρο» μέσα ασφαλή όρια στους ανθρώπους (Grillo et al., 1973). Οι τρεις ελάχιστες απαιτήσεις για την επιτυχία είναι άκαμπτη υποστήριξη, επιθηλιακή επένδυση και η σωστή αγγείωση (Rich et al., 2012). Η διαδικασία κατασκευής θα πρέπει να είναι απλή και τα αποτελέσματα είναι προβλέψιμα επιτυχημένα ώστε να ενεργοποιηθεί η πρακτική χρήση σε κλινικό περιβάλλον. Άλλοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη περιλαμβάνουν τον επείγοντα χαρακτήρα της ανακατασκευής, την πιθανότητα απαίτησης επικουρικής ακτινοθεραπείας και τη διαθεσιμότητα εργαλείων μηχανικής ιστών, και εάν ή όχι η ανοσοκαταστολή μπορεί να χορηγηθεί με ασφάλεια (Rich et al., 2012). Αυτά είναι σχετικά σημαντικά ζητήματα στην περίπτωση που πρόκειται για ασθενή με καρκίνο.

Επί του παρόντος, δεν υπάρχει διαθέσιμο μεγάλο ζωικό μοντέλο για την ανίχνευση στρατηγικών αντικατάστασης της τραχείας για κλινικές εφαρμογές. (Swindle et al., 2012). Επομένως, δεν υπάρχουν μελέτες που να αναφέρουν την άμεση σύγκριση της δομής και της λειτουργίας των αεραγωγών μεταξύ των μεγάλων ζωικών προτύπων.

6. Προβλήματα προς αντιμετώπιση-Μελλοντικές προοπτικές

Παρόλο που αρκετές ερευνητικές ομάδες ανέφεραν ότι οι ασθενείς με κλινικά μεταμοσχευμένη ιστομηχανική τραχεία ανέκτησαν επιτυχώς ανατομική δομή και φυσιολογική λειτουργία, εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένα εμπόδια που πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν αυτή η τεχνική χρησιμοποιηθεί συστηματικά σε κλινικό περιβάλλον. Το περιστατικό του Macchiarini έδειξε ότι η κλινική χρήση συνθετικής ιστομηχανικής τραχείας δεν είναι ακόμη εφικτή. Πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες προκλινικές μελέτες σε ζώα προκειμένου να αυξηθεί η κατανόηση της πορείας των μεταμοσχευμένων

ικριωμάτων και κυττάρων για την επιβεβαίωση της ασφάλειας, της αποτελεσματικότητας και αναπαραγωγιμότητας πριν από κλινικές εφαρμογές.

Ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια στην μηχανική ιστών της τραχείας είναι η καθυστέρηση στην αγγείωση που θέτει σε κίνδυνο την επιβίωση των μεταμοσχευμένων ζωντανών κυττάρων. Ο μεταμοσχευμένος ιστός βασίζεται στα αιμοφόρα αγγεία για την παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, καθώς η διάχυση είναι ανεπαρκής στην ικανοποίηση των αναγκών των κυττάρων. Τα αιμοφόρα αγγεία διεισδύουν στα μεταμοσχευμένα τραχειακά μοσχεύματα από τις ανώτερες και κατώτερες αναστομώσεις, και αυτή η διαδικασία διαρκεί μήνες για να φτάσει στο μέσο ενός, μεγάλου σε μήκος, τραχειακού μοσχεύματος, με αποτέλεσμα να υπάρχουν νεκρωτικές μεταβολές στο μεσαίο τμήμα του μοσχεύματος. Η νέκρωση του ιστού οδηγεί σε φλεγμονώδη απόκριση και στένωση. Αν και μερικές προσεγγίσεις έχουν προταθεί και δοκιμαστεί για την προώθηση της αγγείωσης, καμία από αυτές τις τεχνικές δεν έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Επί του παρόντος, το αποκυτταροποιημένο τραχειακό μόσχευμα φαίνεται να είναι ένα ιδανικό ικρίωμα ιστομηχανικής τραχείας καθώς η σύνθεση της μήτρας και η μικροδομή της είναι ίδιες με αυτή του φυσικού ιστού. Επιπλέον, με σωστή επεξεργασία, το μόσχευμα διατηρεί τους βιολογικούς παράγοντες που βοηθούν στην διατήρηση της κυτταρικής λειτουργικότητας και του σχηματισμού ιστού *in vivo*. Η πλήρης αποκυτταροποίηση μειώνει τον κίνδυνο ανοσολογικής απόρριψης και προάγει την επανακυτταροποίηση του ικρίωματος από κύτταρα του ξενιστή. Εντούτοις, η χρήση των αποκυτταροποιημένων τραχειακών μοσχευμάτων περιορίζεται από ανεπαρκείς αριθμούς δοτών. Επιπλέον, υπάρχει η ανάγκη να αναπτυχθούν περισσότερες αποτελεσματικές τεχνικές αποκυτταροποίησης για τη μείωση του χρόνου επεξεργασίας, διατηρώντας παράλληλα όλα τα βιολογικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την αναγέννηση.

Ένα άλλο ζήτημα με τη χρήση της μηχανικής ιστού τραχείας είναι οι επιπλοκές που προκύπτουν εξαιτίας της ανωριμότητας του μεταμοσχευμένου μοσχεύματος. Για παράδειγμα, η έλλειψη ενός κροσσωτού επιθηλίου συχνά οδηγεί σε απόφραξη του αεραγωγού και μόλυνση λόγω της συσσώρευση βλέννας. Αν και αυτές οι επιπλοκές δεν είναι θανατηφόρες και μπορούν να διορθωθούν με κλινική παρέμβαση, θα ήταν επιθυμητό το μεταμοσχευμένο

μόσχευμα να είναι αρκετά ώριμο ώστε να αποτρέπει την εμφάνιση αυτών των επιπλοκών. Για την επίτευξη ωρίμανσης ιστού *in vitro* πριν από τη μεταμόσχευση, η χρήση βιοαντιδραστήρων είναι πιθανώς η καλύτερη επιλογή μέχρι στιγμής.

Ένα από τα αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την ιστομηχανική τραχεία είναι η ανάπτυξη (διάμετρος και μήκος) του μοσχεύματος κατά τη μεταμόσχευση, ιδιαίτερα για τους παιδιατρικούς ασθενείς. Η ανάπτυξη της μεταμοσχευμένης τραχείας είναι κρίσιμη καθώς το ύψος των παιδιατρικών ασθενών θα αυξηθεί όσο μεγαλώνουν. Η αποτυχία του μοσχεύματος να αναπτυχθεί, μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη των ασθενών. Στο χειρότερο σενάριο, το μόσχευμα μπορεί να αποτύχει καθώς δεν μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις των αναπτυσσόμενων ασθενών. Έτσι, πρέπει να γίνει μια λεπτομερής μελέτη για να προσδιοριστεί η ανάπτυξη της μεταμοσχευμένης τραχείας. Αν και τα αποτελέσματα από τους Hamilton και συνεργάτες έδειξαν αύξηση στη διάμετρο και στα δύο άκρα του μοσχεύματος, ωστόσο, η αύξηση μπορεί να οφείλεται σε τέντωμα.

Αν και πολλά υποσχόμενα τραχειακά μοσχεύματα έχουν σχεδιαστεί και δοκιμαστεί, αυτό παραμένει μια μεγάλη πρόκληση για τη συνεπή παραγωγή των μοσχευμάτων κάτω από πρακτικές καλής παρασκευής. Επιπλέον, η ποιότητα των κατασκευασμένων μοσχευμάτων ποικίλλει. Επίσης, υπάρχουν πρόσθετες προκλήσεις όσον αφορά την αποθήκευση και τη χορήγηση του μοσχεύματος. Στην ιδανική περίπτωση, το μόσχευμα πρέπει να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής (Hamilton et al., 2015). Προκειμένου να κατασκευαστεί μια πλήρως λειτουργική ιστομηχανική τραχεία, υπάρχουν ακόμα πολλά εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν, ιδιαίτερα όσον αφορά την αγγειοποίηση του μοσχεύματος και τη λειτουργικότητα του ιστού *in vivo*. Η εισαγωγή πιο εξελιγμένων βιοαντιδραστήρων μπορεί να βοηθήσει στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού βλαστικών κυττάρων, τον σχηματισμό ιστού και την ωρίμανση *in vitro*, η οποία θα μπορούσε να αυξήσει σημαντικά την πιθανότητα κλινικής επιτυχίας. Ωστόσο, κανένας από τους διαθέσιμους βιοαντιδραστήρες που υπάρχουν σήμερα δε μπορεί να επιτύχει αυτόν τον στόχο.

7. Σκοπός της μελέτης

Η αντικατάσταση της τραχείας συχνά δεν είναι μια διαδικασία σωτηρίας, αλλά μπορεί να μειώσει τη νοσηρότητα και την ταλαιπωρία των ασθενών. Μεταξύ όλων των μεθόδων, η μηχανική ιστών εξακολουθεί να είναι η μέθοδος επιλογής λόγω του γεγονότος ότι τα μοσχεύματα μπορούν να κατασκευαστούν μαζικά, με ένα σχετικά χαμηλό κόστος, σε λιγότερο χρόνο και χωρίς ανάγκη για δεύτερη χειρουργική επέμβαση στον δότη.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η παραγωγή ικρίωματος τραχείας για την αντιμετώπιση σοβαρών παθήσεων της αναπνευστικής οδού χωρίς τη χρήση βιοαντιδραστήρα. Με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας θέλουμε να επιτευχθεί η δημιουργία ενός κυτταρικού, ιστομηχανικού αεραγωγού ο οποίος να μπορεί να έχει τη δομή και τη λειτουργία του εγγενούς ιστού χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος ανοσολογικής απόκρισης. Αυτή η έρευνα έχει ως σκοπό να αξιολογήσει το αποκυτταροποιημένο ικρίωμα και να μελετήσει αν ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαντιδραστήρας για να αποκατασταθεί η δομή και η λειτουργία του ιστού ώστε στο μέλλον να υπάρχουν επιτυχείς λειτουργικές λύσεις για σοβαρές κλινικές διαταραχές της αναπνευστικής οδού. Η παρούσα μελέτη θα παρουσιάσει νέα στοιχεία στις μεταμοσχεύσεις οργάνων ώστε μελλοντικά ένα τραχειακό εμφύτευμα να μπορεί να αποκαταστήσει τη δομή και τη λειτουργία του ιστού που αντικαθίσταται.

ΕΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.Υλικά και Μέθοδοι

8.1. Συλλογή βιολογικού υλικού και ασφάλεια δείγματος

➤ **Τραχείες:** Οι τραχείες απομονώθηκαν από επίμυες στο εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Οι διαδικασίες διαχείρισης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε θαλάμους νηματικής ροής κλάσης A (AirFlow – Hood).

➤ **Αποστείρωση εργαλείων και διαλυμάτων**

Χειρουργικά εργαλεία:

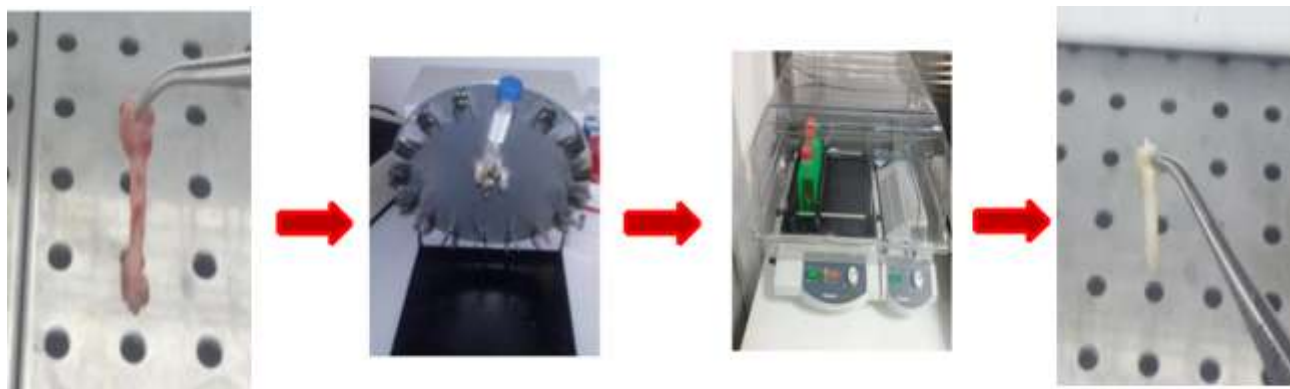
- Τοποθέτηση σε διάλυμα Endostar 2% για 30 λεπτά
- Πλύσιμο με απεσταγμένο νερό (dH₂O).
- Τοποθέτηση σε μεταλλικές κασετίνες.
- Αποστείρωση στους 134⁰C για 15 λεπτά μέσα σε κλίβανο (Hydra Electronic, model: TECNO-GAZ S.p.a.).

Διαλύματα: Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με φιλτράρισμα σε φίλτρα διήθησης 0,2μm ή 0,45μm μιας χρήσεως (CORNING).

8.2. Αποκυτταροποίηση της τραχείας

Οι μέθοδοι αποκυτταροποίησης που έχουν αναπτυχθεί περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό φυσικών, χημικών και ενζυματικών δράσεων (Gilbert et al. 2006). Η επιλογή της μεθόδου αποκυτταροποίησης εξαρτάται από τον ιστό που κάθε φορά αποκυτταροποιείται, το πάχος του, το ποσοστό λίπους, την πυκνότητα του αλλά και πολλούς άλλους παράγοντες (Crapo et al. 2011).

Η αποκυτταροποίηση της τραχείας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με ήδη εφαρμοσμένο πρωτόκολλο. Σκοπός της αποκυτταροποίησης ήταν να παραχθεί ένα βιολογικό ικρίωμα με δυνατότητα μεταμόσχευσης και σωστής επαναλειτουργίας της (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Απεικόνιση της διαδικασίας αποκυτταροποίησης ιστού τραχείας.

8.3. Πρωτόκολλο Αποκυτταροποίησης

- Απομόνωση τραχείας μήκους 1,5 cm
- Πλύσιμο του ιστού σε PBS 1x
- Τοποθέτηση του ιστού σε CHAPS buffer για 22 ώρες υπό διαρκή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύσιμο του ιστού σε PBS 1x για 3x30 λεπτά υπό διαρκή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου
- Τοποθέτηση του ιστού σε SDS buffer για 22 ώρες υπό διαρκή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύσιμο του ιστού σε PBS 1x για 3x30 λεπτά υπό διαρκή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου
- Τοποθέτηση του ιστού σε α -MEM + 40 % v/v FBS στους 37°C υπό διαρκή ανακίνηση
- Πλύσιμο του ιστού σε PBS 1x για 3x30 λεπτά υπό διαρκή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου
- Επανάληψη του κύκλου αποκυτταροποίησης x3

Υλικά

- Ογκομετρικός κύλινδρος (VITLAB)
- Φίλτρο διήθησης 0,45 μ m (CORNING)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN)

- Συσκευή μέτρησης Ph (HANNA)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (BIOAIR)
- CHAPS (APPLICHEM)
- NaCl (SIGMA-ALDRICH)
- EDTA (USB)
- SDS (SIGMA-ALDRICH)
- Διάλυμα α-MEM (GIBCO)
- FBS (GIBCO)
- Penicillin-Streptomycin 1000 U/ml (GIBCO)
- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- Απεσταγμένο νερό
- Θερμαινόμενη συσκευή ανάδευσης (HEIDOLPH UNIMAX 1010)

Διαλύματα

1. Διάλυμα PBS 1x

- Προσθήκη 100ml διαλύματος PBS 10x σε 900ml απεσταγμένο νερό.
- Καλή ανάδευση
- Μεταφορά του διαλύματος PBS 1x σε φίλτρο διηθήσεως 0,22μm
- Παραμονή του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου

2. Διάλυμα CHAPS

- Ζύγιση του CHAPS ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 8 mM
- Ζύγιση του NaCl ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 1M
- Ζύγιση του EDTA ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 25 mM
- Προσθήκη των παραπάνω συστατικών σε PBS 1x
- Καλή ανάδευση
- Μέτρηση Ph και ρύθμιση του σε 7,5-8
- Μεταφορά του διαλύματος σε φίλτρο διηθήσεως 0,22μm

3. Διάλυμα SDS

- Ζύγιση του SDS ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 1,8 mM
- Ζύγιση του NaCl ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 1M
- Ζύγιση του EDTA ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 25 mM

- Προσθήκη των παραπάνω συστατικών σε PBS 1x
- Καλή ανάδευση
- Μέτρηση Ph και ρύθμιση του σε 7,5-8
- Μεταφορά του διαλύματος σε φίλτρο διηθήσεως 0,22μm

4. Διάλυμα α-MEM με FBS 40% v/v

Για την παρασκευή 100 ml χρειάστηκαν:

- 40ml FBS
- 1ml Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml)
- 59ml α-MEM

Μέτρηση pH των διαλυμάτων αποκυτταροποίησης

Για τη μέτρηση του pH των διαλυμάτων αποκυτταροποίησης χρησιμοποιήθηκε το πεχάμετρο (HANNA) βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε σε διαλύματα με όξινο pH (pH=4), ουδέτερο pH (pH=7) και βασικό pH (pH=9) με την εξής διαδικασία:

- Ξέπλυμα του αισθητήριου οργάνου με νερό βρύσης και καλό στέγνωμα
- Προσθήκη σε διάλυμα με όξινο pH (pH=4)
- Καλή ανάδευση και παρατήρηση μέτρησης
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης και καλό στέγνωμα
- Προσθήκη σε διάλυμα με ουδέτερο pH (pH=7)
- Καλή ανάδευση και παρατήρηση μέτρησης
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης και καλό στέγνωμα
- Προσθήκη σε διάλυμα με βασικό pH (pH=9)
- Καλή ανάδευση και παρατήρηση μέτρησης
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης και καλό στέγνωμα
- Προσθήκη του αισθητήριου οργάνου στα διαλύματα αποκυτταροποίησης.
- Καλή ανάδευση και παρατήρηση μέτρησης
- Ρύθμιση τους σε 7,5-8

Η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων αποκυτταροποίησης πραγματοποιήθηκε με τα διαλύματα υδροχλωρικού οξέος 1M (HCL) και υδροξειδίου του νατρίου 1M (NaOH).

Υλικά-Διαλύματα-Μηχάνηματα

- Πεχάμετρο (HANNA)
- Πρότυπα διαλύματα όξινου, ουδέτερου και βασικού pH.
- Υδροχλωρικό οξύ 1M (HCL) (SIGMA)
- Υδροξειδίο του νατρίου 1M (NaOH) (SIGMA)
- Νερό βρύσης

Μέτρηση φυσιολογικών χαρακτηριστικών του ιστού και λήψη ιστού για παράδοση στη μονάδα ιστολογίας

Πριν και μετά το πέρας της διαδικασίας αποκυτταροποίησης και αφού ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις των φυσιολογικών χαρακτηριστικών του ιστού τραχείας, πραγματοποιήθηκε λήψη ιστοτεμαχίων για παράδοση στη μονάδα ιστολογίας και περαιτέρω ανάλυση και αξιολόγηση των ιστολογικών χαρακτηριστικών του ιστού. Συγκεκριμένα:

- Μέτρηση μήκους, πάχους και διαμέτρου του ιστού
- Κόψιμο ενός τμήματος του ιστού για ιστολογικό έλεγχο
- Πλύσιμο του ιστού σε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS 1x) για να καθαριστεί το δείγμα από τυχόν υπολείματα αίματος
- Τοποθέτηση του ιστού σε πλαστική κασετίνα έγκλεισης με τον επιθυμητό προσανατολισμό.
- Κωδικοποίηση δείγματος

Υλικά-Διαλύματα-Μηχάνηματα

- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (BIOAIR)
- Παχύμετρο (DIGITAL CALIPER)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)
- Πλαστικές κασετίνες έγκλεισης (BIO-OPTICA)

8.4. Ιστολογική Αξιολόγηση Αποκυτταροποίησης

8.4.1. Ιστολογικός έλεγχος

Η συνηθέστερη διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των ιστών είναι η παρασκευή ιστολογικών τομών οι οποίες μπορούν να μελετηθούν με τη βοήθεια του μικροσκοπίου αφού πρώτα χρωματιστούν με τις κατάλληλες χρώσεις. Για το σκοπό αυτό πρέπει πρώτα να παρασκευαστούν λεπτές τομές η οποίες να είναι διαπερατές από το φως του μικροσκοπίου επομένως και ορατές. Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλη επεξεργασία του ιστού και κόψιμο λεπτών τομών σε μικροτόμο. Η επεξεργασία του ιστού χωρίζεται σε δυο διαδικασίες: τη μονιμοποίηση και την επεξεργασία του ιστού. Η επεξεργασία χωρίζεται σε τέσσερα επιμέρους βήματα:

1. **Αφυδάτωση**: αφαίρεση του νερού από τον ιστό μέσω διαδοχικής του παραμονής σε διάλυμα αιθανόλης.
2. **Διαύγαση**: προσθήκη ενός διαλύτη ο οποίος αναμειγνύεται με το υλικό έγκλεισης. Συγκεκριμένα για την παραφίνη ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης είναι η ξυλόλη.
3. **Σκλήνωση**: τοποθέτηση του ιστού σε λιωμένη παραφίνη η οποία αντικαθιστά την ξυλόλη.
4. **Έγκλειση**: δημιουργία των block μικροτόμησης.

8.4.2. Μονιμοποίηση δειγμάτων.

Η μονιμοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διατηρηθεί η δομή και η μοριακή σύνθεση του ιστού που χρησιμοποιήθηκε για τον ιστολογικό έλεγχο.

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Μεταλλική λαβίδα (KLS MARTIN)
- Πλαστικές κασετίνες έγκλεισης (BIO-OPTICA)
- Ποτήρι ζέσεως (DURAN)
- Διάλυμα φορμόλης 10% (SIGMA)
- Διάλυμα αλκοόλης 70%

Η μονιμοποίηση των τραχειών πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση τους σε κασετίνες έγκλεισης και την προσθήκη διαλύματος φορμόλης 10% για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα οι κασετίνες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70% για την αφυδάτωση του ιστού και παραδόθηκαν στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για να τοποθετηθούν τα δείγματα τραχείας σε ιστοκινέτα.

8.4.3. Μικροτόμηση δειγμάτων

Η μικροτόμηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε μικροτόμο του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Οι τομές των δειγμάτων λήφθηκαν σε πάχος 5μm και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης προκειμένου να προετοιμαστούν τα δείγματα για τις χρώσεις.

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Μικροτόμος (LEICA RM 2265).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυσίνης (THERMO SCIENTIFIC)
- Υδατόλουτρο (TERMOFIN)

8.4.4 Χρώση Δειγμάτων

Η Χρώση δειγμάτων για την σωστή αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης πραγματοποιήθηκε με τις εξής χρωστικές:

- Αιματοξυλίνη-Εωσίνη (Hematoxylin-Eosin)
- Masson's Trichrome
- Toluidine blue
- DAPI
- Elastic Van Gieson

Οι συγκεκριμένες χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του ιστού της τραχείας.

8.4.4.1. Χρώση με Αιματοξυλίνη-Εωσίνη (Hematoxylin-Eosin)

Η χρώση με Αιματοξυλίνη-Εωσίνη πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο του κυτταρικού περιεχομένου του ιστού.

Συγκεκριμένα, η αιματοξυλίνη χρωματίζει τους πυρήνες με το χαρακτηριστικό μωβ χρώμα ενώ η εωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα-εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με χρώμα ροζ.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για χρώση πραγματοποιήθηκε αρχικά η αποπαραφίνωση και η ενυδάτωση των τομών ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χρώση και η αφυδάτωσή τους

➤ **Διαδικασία αποπαραφίνωσης:** τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60 °C για 30 λεπτά και προσθήκη των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για την πλήρη απομάκρυνση της παραφίνης.

➤ **Διαδικασία ενυδάτωσης:** προσθήκη των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά,
- Αιθανόλη 96% για 2 λεπτά,
- Αιθανόλη 80% για 2 λεπτά

➤ **Διαδικασία Χρώσης:** πραγματοποίηση χρώσεων με Αιματοξυλίνη-Εωσίνη με τα εξής βήματα:

- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1 λεπτό.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε νερό βρύσης
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα ηωσίνης για 1 λεπτό.
- Πολύ καλό πλύσιμο σε νερό βρύσης.

➤ **Διαδικασίας αφυδάτωσης:** τοποθέτηση των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 80% για 30 δευτερόλεπτα,
- Αιθανόλη 96% για 30 δευτερόλεπτα
- Δύο διαδοχικά διαλύματα απόλυτης αιθανόλης 100% για 1 λεπτό το καθένα,
- Ξυλόλη για 1 λεπτό

Μετά την ολοκλήρωση των χρώσεων προστέθηκε μικρή ποσότητα DPX επάνω στις τομές και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για την προστασία και διατήρηση των τομών. Τα δείγματα αφέθηκαν για να στεγνώσουν προκειμένου να ακολουθήσει η μικροσκόπηση τους.

Υλικά-Διαλύματα-Μηγνήματα

- Διάλυμα ξυλόλης (SIGMA).
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)
- Διαλύματα αλκοολών 80%, 96%.
- Χρώση Αιματοξυλίνη (SIGMA)
- Χρώση Ηωσίνη (SIGMA)
- Πλαστικά δοχεία (VWR).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης (THERMO SCIENTIFIC)
- Διάλυμα DPX (VWR)
- Θερμαινόμενη πλάκα (BIOLINE SCIENTIFIC)

8.4.4.2 Χρώση με Masson's Trichrome

Η Χρώση με Masson's Trichrome χρησιμοποιήθηκε για την ιστολογική αξιολόγηση του κολλαγόνου. Χρωματίζει τους πυρήνες με μαύρο χρώμα, τις μυικές ίνες και το κυτταρόπλασμα με κόκκινο χρώμα ενώ το κολλαγόνο με μπλε χρώμα.. Για την πραγματοποίηση της χρώσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αρχικά η προετοιμασία των διαλυμάτων της χρώσης, η αποπαραφίνωση και η ενυδάτωση των τομών ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χρώση και η αφυδάτωσή τους.



Προετοιμασία διαλυμάτων της χρώσης Masson's Trichrome.

- **Αιματοξυλίνη Weigert's Iron:** αποτελείται από δυο διαλύματα, διάλυμα Α και διάλυμα Β τα οποία αναμειγνύονται σε ίση αναλογία. Η προετοιμασία γίνεται πριν από κάθε χρήση ώστε το διάλυμα να είναι φρέσκο.
- **Διάλυμα Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin:** έτοιμο προς χρήση.
- **Διάλυμα Aniline Blue:** έτοιμο προς χρήση
- **Διάλυμα Phosphotungstic acid/Phosphomolybdic acid:** Το διάλυμα φτιάχνεται ανακατεύοντας ίσο όγκο από το κάθε διάλυμα συν 2x όγκο απιονισμένο H₂O.

- **Οξικό οξύ (Acetic acid):** προετοιμασία οξικού οξέος 1%. Η αραιώση γίνεται με απεσταγμένο νερό (dH₂O).



Διαδικασία αποπαραφίνωσης: τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60 °C για 30 λεπτά και προσθήκη των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για την πλήρη απομάκρυνση της παραφίνης.



Διαδικασία ενυδάτωσης: προσθήκη των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά,
- Αιθανόλη 96% για 2 λεπτά,
- Αιθανόλη 80% για 2 λεπτά.



Διαδικασία Χρώσης: πραγματοποίηση χρώσεων με Χρώση με Masson's Trichrome με τα εξής βήματα:

- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Αιματοξυλίνη Weigert's Iron για 5 λεπτά.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε νερό βρύσης για 5 λεπτά.
- Πλύσιμο δειγμάτων σε απιονισμένο νερό.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin για 5 λεπτά.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε απιονισμένο νερό.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Phosphotungstic acid/ Phosphomolybdic acid για 5 λεπτά.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Aniline Blue για 5 λεπτά.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα οξικού οξέος για 2 λεπτά.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε απιονισμένο νερό.



Διαδικασία αφυδάτωσης: τοποθέτηση των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 80% για 30 δευτερόλεπτα,
- Αιθανόλη 96% για 30 δευτερόλεπτα
- Δύο διαδοχικά διαλύματα απόλυτης αιθανόλης 100% για 1 λεπτό το καθένα,
- Ξυλόλη για 1 λεπτό

Μετά την ολοκλήρωση των χρώσεων προστέθηκε μικρή ποσότητα DPX επάνω στις τομές και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για την προστασία και διατήρηση των τομών. Τα δείγματα αφέθηκαν για να στεγνώσουν προκειμένου να ακολουθήσει η μικροσκοπία τους.

Υλικά-Διαλύματα-Μηχάνημα

- Διάλυμα ξυλόλης (SIGMA).
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)
- Διαλύματα αλκοολών 80%, 96%.
- Χρώση Masson's Trichrome. (SIGMA)
- Πλαστικά δοχεία (VWR).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης (THERMO SCIENTIFIC)
- Διάλυμα DPX (VWR)
- Θερμαινόμενη πλάκα (BIOLINE SCIENTIFIC)

8.4.4.3 Χρώση με Elastic Van Gieson

Η Χρώση Elastic Van Gieson χρησιμοποιήθηκε για την ιστολογική αξιολόγηση της ελαστίνης. Χρωματίζει την ελαστίνη και τους πυρήνες με μαύρο χρώμα, τις μυικές ίνες με κίτρινο και το κολλαγόνο με κόκκινο χρώμα.. Για την πραγματοποίηση της χρώσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αρχικά η προετοιμασία των διαλυμάτων της χρώσης, η αποπαραφίνωση και η ενυδάτωση των τομών ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χρώση και η αφυδάτωσή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων της χρώσης Elastic Van Gieson

- **Διάλυμα Working Elastic Stain:** αποτελείται από τα διαλύματα Hematoxylin Solution Alcoholic, Ferric Chloride, Weigert's Iodine και dH₂O τα οποία αναμειγνύονται σε ποσότητες 20ml, 3ml, 8ml και 5 ml αντίστοιχα. Η προετοιμασία γίνεται πριν από κάθε χρήση ώστε το διάλυμα να είναι φρέσκο.
- **Διάλυμα Working Ferric Chloride:** για την προετοιμασία του διαλύματος προστίθενται 3ml διαλύματος Ferric Chloride σε 37ml dH₂O.
- **Διάλυμα Van Gieson:** έτοιμο προς χρήση.

➤ **Διαδικασία αποπαραφίνωσης:** τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60 °C για 30 λεπτά και προσθήκη των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για την πλήρη απομάκρυνση της παραφίνης.

➤ **Διαδικασία ενυδάτωσης:** προσθήκη των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά,
- Αιθανόλη 96% για 2 λεπτά,
- Αιθανόλη 80% για 2 λεπτά.

➤ **Διαδικασία Χρώσης:** πραγματοποίηση χρώσεων με Elastic Van Gieson με τα εξής βήματα:

- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Working Elastic Stain για 10 λεπτά.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε dH₂O.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Working Ferric Chloride για λίγα δευτερόλεπτα.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε νερό βρύσης.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα αιθανόλης 95%.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε dH₂O.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Van Gieson για 3 λεπτά.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα αιθανόλης 95%.



Λιαδικασίας αφυδάτωσης: τοποθέτηση των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 80% για 30 δευτερόλεπτα,
- Αιθανόλη 96% για 30 δευτερόλεπτα
- Δύο διαδοχικά διαλύματα απόλυτης αιθανόλης 100% για 1 λεπτό το καθένα,
- Ξυλόλη για 1 λεπτό

Μετά την ολοκλήρωση των χρώσεων προστέθηκε μικρή ποσότητα DPX επάνω στις τομές και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για την προστασία και διατήρηση των τομών. Τα δείγματα αφέθηκαν για να στεγνώσουν προκειμένου να ακολουθήσει η μικροσκοπηση τους

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Διάλυμα ξυλόλης (SIGMA).
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)
- Διαλύματα αλκοολών 80%, 96%.
- Χρώση Elastic Van Gieson. (SIGMA)
- Πλαστικά δοχεία (VWR).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης (THERMO SCIENTIFIC)
- Διάλυμα DPX (VWR)
- Θερμαινόμενη πλάκα (BIOLINE SCIENTIFIC)

8.4.4.4 Χρώση DAPI

Η χρώση DAPI χρησιμοποιήθηκε για την ιστολογική αξιολόγηση της ύπαρξης πυρήνων. Η φθορίζουσα βαφή DAPI δεσμεύεται επιλεκτικά στο DNA και σχηματίζει ισχυρά φθορίζοντα σύμπλοκα DNA-DAPI με υψηλή εξειδίκευση. Το DAPI, μόλις προστεθεί σε κύτταρα ιστοκαλλιέργειας, απορροφάται ταχέως σε κυτταρικό DNA, αποδίδοντας πυρήνες υψηλού φθορισμού χωρίς να υπάρχει ανιχνεύσιμος κυτταροπλασματικός φθορισμός.

Για την πραγματοποίηση της χρώσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αρχικά η προετοιμασία των διαλυμάτων της χρώσης, η αποπαραφίνωση και η ενυδάτωση των τομών ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χρώση και η αφυδάτωσή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων της χρώσης DAPI

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε όλη η χρώση για τη δημιουργία διαλύματος προς αποθήκευση (stock solution) και τοποθετήθηκε στους -20°C . Για τη χρώση DAPI χρειάστηκε συγκέντρωση 300nM και η αραίωση πραγματοποιήθηκε σε PBS.

➤ **Διαδικασία αποπαραφίνωσης:** τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C για 30 λεπτά και προσθήκη των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για την πλήρη απομάκρυνση της παραφίνης.

➤ **Διαδικασία ενυδάτωσης:** προσθήκη των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά,
- Αιθανόλη 96% για 2 λεπτά,
- Αιθανόλη 80% για 2 λεπτά.

➤ **Διαδικασία Χρώσης:** πραγματοποίηση χρώσης με DAPI ως εξής:

- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα DAPI. Συγκεκριμένα προστέθηκαν σταγόνες διαλύματος DAPI επάνω στις τομές του ιστού ώστε να καλυφθεί πλήρως $\sim 20\mu\text{l}$ σε κάθε τομή.
- Επώαση στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
- Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε PBS.

➤ **Διαδικασίας αφυδάτωσης:** τοποθέτηση των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 80% για 30 δευτερόλεπτα,
- Αιθανόλη 96% για 30 δευτερόλεπτα
- Δύο διαδοχικά διαλύματα απόλυτης αιθανόλης 100% για 1 λεπτό το καθένα,
- Ξυλόλη για 1 λεπτό

Μετά την ολοκλήρωση των χρώσεων προστέθηκε μικρή ποσότητα γλυκερόλης επάνω στις τομές και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για την προστασία και διατήρηση

των τομών. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε σκοτεινό μέρος μέχρι την αξιολόγησή τους σε μικροσκόπιο Leica DMR με UV φώς.

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- Διάλυμα ξυλόλης (SIGMA)
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)
- Διαλύματα αλκοολών 80%, 96%.
- Χρώση DAPI. (INVITROGEN)
- Πλαστικά δοχεία (VWR).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης (THERMO SCIENTIFIC)
- Διάλυμα γλυκερόλης (VWR)
- Θερμαινόμενη πλάκα (BIOLINE SCIENTIFIC)

8.4.4.5 Χρώση με Tolouidine Blue

Η χρώση Tolouidine Blue χρωματίζει τις γλυκοζαμινογλυκάνες που βρίσκονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για χρώση πραγματοποιήθηκε αρχικά η αποπαραφίνωση και η ενυδάτωση των τομών ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χρώση και η αφυδάτωσή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων της χρώσης Tolouidine Blue

Για τη χρώση Tolouidine Blue χρειάστηκε συγκέντρωση 1% και η αραιώση πραγματοποιήθηκε σε dH₂O. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε 1gr χρώσης Tolouidine Blue η οποία προστέθηκε σε 100ml dH₂O. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα του διαλύματος σε φίλτρο 0,45μm πριν τη χρήση του.



Διαδικασία αποπαραφίνωσης: τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60 °C για 30 λεπτά και προσθήκη των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για την πλήρη απομάκρυνση της παραφίνης.

- **Λιαδικασία ενυδάτωσης:** προσθήκη των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:
- Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά,
 - Αιθανόλη 96% για 2 λεπτά,
 - Αιθανόλη 80% για 2 λεπτά
- **Λιαδικασία Χρώσης:** πραγματοποίηση χρώσεων με Tolouidine Blue με τα εξής βήματα:
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε διάλυμα Tolouidine Blue 1% για 30 λεπτά.
 - Πολύ καλό πλύσιμο δειγμάτων σε νερό βρύσης
- **Λιαδικασίας αφυδάτωσης:** τοποθέτηση των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:
- Αιθανόλη 80% για 30 δευτερόλεπτα,
 - Αιθανόλη 96% για 30 δευτερόλεπτα
 - Δύο διαδοχικά διαλύματα απόλυτης αιθανόλης 100% για 1 λεπτό το καθένα,
 - Ξυλόλη για 1 λεπτό

Μετά την ολοκλήρωση των χρώσεων προστέθηκε μικρή ποσότητα DPX επάνω στις τομές και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για την προστασία και διατήρηση των τομών. Τα δείγματα αφέθηκαν για να στεγνώσουν προκειμένου να ακολουθήσει η μικροσκοπηση τους.

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Διάλυμα ξυλόλης (SIGMA).
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)
- Διαλύματα αλκοολών 80%, 96%.
- Χρώση Tolouidine Blue (SIGMA)
- Πλαστικά δοχεία (VWR).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης (THERMO SCIENTIFIC)
- Διάλυμα DPX (VWR)
- Θερμαινόμενη πλάκα (BIOLINE SCIENTIFIC)
- Φίλτρα 0,45μm (CORNING)

8.4.5. Μικροσκοπία Δειγμάτων

Για την μικροσκόπηση των ιστολογικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το ορθό οπτικό μικροσκόπιο LEICA DM LS2 και μικροσκόπιο Leica DMR με UV φώς. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε διάφορες εστιάσεις των 10x, 20x και 40x για καλύτερη εικόνα και αξιολόγηση των ιστολογικών ευρημάτων.

8.4.6. Ανάλυση Εικόνων

Η λήψη και επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε με τα εξής προγράμματα:

- Πρόγραμμα λήψης και επεξεργασίας εικόνων IC Capture 2.4
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων Image J

Οι λήψεις των εικόνων πραγματοποιήθηκαν σε μη αποκυτταροποιημένο και αποκυτταροποιημένο ιστό με τις ίδιες ακριβώς ρυθμίσεις προκειμένου να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα.

8.5 Ποσοτική αξιολόγηση αποκυτταροποίησης

8.5.1 Ποσοτικοποίηση DNA του ιστού της τραχείας

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μεταμόσχευση ενός αποκυτταροποιημένου ιστού είναι η πλήρης απομάκρυνση του γενετικού υλικού προκειμένου να αποφευχθεί ανοσολογική απόκριση από τον ασθενή. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποσοτικοποίησης του DNA στις αποκυτταροποιημένες τραχείες (n=6) και σύγκρισή τους με φυσιολογικές (n=6). Σύμφωνα με τα ευρήματα ορισμένων μελετών, συστήνεται ποσότητα <50 ng dsDNA/mg εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ως αξιόπιστο κριτήριο που επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης (Vacanti et al., 1999).

Φυσιολογικές και αποκυτταροποιημένες τραχείες τοποθετήθηκαν σε πρωτεΐνωση K (Sigma Aldrich, Germany) και Lysis Buffer (0.1 M Tris pH 8, 0.2 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.4% SDS) για όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 55⁰C. Ακολούθησε αδρανοποίηση στους 95⁰C για 5 λεπτά και πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το Quantifluor dsDNA System E2670 Promega (Glomax Promega) σύμφωνα με τις ενδεδειγμένες οδηγίες.



Απομόνωση DNA

- Αφυδάτωση του ιστού τραχείας για απομάκρυνση της περίσσειας υγρού
- Ζύγισμα του ιστού (50-100 mg)
- Πολύ καλό κόψιμο της τραχείας με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων
- Προσθήκη της τραχείας σε eppendorf με 1ml πρωτεϊνάση K 1mg/ml και λυτικό διάλυμα 1x (0.1 M Tris pH 8, 0.2 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.4% SDS).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 55^o C για όλη τη διάρκεια της νύχτας
- Αδρανοποίηση του ενζύμου με προσθήκη δείγματος στους 95^o C για 5 λεπτά, εφόσον έχει πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της τραχείας
- Στην περίπτωση που δεν έχει πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της τραχείας, τότε προσθήκη επιπλέον 1mg/ml πρωτεϊνάσης K.
- Μετά την αδρανοποίηση, προσθήκη Phenol/Chloroform/ Isamycil Alcohol (25:24:1) σε ίση ποσότητα όγκου με τον όγκο της ομογενοποιημένης τραχείας.
- Πολύ καλό vortex
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 13,2 rpm.
- Αναρρόφηση της υδατικής φάσης, πολύ προσεχτικά χωρίς διατάραξη της μέσης στοιβάδας.
- Μεταφορά της σε νέο eppendorf των 1,5 ml.
- Προσθήκη από απόλυτης αιθανόλης σε ποσότητα 2x του όγκου της υδάτινης φάσης
- Ανακίνηση της αρκετές φορές, και τοποθέτηση της στους -20^o C για 20 λεπτά το ελάχιστο ή και όλη τη διάρκεια της νύχτας.
- Φυγοκέντρηση στις 13,2 rpm για 5 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκειμένου πολύ προσεχτικά.
- Προσθήκη 70^o αιθανόλης, χωρίς να διαταραχθεί το δημιουργηθέν ίζημα.
- Φυγοκέντρηση στις 13,2 rpm για 5 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκειμένου πολύ προσεχτικά.
- Στέγνωμα για 5-10 λεπτά (εξαρτάται από το ίζημα), αφήνοντας ανοιχτό το καπάκι του eppendorf.
- Προσθήκη από 30- 200 μl RNase free ύδωρ (εξαρτάται από το ίζημα).

Lysis Buffer 1x

Τελική C	Για τα 100 ml:
0.1M Tris pH 8.0	10 ml 1M Tris pH 8.0
0.2 M NaCl	4 ml 5M NaCl
5 mM EDTA	1 ml 0.5 M EDTA
0.4% SDS	2 ml 20% SDS

**Προετοιμασία πρότυπης καμπύλης και δειγμάτων**

1. Η πρότυπη καμπύλη προετοιμάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις διαλυμάτων με TE Buffer και dsDNA όπως περιγράφεται στον πίνακα.

Πρότυπη καμπύλη		
Blank	Χωρίς DNA	300μl TE Buffer
A	980 μl TE Buffer	20μl dsDNA
B	250μl A	750μl TE Buffer
C	250μl B	750μl TE Buffer
D	250μl C	750μl TE Buffer
E	250μl D	750μl TE Buffer
F	250μl E	750μl TE Buffer
G	250μl F	750μl TE Buffer

Πίνακας 2: Διαδοχικές αραιώσεις για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης

2. Προετοιμασία working dsDye solution 200x σε τελική συγκέντρωση 0,5%. Υπολογίστηκε ο αριθμός των δειγμάτων και στη συνέχεια η ποσότητα του working dsDye solution που πρέπει να χρησιμοποιηθεί ώστε να βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,5%. Στη συνέχεια αναμίχθηκε με TE Buffer.
3. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με την ανάμιξη του TE Buffer. Για κάθε αντίδραση χρειάστηκαν 100μl δείγματος DNA τραχείας + TE Buffer. Συγκεκριμένα αναμίχθηκε 1μl δείγματος DNA τραχείας σε 99μl TE Buffer.

4. Η προετοιμασία του 96-well plate που περιελάμβανε τα δείγματα πρότυπης καμπύλης και DNA τραχείας πραγματοποιήθηκε με την ανάμιξη των διεγμάτων και του working dsDye solution (W.S) όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την πρότυπη καμπύλη	100μl πρότυπου δείγματος	100μl W.S
Για τα δείγματα τραχείας	100μl δείγματος τραχείας (DNA τραχείας +TE Buffer)	100μl W.S

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Ιστός τραχείας
- Πρωτεΐνωση K (SIGMA-ALDRICH)
- Tris (SIGMA-ALDRICH)
- NaCl (SIGMA-ALDRICH)
- EDTA (USB)
- SDS (SIGMA-ALDRICH)
- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN)
- Συσκευή μέτρησης Ph (HANNA)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (BIOAIR)
- RNase free ύδωρ
- Eppendorf (KISKER BIOTECH GmbH & Co)
- Φυγόκεντρος- Centrifuge 5804 (EPPENDORF)
- Διάλυμα αλκοόλης 70%
- Πιπέττες (GREINER)
- Vortex (Heidolph Reax)
- Phenol/Chloroform/ Isamycil Alcohol (25:24:1) (APPLICHEM)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)
- Centrifuge 5417R (EPPENDORF)
- Quantifluor dsDNA System E2670 Promega (Glomax Promega)
- Quantifluor dsDNA Concentration Calculation Kit (Glomax Promega)
- 96 well plate (COSTAR)

8.5.2 Ποσοτικοποίηση κολλαγόνου

Για την ποσοτικοποίηση του κολλαγόνου χρησιμοποιήθηκε το Hydroxyproline Assay Kit (Sigma-Aldrich, Germany). Η υδροξυπρολίνη είναι ένα μη πρωτεϊνικό αμινοξύ που σχηματίζεται από την μεταφραστική υδροξυλίωση της προλίνης. Η υδροξυπρολίνη είναι ένα σημαντικό συστατικό του κολλαγόνου που εξυπηρετεί τη σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής. Επειδή η υδροξυπρολίνη βρίσκεται κυρίως στο κολλαγόνο, η μέτρηση των επιπέδων της, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της περιεκτικότητας σε κολλαγόνο.

Για την ποσοτικοποίηση της υδροξυπρολίνης χρησιμοποιήθηκαν Φυσιολογικές (n=8) και αποκυτταροποιημένες (n=8) τραχείες (10 mg). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των διαλυμάτων που ήταν απαραίτητα για την δοκιμή ποσοτικοποίησης, έπειτα τα πρότυπα δείγματα για την πρότυπη καμπύλη και τέλος τα δείγματα του ιστού της τραχείας για την αξιολόγηση της ποσοτικοποίησης.



Προετοιμασία διαλυμάτων

Η προετοιμασία των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε μετά την προετοιμασία των δειγμάτων ιστού τραχείας διότι μπορούν να παραμείνουν σταθερά μόνο για 2-3 ώρες.

- **Chloramine T/Oxidation Buffer Mixture:** για κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε, χρειάστηκαν 100μl διαλύματος. Αναμίχθηκαν 6μl διαλύματος Chloramine T σε 94μl διαλύματος Oxidation Buffer.
- **DMAB Reagent:** για κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε, χρειάστηκαν 100μl διαλύματος. Αναμίχθηκαν 50μl διαλύματος DMAB Concentrate σε 50μl Perchloric Acid/Isopropanol.



Πρότυπη καμπύλη

- Αραίωση 10μl από το Hydroxyproline Standard Solution με 90μl νερό ώστε να προετοιμαστεί συγκέντρωση του Hydroxyproline Standard Solution 0,1mg/ml.
- Προσθήκη 0,2,4,6,8 και 10 μl από το 0,1mg/ml Hydroxyproline Standard Solution σε τρυβλίο 96 οπών ώστε να παραχθεί συγκέντρωση 0 (blank), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1.0 μg/πηγάδι πρότυπου διαλύματος.

**Προετοιμασία δειγμάτων**

- Ομογενοποίηση 10mg ιστού.
- Προσθήκη 100μl υδροχλωρικού οξέος (HCL, 12M)
- Υδρόλυση δειγμάτων σε 120⁰C για 3 ώρες.

**Δοκιμή ποσοτικοποίησης κολλαγόνου**

- Προσθήκη 10μl ομογενοποιημένου δείγματος ιστού το οποίο είχε αραιώση 1/20.*
- Προσθήκη 100μl Chloramine T/Oxidation Buffer Mixture σε κάθε δείγμα ιστού και πρότυπης καμπύλης.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 100μl DMAB Concentrate/ Perchloric Acid-Isopropanol Solution σε κάθε δείγμα ιστού και πρότυπης καμπύλης.
- Επώαση για 90 λεπτά σε 60⁰C
- Εφαρμογή πάραφιλμ στο τρυβλίο ώστε να προστατευθεί ο όγκος των δειγμάτων
- Υπολογισμός απορρόφησης στα 560nm (A₅₆₀).

*Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές με την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων και αραιώσεων δείγματος κάθε φορά. Η τελική ποσότητα και αραιώση επιλέχθηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης και ήταν 10μl δείγματος αραιωμένο 1/20.

Υλικά-Διαλύματα-Μηνήματα

- Ιστός τραχείας
- Hydroxyproline Assay Kit (SIGMA-ALDRICH)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (BIOAIR)
- Eppendorf (KISKER BIOTECH GmbH & Co)
- Πιπέττες (GREINER)
- Vortex (Heidolph Reax)

- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)
- 96 well plate (COSTAR)
- Υδροχλωρικό οξύ 1M (HCL)
- Μηχάνημα υδρόλυσης (WEALTECH CORP)
- Θερμαινόμενη πλάκα (BIOLINE SCIENTIFIC)
- dH₂O
- Μηχάνημα SPECTROstar Nano (BMG LABTECH)

8.5.3 Ποσοτικοποίηση GAGs γλυκοζαμινογλυκανών

Για την ποσοτικοποίηση των γλυκοζαμινογλυκανών χρησιμοποιήθηκε το Assay for Sulphated Proetoglycans (Sigma-Aldrich, Germany). Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι πολυσακχαριδικές αλυσίδες που συνήθως αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες. Βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια ζωικών κυττάρων και αποτελούν θεμελιώδη συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, του υαλώδους υγρού του οφθαλμού, των εκκρίσεων των βλεννοπαραγωγικών κυττάρων και των χόνδρων. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες περιέχουν τουλάχιστον ένα σάκχαρο με αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλική ήθειική ομάδα καθώς επίσης και ένα αμινοσάκχαρο το οποίο μπορεί να είναι γλυκοζαμίνη ή γαλακτοζαμίνη.

Για την ποσοτικοποίηση των GAGs χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικές (n=8) και αποκυτταροποιημένες (n=8) τραχείες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των διαλυμάτων που ήταν απαραίτητα για την δοκιμή ποσοτικοποίησης, έπειτα τα πρότυπα δείγματα για την πρότυπη καμπύλη και τέλος τα δείγματα του ιστού της τραχείας για την αξιολόγηση της ποσοτικοποίησης.



Προετοιμασία διαλυμάτων

- Προσθήκη του 1,9-Dimethylene blue (DMB) σε 2,5 ml απόλυτης αιθανόλης
- Προσθήκη του παραπάνω διαλύματος σε 1ml φορμικού οξέος και 1gr μυρμηκικού νατρίου.
- Προσθήκη dH₂O μέχρι τα 500ml τελικό όγκο.

**Προετοιμασία δειγμάτων**

- Αφυδάτωση του ιστού τραχείας για απομάκρυνση της περίσσειας υγρού
- Ζύγισμα του ιστού (50-100 mg)
- Πολύ καλό κόψιμο της τραχείας με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων
- Προσθήκη της τραχείας σε eppendorf με 1ml πρωτεΐνάση K 1mg/ml.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 55^oC για όλη τη διάρκεια της νύχτας
- Αδρανοποίηση του ενζύμου με προσθήκη δείγματος στους 95^oC για 5 λεπτά, εφόσον έχει πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της τραχείας
- Στην περίπτωση που δεν έχει πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της τραχείας, τότε προσθήκη επιπλέον 1mg/ml πρωτεΐνάσης K.

**Προετοιμασία διαλυμάτων πρότυπης καμπύλης (GAG Standards)**

Για τα διαλύματα πρότυπης καμπύλης προστέθηκε 1mg/ml θειικής χονδροϊτίνης σε (1x) PBS. Φτιάχτηκαν πρότυπα διαλύματα σε συγκεντρώσεις 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150 και 200 mg/ml.

**Πρωτόκολλο διαδικασίας ποσοτικοποίησης GAGs**

- Για κάθε αντίδραση χρειάστηκαν 290μl δείγματος. Συγκεκριμένα:

Για την πρότυπη καμπύλη	40μl πρότυπου δείγματος	250μl DMB
Για τα δείγματα τραχείας*	40μl δείγματος τραχείας	250μl DMB

- Υπολογισμός απορρόφησης στα 525nm (A_{525}). Από την στιγμή της προσθήκης του διαλύματος DMB, η απορρόφηση πρέπει να υπολογιστεί σε λιγότερο από 60 sec.

* Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές με την προσθήκη διαφορετικών αραιώσεων δείγματος κάθε φορά. Η τελική αραιώση επιλέχθηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης και ήταν 1/20.

Υλικά-Διαλύματα-Μηνήματα

- Ιστός τραχείας
- Assay for Sulphated Proetoglycans (SIGMA-ALDRICH)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (BIOAIR)
- Eppendorf (KISKER BIOTECH GmbH & Co)
- Πιπέττες (GREINER)
- Vortex (HEIDOLPH REAX)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)
- 96 well plate (COSTAR)
- Centrifuge 5417R (EPPENDORF)
- Μηχάνημα SPECTROstar Nano (BMG LABTECH)
- Πρωτεΐνάση K (SIGMA-ALDRICH)
- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- dH₂O
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)

8.6 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Τα συμβατικά ηλεκτρονικά μικροσκόπια σάρωσης (SEM) λειτουργούν σε πολύ υψηλά κενά για να αποφεύγουν τα μόρια αερίου να παρεμβαίνουν τόσο στην πρωτογενή δέσμη ηλεκτρονίων όσο και στα δευτερεύοντα ή τα πίσω-εκτονωμένα ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από το δείγμα. Αυτό σημαίνει ότι τα πάντα που εισέρχονται στο SEM πρέπει να είναι εντελώς στεγνά και απαλλαγμένα από οποιουσδήποτε οργανικούς μολυσματικούς παράγοντες που ενδέχεται να εξέρχονται από το περιβάλλον σε περιβάλλον υψηλού κενού. Αυτό δημιουργεί πρόβλημα κατά την αντιμετώπιση βιολογικών δειγμάτων που αποτελούνται κατά μεγάλο μέρος από νερό, γεγονός που απαιτεί επιπρόσθετα προπαρασκευαστικά στάδια για να εξασφαλιστεί η διατήρηση της φυσικής δομής του οργανισμού. Τα απαραίτητα βήματα εξαρτώνται από τον τύπο του δείγματος και τον σκοπό της μελέτης.

Η σταθεροποίηση/μονιμοποίηση είναι το πρώτο και σημαντικότερο βήμα για τη βέλτιστη διατήρηση των βιολογικών δειγμάτων.. Η άμεση μεταφορά των δειγμάτων

σε σταθεροποιητικό μέσο θα σταματήσει τις κυτταρικές αλλαγές που εμφανίζονται στον οργανισμό ή στον ιστό μετά τη συγκομιδή ή τη θανάτωσή του. Επίσης, είναι σημαντικό να συλλεχθεί όσο το δυνατόν μικρότερο δείγμα για να εξασφαλιστεί καλή διείσδυση του στερεωτικού στο δείγμα ή εναλλακτικά να τεμαχιστεί τεμαχίζετε ένα τμήμα δείγματος πριν από τη μονιμοποίησή του.

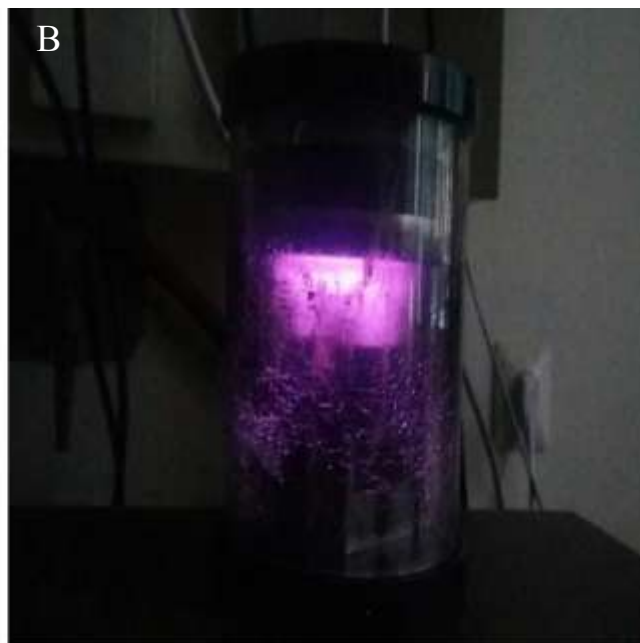
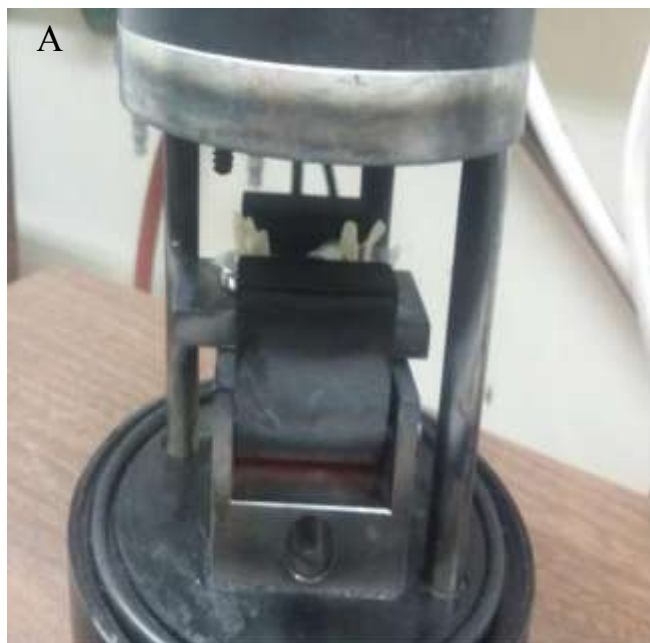
Για την ποιοτική αξιολόγηση των ιστών της τραχείας καθώς και την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης πραγματοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε αποκυτταροποιημένες τραχείες. Τα δείγματα των ιστών της τραχείας προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Μονιμοποίηση δειγμάτων σε 10% φορμόλη και 70% αιθανόλη στους 4 °C.
- Αφυδάτωση των δειγμάτων μέσω διαδοχικής του παραμονής τους σε διάλυμα αιθανόλης. Συγκεκριμένα:
 - i. Προσθήκη δειγμάτων σε 30% αιθανόλη για 20λεπτά
 - ii. Προσθήκη δειγμάτων σε 50% αιθανόλη για 20λεπτά
 - iii. Προσθήκη δειγμάτων σε 70% αιθανόλη για 20λεπτά
 - iv. Προσθήκη δειγμάτων σε 80% αιθανόλη για 20λεπτά
 - v. Προσθήκη δειγμάτων σε 96% αιθανόλη για 20λεπτά
 - vi. Προσθήκη δειγμάτων σε 100% αιθανόλη για 20λεπτά
 - vii. Προσθήκη δειγμάτων σε 100% αιθανόλη για 20λεπτά
- Πραγματοποίηση πλήρους ξήρανσης των ιστών
- Τοποθέτηση των ιστών σε ειδικές μεταλλικές βάσεις (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Απεικόνιση των ιστών της τραχείας στις μεταλλικές θήκες.

- Επιχρύσωση των δειγμάτων ιστού (Εικόνα 10)



Εικόνα 10 (Α,Β,Γ): Προετοιμασία δειγμάτων για επιχρύσωση και απεικόνιση της διαδικασίας.

- Παρατήρηση ιστών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Τοποθέτηση των δειγμάτων ιστού τραχείας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για παρατήρηση.

Υλικά-Διαλύματα-Μηνήματα

- Πλαστικές κασετίνες έγκλεισης (BIO-OPTICA)
- Ποτήρι ζέσεως (DURAN)
- Διάλυμα φορμόλης 10% (SIGMA)
- Διάλυμα αλκοόλης 70%
- Διάλυμα αλκοόλης 30%
- Διάλυμα αλκοόλης 50%
- Διάλυμα αλκοόλης 80%
- Διάλυμα αλκοόλης 96%
- Ιστός τραχείας

- Απεσταγμένο νερό dH₂O
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)
- Χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Samsputter-2a, Automatic Sputter-coating Apparatus)

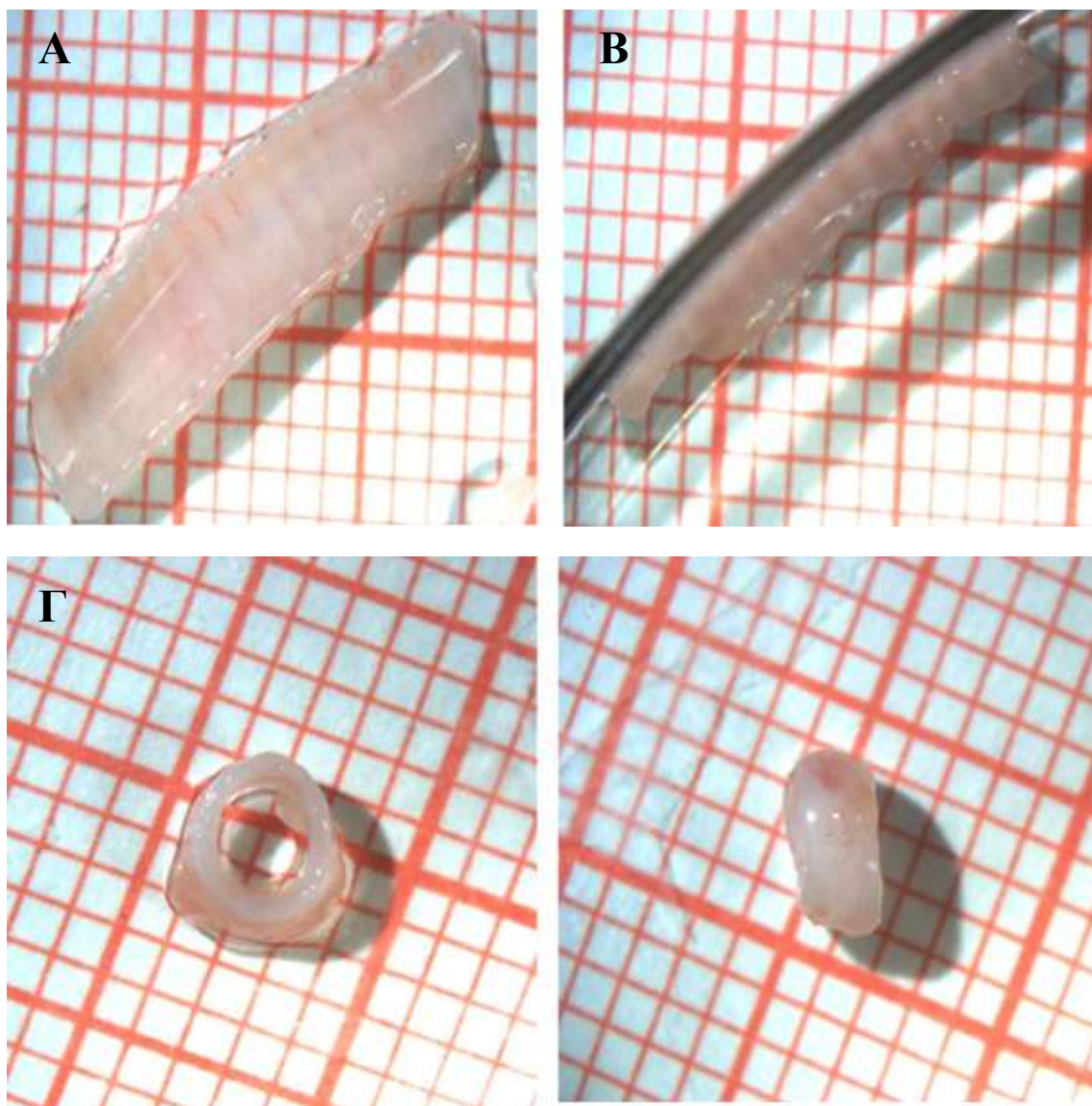
8.7 Εμβιομηχανικός έλεγχος

Ο εμβιομηχανικός έλεγχος των ιστών πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί κατά πόσο είχαν διατηρηθεί οι μηχανικές ιδιότητες των ιστών μετά από την αποκυτταροποίηση. Η διατήρηση των ιδιοτήτων αυτών και συγκεκριμένα της ελαστικότητας του ιστού κατά την εφαρμογή πίεσης είναι πολύ σημαντική, ιδιαίτερα όταν το ικρίωμα προορπίζεται για μεταμόσχευση.

8.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων και γεωμετρική αξιολόγηση

Οι ιστοί τραχείας διατηρήθηκαν για εμβιομηχανική μελέτη. Ολόκληρη η τραχεία από 22 αρουραίους (11 εγγενείς και 11 αποκυτταροποιημένους) διατηρήθηκαν σε διάλυμα PBS (1x) στους 4 °C και αφέθηκαν να έρθουν σε θερμοκρασία 37 °C πριν τον έλεγχο. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε ένας χόνδρινος δακτύλιος από το επάνω τμήμα της τραχείας και ένας χόνδρινος δακτύλιος από το κάτω μέρος της τραχείας, καθώς το πάχος του ιστού δεν είναι ομοιόμορφο κατά μήκος του, ώστε να μελετηθούν οι εμβιομηχανικές ιδιότητες της περιφερικής κατεύθυνσης του ιστού. Έπειτα, κόπηκαν τα παρακείμενα δείγματα λωρίδων από την πρόσθια και την οπίσθια διαδρομή τραχείας, στο μεσαίο τμήμα, προκειμένου να μελετηθούν οι εμβιομηχανικές ιδιότητες της διαμήκουσ κατεύθυνσης του ιστού. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ένα μεγάλο τρυβλίο που περιείχε διάλυμα PBS (1x) σε θερμοκρασία 37 °C και φωτογραφήθηκαν οι πλευρικές και μετωπικές πλευρές (Εικόνα 12) με έγχρωμη ψηφιακή κάμερα Leica DFC500 (Leica Microsystems GmbH) στο στερεοσκόπιο Nikon SMZ800 (Nikon Instruments Europe BV). Η εσωτερική και η εξωτερική περιφέρεια, το πάχος, η διατομή και το πλάτος των δειγμάτων των δακτυλίων καθώς και το μήκος, το πλάτος και το πάχος των λωρίδων του ιστού υπολογίστηκαν από τις εικόνες, που λήφθηκαν στο στερεοσκόπιο, με το πρόγραμμα Image-Pro Plus v.4.5 (Media Cybernetics Inc). Οι υπολογισμοί του πάχους και του πλάτους παραγματοποιήθηκαν αυτόματα σε εκατό ισαπέχουσες θέσεις

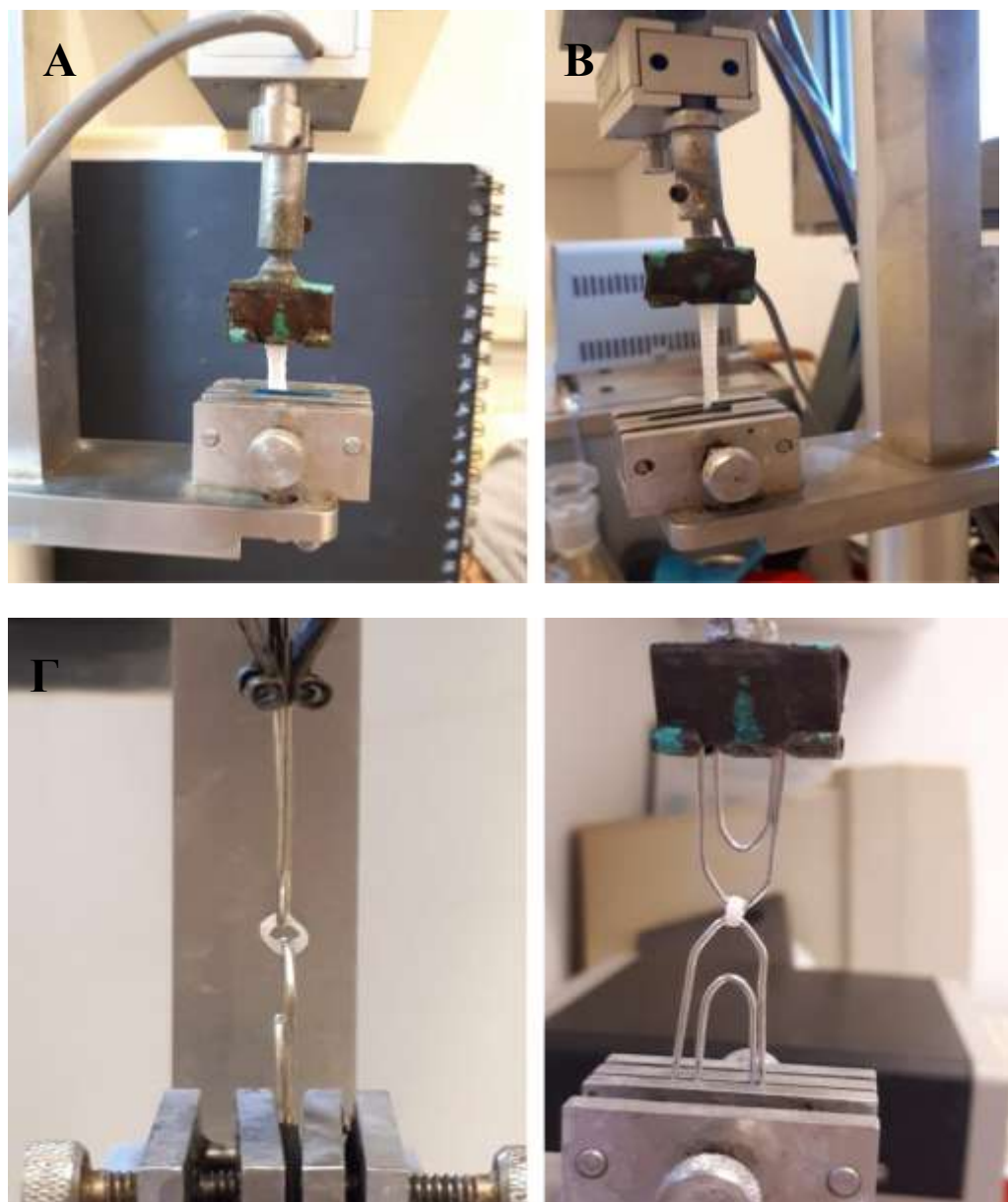
κατά μήκος των δακτυλίων περιφέρειας και το μήκος των λωρίδων του ιστού και στη συνέχεια λαμβάνοντας τον μέσο όρο.



Εικόνα 12 (Α,Β,Γ,Δ): Πλευρικές και μετωπικές πλευρές ιστών τραχείας σε χαρί millimeter με έγχρωμη ψηφιακή κάμερα Leica DFC500 στο στερεοσκόπιο Nikon SMZ800.

8.7.2 Μονοαξονική τάση: ρύθμιση και μέθοδοι

Η πειραματική συσκευή (Vitrodyne V1000 Universal Tester, Liveco Inc., Burlington, VT, ΗΠΑ) αποτελείται από (α) μία σταθερή κάτω λαβή και μία ανώτερη λαβή προσαρτημένη στον ενεργοποιητή, σταδιακά επεκτείνοντας τα δείγματα που ήταν κατακόρυφα τοποθετημένα στις λαβές, (β) μια κυψελίδα φορτίου (GSO-250, Transducer Techniques, Temecula, CA, ΗΠΑ) με ακρίβεια 0,01 g για την αξιολόγηση του φορτίου, (γ) έναν περιστροφικό κωδικοποιητή που παρέχει ανατροφοδότηση σχετικά με την κατακόρυφη μετατόπιση της ανώτερης λαβής δείγματος με ακρίβεια 10 μm , (δ) ένα αλατούχο λουτρό όπου τα δείγματα βυθίστηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής για να διατηρηθεί η φυσιολογική ενυδάτωση των ιστών, ε) ένα πηνίο θερμαντήρα (1130A, PolyScience, Niles, IL, USA) που ρυθμίζει τη θερμοκρασία του αλατούχου λουτρού στους 37 ° C και (στ) έναν συνοδευτικό προσωπικό υπολογιστή, συνδεδεμένο με τον διαχειριστή της συσκευής μέσω του πακέτου λογισμικού Material Witness (v.2.02, Liveco Inc, Burlington, VT, ΗΠΑ), για την αποθήκευση των δεδομένων. Αγκιστροειδείς λαβές χρησιμοποιήθηκαν για την τοποθέτηση των δειγμάτων δακτυλίου και τις παράλληλες πλάκες για τα δείγματα λωρίδας. Μικρά τεμάχια χαρτιού αντιολισθητικά προσαρτήθηκαν στις εσωτερικές επιφάνειες των συγκρατημάτων παράλληλης πλάκας, παρέχοντας έτσι επαρκή τριβή για να αποφευχθεί η ολίσθηση του δείγματος. Το μη φορτωμένο μήκος των δειγμάτων ελήφθη ρυθμίζοντας κατακόρυφα την άνω λαβή για να καταγράψει μόνο το βάρος τους και πιστοποιήθηκε από την απουσία διπλώματος δείγματος (Εικόνα 13). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ένα σταδιακά αυξανόμενο φορτίο εφελκυσμού με ρυθμό 10 $\mu\text{m} / \text{s}$ μέχρι την πλήρη ρήξη του τοιχώματος, όπως και σε προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (Sokolis et al., 2005, Sokolis, 2010). Η συγχρονισμένη έξοδος από τη μονάδα φορτίου και τον περιστροφικό κωδικοποιητή μεταδόθηκε στον συνοδευτικό υπολογιστή με συχνότητα δειγματοληψίας 50 Hz. Οι ιδιότητες του ιστού και στις δύο κατευθύνσεις εξετάστηκαν για να προσδιοριστούν οι διαφορές που εξαρτώνται από την κατεύθυνση.



Εικόνα 13 (Α,Β,Γ,Δ): Απεικόνιση των εσοχών του μηχανήματος Vitrodyne V1000 Universal Tester, των λωρίδων τραχείας σε αρχική θέση τοποθέτησης (Α), σε πλήρη έκταση (Β) και των χόνδρινων δακτυλίων σε πλευρική και μετωπική πλευρά (Γ,Δ).

8.7.3. Επεξεργασία εμβιομηχανική δεδομένων

Το Stretch υπολογίστηκε ως ο λόγος του μήκους του δείγματος σε κάθε φορτίο μέχρι το μη φορτωμένο μήκος και το στέλεχος ως τέντωμα μείον ένα. Η τάση υπολογίστηκε διαιρώντας το προϊόν του φορτίου και τεντώνοντας την έκτασή του χωρίς εκφόρτωση, υποθέτοντας ότι δεν συμπιέζεται ο ιστός. Τα δεδομένα τάσης-

παραμόρφωσης καταγράφηκαν με πολυώνυμα 9ης τάξης, δίδοντας συντελεστές συσχέτισης $r > 0,95$ και το ελαστικό μέτρο (εφαπτομένη) σε κάθε επίπεδο στελέχους υπολογίστηκε ως το πρώτο παράγωγο της τάσης έναντι του στελέχους. Η τάση αστοχίας (Σ_f), που αντιπροσωπεύει την αντοχή του ιστού, και η παραμόρφωση αστοχίας (λ_f) που αντιπροσωπεύει την εκτασιμότητα, υπολογίστηκαν ως οι μέγιστες τιμές τάσης και παραμόρφωσης κατά τη ρήξη. Το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (λ_p), που αντιπροσωπεύει τη μέγιστη δυσκαμψία των ιστών, υπολογίστηκε ως η υψηλότερη τιμή ελαστικού μέσου (M_p) πριν τη ρήξη. Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν ημι-αυτόματα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Mathematica (v.9.0, Wolfram Research Inc, Boston, MA, ΗΠΑ).

8.7.4. Στατιστική Ανάλυση

Το unpaired Student's t-test χρησιμοποιήθηκε για συγκρίσεις των βιομηχανικών παραμέτρων μεταξύ των αποκυτταροποιημένων και εγγενών τραχειών που, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των κατευθύνσεων αξιολογήθηκαν με το paired t-test χρησιμοποιώντας το Microcal Origin (v.9.0, OriginLab® Corp., Northampton, MA, ΗΠΑ).

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Πειραματική συσκευή (VITRODYNE V1000 UNIVERASL TESTER)
- Κάμερα Leica DFC500 (LEICA MICROSYSYSTEMS GmbH)
- Στερεοσκόπιο Nikon SMZ800 (NIKON INSTRUMENTS EUROPE BV)
- Πρόγραμμα Image-Pro Plus v.4.5 (MEDIA CYBERNETICS Inc)
- Κυψελίδα φορτίου (GSO-250, TANSDUCER TECHNIQUES)
- Πηνίο θερμαντήρα (1130A, PolyScience)
- Πακέτο λογισμικού Material Witness (v.2.02, LIVECO Inc)
- Πρόγραμμα Mathematica (v.9.0, WOLFRAM RESEARCH Inc)
- Microcal Origin (v.9.0, OriginLab® Corp.)
- Ιστός τραχείας
- Απεσταγμένο νερό dH₂O
- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- Τρυβλία καλλιέργειας (COSTAR)

- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- Eppendorf (KISKER BIOTECH GmbH & Co)
- Χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)

8.8 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των υλικών αποκυτταροποίησης

Στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκε σημαντικό να εξεταστεί η κυτταροτοξικότητα των αποκυτταροποιημένων ιστών. Ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε για αποκυτταροποιημένες τραχείες προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο τα χημικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αποκυτταροποίηση προκαλούν κάποιου είδους κυτταροτοξικότητα σε παρακείμενους ιστούς ή κύτταρα. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκαν αποκυτταροποιημένες τραχείες και μεσεγχυματικά κύτταρα για καλλιέργεια (MSCs).

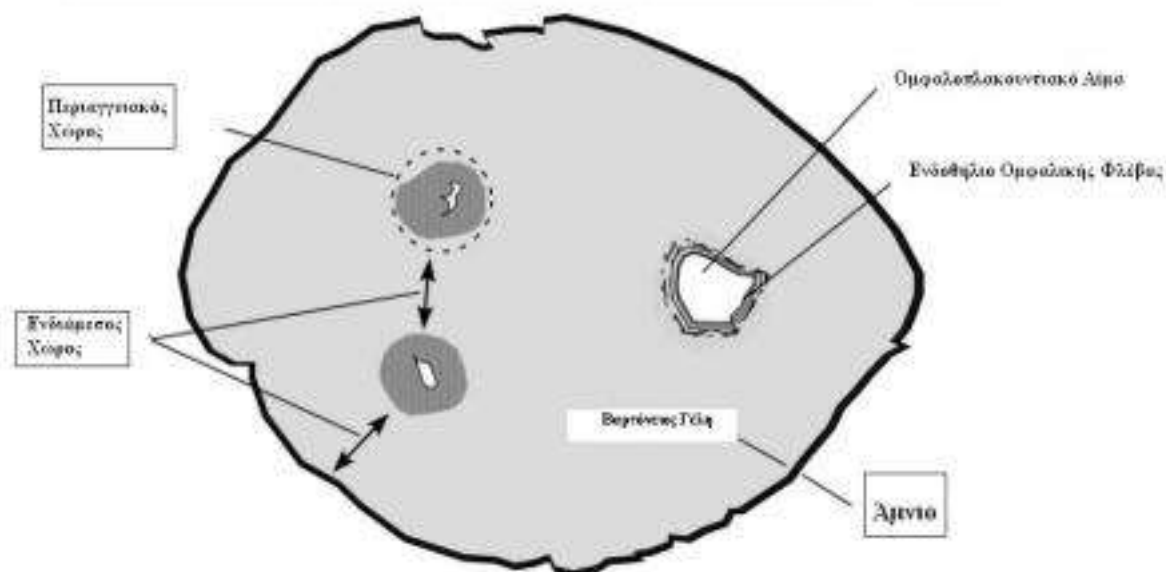
Συγκεκριμένα, για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης πραγματοποιήθηκαν δυο δοκιμές. Η πρώτη αφορούσε στην άμεση επαφή των κυττάρων με την αποκυτταροποιημένη τραχεία και η δεύτερη στο μεταβολισμό ATP των κυττάρων. Για την πραγματοποίηση του τεστ χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα ομφαλίου λώρου (WJ MSCs).

8.8.1 Απομόνωση ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων (hMSCs)

Η απομόνωση των MSCs μπορεί να πραγματοποιηθεί από διάφορες πηγές όπως προαναφέρθηκε. Στην παρούσα διατριβή, τα MSCs απομονώθηκαν από ομφάλιο λώρο μετά από ενημερωμένη, έγγραφη συγκατάθεση από τις μητέρες. Οι συλλογές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα ηθικά πρότυπα της Ελληνικής Εθνικής Επιτροπής Ηθικής και εγκρίθηκαν από το ηθικό συμβούλιο του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (I.IB.E.A.A).

Ο ομφάλιος λώρος αποτελεί πλούσια πηγή hMSCs. Αποτελείται από 2 αρτηρίες και μια φλέβα ενώ στον ενδιάμεσο χώρο των αγγείων υπάρχει μια περιοχή με ζελατινώδες υλικό που αποτελεί τη βαρτόναιο γέλη (Wharton-Jelly) όπου βρίσκονται πληθυσμοί των hMSCs σε μεγάλη συγκέντρωση (Εικόνα 14) (Troyer.2008).

ΜΕΡΗ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ MSCs



Εικόνα 14: Απεικόνιση ομφαλίου λώρου.

Έπειτα από την παραλαβή των ομφάλιων λώρων η διαδικασία ακολουθήθηκε ως εξής:

- Πλύσιμο του ιστού με PBS (1x) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αίματος
- Λήψη ενός μικρού τμήματος ομφαλίου ~3cm και μεταφορά σε ένα μεγάλο τρυβλίο.
- Κόψιμο και τριμμάρισμα του συγκεκριμένου τμήματος ομφαλίου σε κομμάτια 2-3 mm³
- Τοποθέτηση των θραυσμάτων του ομφαλίου σε τρυβλίο 6 οπών
- Προσθήκη 1,5 ml καλλιεργητικού μέσου ανάπτυξης (α-MEM, 15% FBS, penicillin, streptomycin)
- Τοποθέτηση σε κλίβανο με 37⁰C και 5%CO₂.
- Αναμονή της καλλιέργειας μέχρι την εμφάνιση επαρκούς αριθμού προσκολλημένων κυττάρων και την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας των οπών.

Η ανάπτυξη των MSCs πραγματοποιήθηκε αρχικά σε τρυβλίο 6 οπών και στη συνέχεια σε ειδικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας, στην επιφάνεια των οπίων παρατηρήθηκε η προσκόλλησή τους. Γενικά, τα MSCs σχηματίζουν αποικίες που μορφολογικά μοιάζουν με αυτές των ινοβλαστών. Σε κυτταρικό επίπεδο, χαρακτηρίζονται από μικρό κυτταρικό σώμα όπου περιέχει μεγάλο κυκλικό πυρήνα με διακριτό πυρινίσκο, ο οποίος περιβάλλεται από λεπτά διασκορπισμένα χρωματινικά σωματίδια στα οποία οφείλεται η καθαρή εμφάνιση του πυρήνα.

8.8.2 Πλύσιμο μεσεγγυματικών κυττάρων (MSCs)

Έπειτα από κάποιες ημέρες καλλιέργειας των κυττάρων είναι απαραίτητη η διαδικασία πλυσίματος των κυττάρων προκειμένου να ρυθμιστούν οι συνθήκες καλλιέργειας. Η διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Απόρριψη του καλλιεργητικού μέσου από το τρυβλίο
- Προσθήκη 1ml PBS (1x) σε κάθε πηγάδι
- Ανάδευση του τρυβλίου για 1min
- Απόρριψη του PBS (1x) και απομάκρυνση όλης της εναπομείναντος ποσότητας.
- Προσθήκη 1,5 ml καλλιεργητικού μέσου ανάπτυξης (a-MEM, 15% FBS, penicillin, streptomycin)
- Τοποθέτηση σε κλίβανο με 37⁰C και 5%CO₂.

8.8.3 Ανακαλλιέργεια μεσεγγυματικών κυττάρων (MSCs)

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όταν στην καλλιέργεια παρατηρήθηκε επαρκής αριθμός προσκολλημένων κυττάρων και πλήρης κάλυψη των επιφανειών του τρυβλίου. Σκοπός της ανακαλλιέργειας ήταν να καλλιεργηθούν τα κύτταρα σε φλάσκα μεγαλύτερης επιφάνειας ώστε να δοθεί επαρκής χώρος για επιπλέον ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Απόρριψη του καλλιεργητικού μέσου από το τρυβλίο
- Προσθήκη 1ml PBS (1x) σε κάθε πηγάδι
- Ανάδευση του τρυβλίου για 1min

- Απόρριψη του PBS (1x) και απομάκρυνση όλης της εναπομείνουσας ποσότητας.
- Προσθήκη 300μl θρυψίνης (0.05% Trypsin- EDTA 1x) σε κάθε οπή του τρυβλίου
- Μεταφορά του τρυβλίου σε κλίβανο με 37⁰C και 5%CO₂ για 10 min.
- Ανακίνηση του τρυβλίου και παρατήρηση στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα έχουν ξεκολλήσει.
- Προσθήκη ίσης ποσότητας καλλιεργητικού μέσου ανάπτυξης (α-MEM, 15% FBS, penicillin, streptomycin) σε κάθε οπή του τρυβλίου
- Ανάδευση και αναρρόφηση όλης της ποσότητας.
- Προσθήκη των κυττάρων σε φλάσκα
- Τοποθέτηση σε κλίβανο με 37⁰C και 5%CO₂.
- Αναμονή της καλλιέργειας μέχρι την εμφάνιση επαρκούς αριθμού προσκολλημένων κυττάρων και την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας.

8.8.4 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας με τεστ επαφής- Δοκιμασία Α

Για το τεστ επαφής, χρησιμοποιήθηκαν αποκυτταροποιημένες τραχείες (n=3) και ανθρώπινα μεσεγχοματικά κύτταρα. Για την εφαρμογή της δοκιμής πραγματοποιήθηκαν 3 διαφορετικές καλλιέργειες με WJ MSCs:

- 1) προσθήκη μόνο καλλιεργητικού υλικού (α-MEM, 15% FBS, penicillin, streptomycin) ως αρνητικός έλεγχος,
- 2) προσθήκη καλλιεργητικού υλικού και αποκυτταροποιημένου ιστού τραχείας
- 3) προσθήκη καλλιεργητικού υλικού με 10% DMSO για πρόκληση τοξικότητας και χρήση του ως θετικός έλεγχος.

Τα δείγματα παρέμειναν στον κλίβανο στους 37⁰C, 5% CO₂ για 24 ώρες και έπειτα αξιολογήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων.

8.8.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας –Δοκιμασία Β

Για τον συγκεκριμένο έλεγχο υπολογίστηκε ο μεταβολισμός του ATP των κυττάρων. Για τον έλεγχο του μεταβολισμού ATP των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Sigma-Aldrich, Germany) και

πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων με αποκυτταροποιημένες τραχείες (n=5).

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο που σχηματίζεται αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Είναι ένα μόριο υψηλής ενέργειας που περιγράφεται ως «ενεργειακό νόμισμα» σε όλα τα ζωντανά συστήματα. Η χημική ενέργεια που περιέχεται στον φωσφορικό δεσμό των ATP κινεί τις περισσότερες κυτταρικές διεργασίες (Mitchell, 1961; Alirol et al., 2006). Το ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit είναι μια ευαίσθητη δοκιμή για τον προσδιορισμό του ATP σε διάφορα δείγματα που κυμαίνεται από 2-10 nmole / οπή για τη χρωματομετρική δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Η συγκέντρωση ATP προσδιορίζεται με φωσφορυλίωση της γλυκερόλης, με αποτέλεσμα ένα χρωματομετρικό (570 nm) προϊόν ανάλογο με την ποσότητα του ATP που υπάρχει.



Προετοιμασία καλλιιεργειών για έλεγχο

Για τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSCs). Συγκεκριμένα:

- Αφυδάτωση του ιστού τραχείας για απομάκρυνση της περίσσειας υγρού
- Ζύγισμα του ιστού (50-100 mg)
- Πολύ καλό κόψιμο της τραχείας με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων
- Προσθήκη της τραχείας σε eppendorf με α -MEM και πρωτεΐνωση K 1mg/ml.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 55⁰C για όλη τη διάρκεια της νύχτας
- Αδρανοποίηση του ενζύμου με προσθήκη δείγματος στους 95⁰C για 5 λεπτά, εφόσον έχει πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της τραχείας
- Στην περίπτωση που δεν έχει πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της τραχείας, τότε προσθήκη επιπλέον 1mg/ml πρωτεΐνωσης K.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια της ομογενοποιημένης αποκυτταροποιημένης τραχείας με MSCs και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 37⁰C, 5% CO₂ μέχρι την πλήρη ανάπτυξή τους οπότε και αξιολογήθηκαν. Ως αρνητικός έλεγχος, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες που περιείχαν μόνο WJ-MSCs με καλλιιεργητικό μέσο.



Προετοιμασία διαλυμάτων

- **ATP Assay Buffer:** έτοιμο προς χρήση.
- **ATP Probe:** έτοιμο προς χρήση.
- **ATP Converter and Developer Mix:** πραγματοποιείται ανασύσταση με 220μl από το ATP Assay Buffer και πολύ καλή ανάδευση.
- **ATP Standard:** πραγματοποιείται ανασύσταση με 100μl νερό για τη δημιουργία 10nM ATP Standard Solution.



Πρότυπη καμπύλη

- Αραίωση 10μl από το 10Mm (10nmole/μl) ATP Standard Solution με 90μl νερό ώστε να προετοιμαστεί συγκέντρωση του ATP Standard Solution 1Mm(1nmole/μl).
- Προσθήκη 0,2,4,6,8 και 10 μl από το ATP Standard Solution 1Mm (1nmole/μl) σε τρυβλίο 96 οπών ώστε να παραχθεί συγκέντρωση 0 (blank), 2, 4, 6, 8 και 10 nmole/πηγάδι πρότυπου διαλύματος.
- Προσθήκη ATP Assay Buffer σε κάθε οπή μέχρι τα 50μl.



Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα των κυττάρων προετοιμάστηκαν πριν τη δοκιμή ελέγχου της κυτταροτοξικότητας και σε σύντομο χρόνο ώστε να αποφευχθεί η κατανάλωση του ATP από ένζυμα. Συγκεκριμένα:

- Απόρριψη του καλλιεργητικού μέσου από το τρυβλίο
- Προσθήκη 1ml PBS (1x) σε κάθε πηγάδι
- Ανάδευση του τρυβλίου για 1min
- Απόρριψη του PBS (1x) και απομάκρυνση όλης της εναπομείνουσας ποσότητας.
- Προσθήκη 300μl θρυψίνης (0.05% Trypsin- EDTA 1x) σε κάθε οπή του τρυβλίου
- Μεταφορά του τρυβλίου σε κλίβανο με 37⁰C και 5%CO₂ για 10 min.
- Ανακίνηση του τρυβλίου και παρατήρηση στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα έχουν ξεκολλήσει.
- Μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer.

- Λύση κυττάρων (1×10^6) με την προσθήκη 100μl ATP Assay Buffer.



Δοκιμή ελέγχου κυτταροτοξικότητας

- Προετοιμασία του Colorimetric Reaction Mix. Για κάθε οπή χρειάστηκαν 50μl.

Reagent	Samples and Standards	Sample Blank
ATP Assay Buffer	44 μl	46 μl
ATP Probe	2 μl	2 μl
ATP Converter	2 μl	-
Developer Mix	2 μl	2 μl

- Προσθήκη 50μl Colorimetric Reaction Mix σε κάθε οπή
- Πολύ καλή ανάδευση
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά
- Υπολογισμός απορρόφησης στα 570nm (A_{560}).

Τα σήματα των δειγμάτων μπορούν να παραμείνουν σταθερά για 2 ώρες.

*Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές με την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων δείγματος κυττάρων κάθε φορά. Η τελική ποσότητα επιλέχθηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης και ήταν 50μl δείγματος.

8.8.6 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας

Για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας του αποκυτταροποιημένου ικρίώματος τραχείας αξιολογήθηκε η μορφολογία των κυττάρων, η ζωτικότητα και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

8.8.6.1 Προσδιορισμός ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων-Cell Doubling Time (CDT)

Έπειτα από κάθε καλλιέργεια, υπολογίστηκε για κάθε δείγμα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων (CDT). Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για τον διπλασιασμό των κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια.

$$CDT = t / \{ \log_{10} (N/N_0) \times 3,32 \}$$

T= χρόνος σε ώρες

N= τελικός αριθμός κυττάρων

N₀= αρχικός αριθμός κυττάρων

3,32= σταθερά

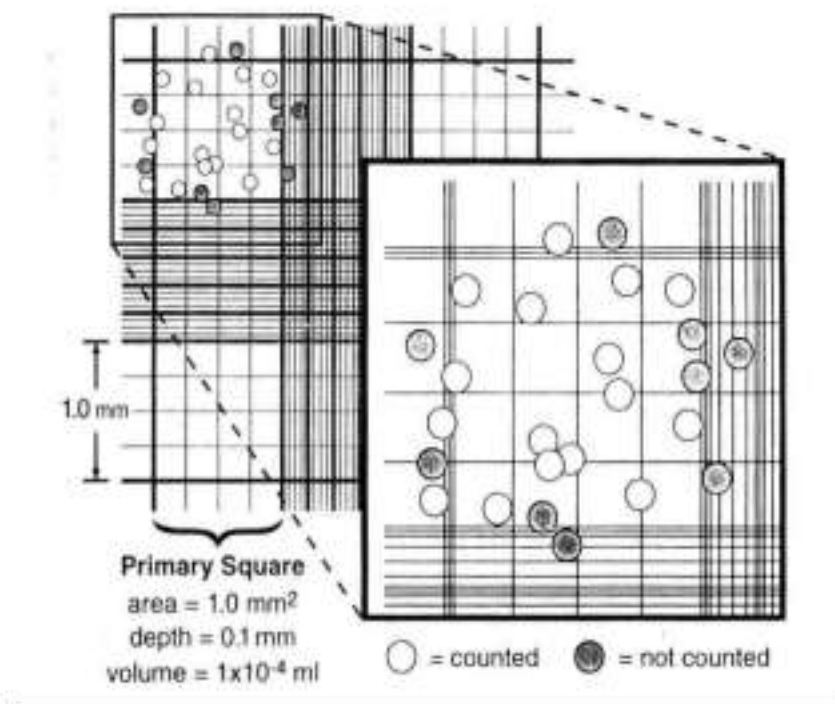
Ο αριθμός των κυττάρων και η ζωτικότητα πραγματοποιήθηκε με πλάκα Neubauer ενώ η αξιολόγηση της μορφολογίας έγινε με την μικροσκόπησή τους.

8.8.7 Μέτρηση κυττάρων με πλάκα Neubauer

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε πλάκα Neubauer και παρατήρηση τους σε ορθό οπτικό μικροσκόπιο LEICA DM LS2 με τη χρήση χρωστικής Trypan blue 0,4% w/v. Τα κύτταρα που οδηγούνται σε απόπτωση παρουσιάζουν κάποιες αλλοιώσεις στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη. Η Trypan blue διαπερνά τις αλλοιωμένες κυτταροπλασματικές μεμβράνες με αποτέλεσμα τα αποπτωτικά κύτταρα να χρωματίζονται. Η διαδικασία της μέτρησης είναι ως εξής:

- Προσθήκη 10μl Trypan blue σε 10μl δείγματος κυττάρων
- Πολύ καλή ανάδευση
- Μεταφορά του αναμειγμένου δείγματος σε ειδική πλάκα Neubauer
- Κάλυψη με καλυπτρίδα για την ισοκατανομή του δείγματος στην πλάκα Neubauer μέσω τριχοειδικών φαινομένων.
- Μέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στα 4 μεγάλα γωνιακά τετράγωνα (Εικόνα 15). Για τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων δεν υπολογίστηκε ο αριθμός των χρωματισμένων κυττάρων διότι ήταν αποπτωτικά. Ο συνολικός αριθμός υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο: Συγκέντρωση κυττάρων = αριθμός κυττάρων x 10000/ 4 (αριθμός τετραγώνων) και ο απόλυτος αριθμός υπολογίστηκε με αναγωγή της ποσότητας του όγκου.



Εικόνα 15: Απεικόνιση της πλάκας Neubauer

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Ιστός τραχείας
- ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (SIGMA-ALDRICH)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (BIOAIR)
- Eppendorf (KISKER BIOTECH GmbH & Co)
- Πιπέττες (GREINER)
- Vortex (Heidolph Reax)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)
- 96 well plate (COSTAR)
- Centrifuge 5417R (EPPENDORF)
- Μηχάνημα SPECTROstar Nano (BMG LABTECH)
- Πρωτεΐνάση K (SIGMA-ALDRICH)
- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- dH₂O
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)

- Διάλυμα α-MEM (GIBCO)
- FBS (GIBCO)
- Penicillin-Streptomycin 1000 U/ml (GIBCO)
- Ιστός ομφάλιου λώρου
- Επωαστικός κλίβανος (THERMOSCIENTIFIC)
- Ένζυμο θρυψίνης (GIBCO)
- Μηχάνημα αναρρόφησης (aspirator) (GILSON)
- Τρυβλία καλλιέργειας (GREINER)
- Μικροσκόπιο LEICA DM LS2 (LEICA)
- DMSO (WAK-CHEMIE GmbH)
- Πλάκα Neubauer
- Χρωστική Trypan blue (SIGMA-ALDRICH)
- Φλάσκες καλλιέργειας (ORANGE)

8.9 Έλεγχος βιοσυμβατότητας και επανακυτταροποίησης του αποκυτταροποιημένου ιστού *in vivo*

Σκοπός της αποκυτταροποίησης ενός ιστού είναι η απομάκρυνση των πυρηνικών και κυτταρικών στοιχείων ενώ παράλληλα η διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επίσης, είναι πολύ σημαντικό τα χημικά στοιχεία των υλικών αποκυτταροποίησης να μην είναι κυτταροτοξικά για τον οργανισμό. Έπειτα από την ιστολογική, ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση της επίτευξης των παραπάνω, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τη βιοσυμβατότητα του αποκυτταροποιημένου ιστού της τραχείας με μεταμόσχευση σε αλλογενές ζωικό πρότυπο. Η ανοσολογική απάντηση που μπορεί να προκαλέσει ένα ικρίωμα θεωρήθηκε μια σημαντική παράμετρος που έπρεπε να εξεταστεί για την περαιτέρω αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης. Επιπλέον, θεωρήθηκε σημαντικό να ελεγχθεί αν ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαντιδραστήρας ώστε να επανακυτταροποιηθεί ο ιστός. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν επίμυες D/A και Sprague Dawley. Αποτελέσματα των μέχρι τώρα ερευνών έχουν δείξει την πιθανότητα ο επίμυς να αποτελεί πρότυπο μεταμόσχευσης τραχείας για την αξιολόγηση των αποκυτταροποιημένων μοσχευμάτων και προτείνεται αυτό το μοντέλο ως αξιόπιστη προκλινική πλατφόρμα για έρευνα. Η χρήση αυτού του ζωϊκού προτύπου επιτρέπει

στη διαδικασία να είναι οικονομική και αποτελεσματική. Το πρότυπο αυτό επιτρέπει τον έλεγχο ειδικών γονιδίων για την αξιολόγηση τους επούλωσης και αποκατάστασης του τραχειακού μοςχεύματος (Kutten et al., 2014).

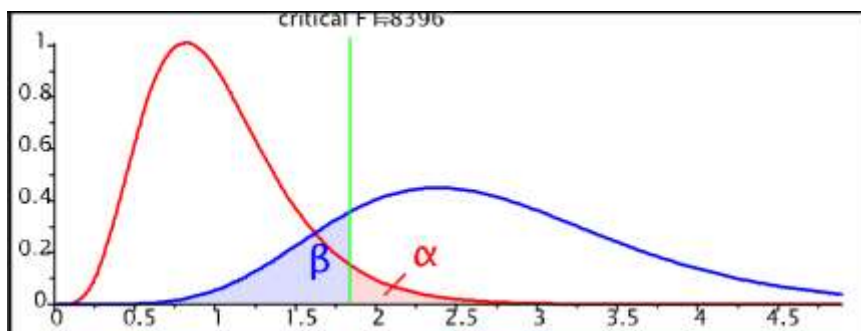
Συνολικός αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκαν – τεκμηρίωση βάσει στατιστικής ανάλυσης

Χρησιμοποιήθηκαν 16 επίμυες Sprague Dawley και 16 επίμυες DA τους ηλικίας και σωματικού βάρους. Τα ζωικά πρότυπα χωρίστηκαν σε 2 διαφορετικές ομάδες.

- 1) **Ομάδα Α:** Περιελάμβανε 8 επίμυες DA από τους οποίους απομονώθηκε η τραχεία και 8 επίμυες Sprague Dawley τους οποίους μεταμοσχεύθηκε η μητρική τραχεία χωρίς καμιά επεξεργασία (DA/Sprague Dawley)
- 2) **Ομάδα Β:** Περιελάμβανε 8 επίμυες DA από τους οποίους απομονώθηκε η τραχεία και 8 επίμυες Sprague Dawley τους οποίους μεταμοσχεύθηκε η αποκυτταροποιημένη τραχεία (DA dec/ Sprague Dawley)

Η ομάδα Α αποτέλεσε το μάρτυρα θετικού ελέγχου ενώ η ομάδα Β αποτέλεσε το δείγμα ελέγχου μας για την ανοσολογική απόκριση και τον έλεγχο επανακυτταροποίησης.

Παρακάτω απεικονίζεται το Power Analysis το οποίο έγινε με το πρόγραμμα G*Power 3.1.9.2.



F tests – ANOVA: Repeated measures, within-between interaction

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input:	Effect size f	= 0.25 (Moderate Effect Size)
	α err prob	= 0.05
	Power ($1-\beta$ err prob)	= 0.8
	Number of groups	= 2
	Number of measurements	= 5
	Corr among rep measures	= 0.5
	Nonsphericity correction ϵ	= 1
Output:	Noncentrality parameter λ	= 20.0000000
	Critical F	= 1.8395994
	Numerator df	= 12.0000000
	Denominator df	= 112
	Total sample size	= 16 (8 animals/group)
	Actual power	= 0.8252087

8.9.1. Ζωικά πρότυπα

Ο επίμυς (*Rattus norvegicus*) προέρχεται από τον άγριο αρουραίο. Είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ζώα εργαστηρίου στη βιοϊατρική έρευνα. Σήμερα, υπάρχουν περίπου 50 φυλές (Weihe, 1987). Οι αμιγείς φυλές επιμύων (400) είναι λιγότερες σε σχέση με εκείνες των μυών. Από αυτές, πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι F344, M520, LEW και WAG (Γαλακτίδου, 1993).

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι φυλές DA και Sprague Dawley. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες αρσενικοί επίμυες DA βάρους 220-300gr

για την αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης και αρσενικοί επίμυες Sprague Dawley ηλικίας 4-6 εβδομάδων ως λήπτες για τα χειρουργεία εμφύτευσης.

Ο επίμυς χρησιμοποιείται κυρίως σε έρευνες που αφορούν τη διατροφή και το μεταβολισμό, την ενδοκρινολογία, τη γεροντολογία, τον καρκίνο, τις μεταμοσχεύσεις, τη δημιουργία νέων φαρμάκων, τη μικροχειρουργική, τη γναθοχειρουργική, τη νευροφυσιολογία, την πειραματική φυσιολογία, την τοξικολογία, τη βιοχημεία και τη ψυχολογία.

Οι επίμυες είναι φιλικά ζώα όταν δέχονται ήπιους χειρισμούς. Οι τακτικοί χειρισμοί τα κάνουν ακόμη πιο φιλικά προς τον άνθρωπο. Έχουν συνήθως περιέργεια και τάση προς εξερεύνηση του γύρω χώρου. Θεωρούνται νυκτόβια ζώα δεδομένου ότι αναπτύσσουν δραστηριότητα κατά τις νυκτερινές κυρίως ώρες. Ωστόσο, η όρασή τους δεν είναι καλή.

Η ανατομία και η φυσιολογία του επίμου μοιάζουν σε γενικές γραμμές με εκείνες του μυ. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες ιδιαιτερότητες. Οι επίμυες σε αντίθεση με τους μύες δεν έχουν χοληδόχο κύστη. Τα επινεφρίδιά τους βρίσκονται μακριά από τα κεντρικά αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που κάνει την επινεφριδεκτομή λιγότερο επικίνδυνη στο είδος αυτό. Στον έσω κανθό του οφθαλμού τους υπάρχει ο αδένας του Harder. Πρόκειται για τροποποιημένο δακρυϊκό αδένα, ο οποίος παράγει εκκρίσεις πλούσιες σε πορφυρίνη που λιπαίνουν τον οφθαλμό. Σε καταστάσεις στρες παρατηρείται αύξηση της παραγωγής του εκκρίματός του με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικής κόκκινης κηλίδας κάτω από τα μάτια.

Το σωματικό βάρος των ενήλικων επιμύων είναι 300-500 gr των αρσενικών και 250-300 gr των θηλυκών. Έχουν διάρκεια ζωής 2-3 χρόνια. Η θερμοκρασία του σώματός τους είναι 37,5-38,5^oC και ρυθμίζεται με τη βοήθεια ιδρωτοποιών αδένων που βρίσκονται στην πελμα-τιαία επιφάνεια του άκρου ποδός, καθώς και με διαστολή των αγγείων της ουράς. Ο καρδιακός ρυθμός είναι 300-500 καρδιακοί παλμοί / min και ο αναπνευστικός 70-110 αναπνοές/min (Havenaar et al, 1993). Ο επίμυς ενηβώνεται σε ηλικία 6-8 εβδομάδων, αλλά οδηγείται σε σύζευξη σε ηλικία 12- 16 εβδομάδων (ή όταν το θηλυκό φτάσει τα 250 gr Σ.Β. και το αρσενικό τα 300 gr). Η διάρκεια της αναπαραγωγικής δραστηριότητας των επιμύων είναι 12-18 μήνες. Οι ωοθηκικοί κύκλοι εκδηλώνονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (πολυοιστρικό ζώο) και διαρκούν 4-5 ημέρες, ενώ το στάδιο του οίστρου 14 ώρες. Χαρακτηριστικά συμπτώματα του οίστρου είναι η υπερβολική κινητικότητα του ζώου, το τρεμούλιασμα των αυτιών του και η λήψη στάσης ζευγαρώματος. Αξίζει να

σημειωθεί ότι για τη φυσιολογική εκδήλωση της αναπαραγωγικής δραστηριότητας η φωτοπερίοδος θα πρέπει να διαρκεί 12-16 ώρες. Παρατεταμένη έκθεση σε φως, π.χ. για 3 συνεχείς ημέρες, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή μείωση της γονιμότητας. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, είναι δυνατή η διάγνωση της εγκυμοσύνης από την 9η ημέρα με τη μέθοδο της υπερηχοτομογραφίας (Ypsilantis et al, 2009). Η εγκυμοσύνη διαρκεί 21-23 ημέρες, εκτός εάν κατά τη διάρκεια της η μητέρα γαλουχεί, γεγονός που παρατείνει την εγκυμοσύνη κατά 3-7 ημέρες. Σε κάθε τοκετό γεννιούνται 6-12 νεογέννητα βάρους 5 gr το καθένα. Η γαλουχία διαρκεί 21 ημέρες. Οι επίμυες διατηρούνται σε κλουβιά ομαδικά, εκτός εάν το πειραματικό πρωτόκολλο απαιτεί την ατομική τους στέγαση. Δεδομένου ότι ο επίμυς είναι λιγότερο επιθετικός από το μυ, τα αρσενικά μπορούν να σταβλιστούν ομαδικά, αρκεί να ανήκουν στην ίδια τοκετομάδα. Τα κλουβιά των επιμύων είναι κατά κανόνα πλαστικά (πολυανθρακικά). Το δάπεδό τους είναι συμπαγές με στρωμένη ή σχαρωτό.

8.9.2 Χειρουργεία εμφύτευσης και παρακολούθηση ζωικών προτύπων

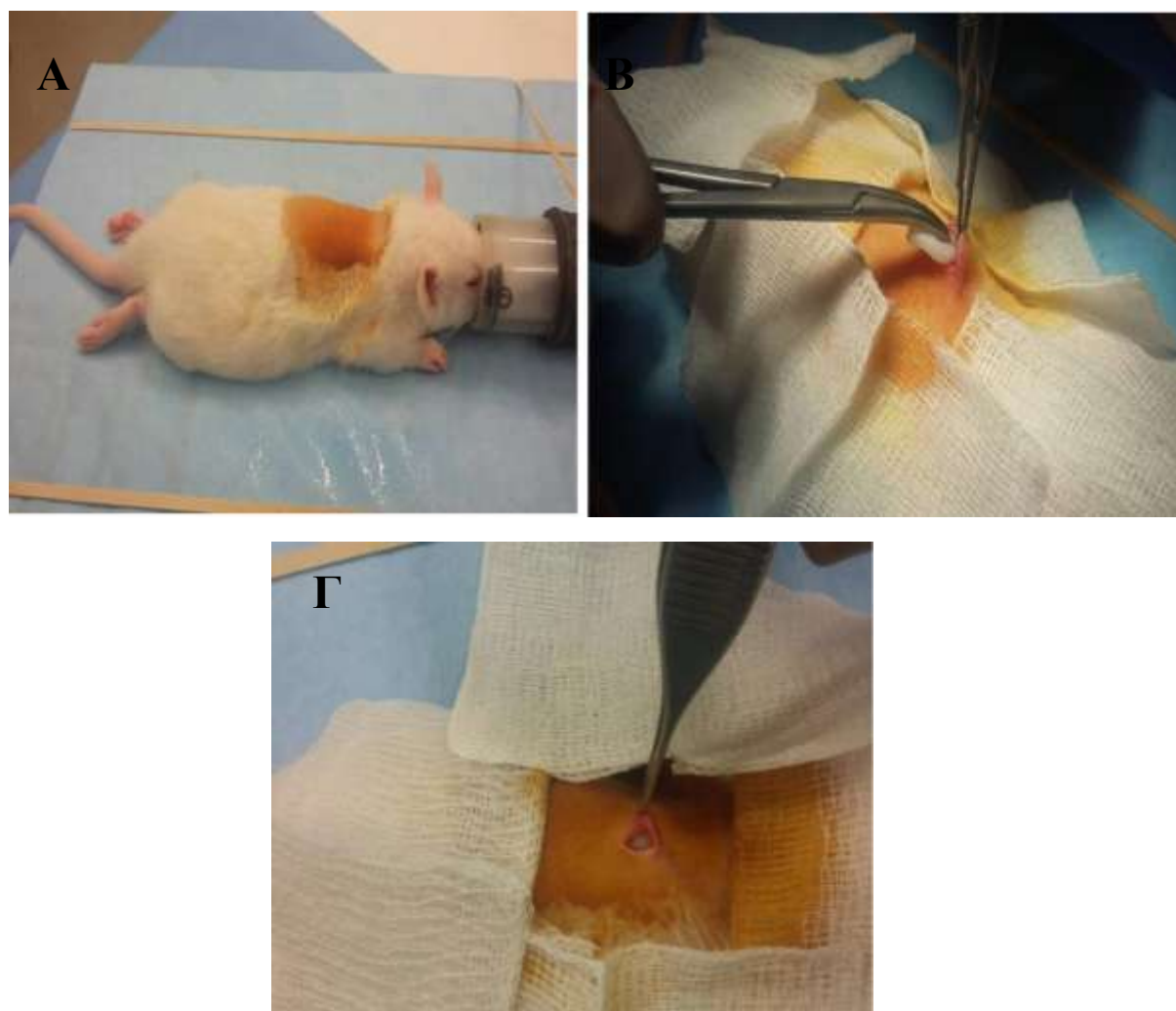
Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A). Η εγκατάσταση λειτουργεί σύμφωνα με τις διατάξεις του προεδρικού διατάγματος 160/91 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς, σε συμμόρφωση με την οδηγία 86/609 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και είναι εγκεκριμένη από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Νομαρχίας Αθηνών. Η μονάδα εφαρμόζει πρόγραμμα υγειονομικής επιτήρησης βάσει των οδηγιών της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας των Εταιριών Ζώων Εργαστηρίου (Federation for European Laboratory Animal Science Associations-FELASA). Ο χειρισμός των ζώων έγινε σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, καθώς και τις σχετικές οδηγίες του Εθνικού Συμβουλίου Έρευνας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (National Research Council.1996). Τα χειρουργεία για την εμφύτευση του ιστού πραγματοποιήθηκε εντός της μονάδας των χειρουργείων της Πειραματικής Χειρουργικής.

Πραγματοποιήθηκε εμφύτευση αλλογενούς ιστού τραχείας, αποκυτταροποιημένου και εγγενούς στις 2 ομάδες επίμυων όπως προαναφέρθηκε. Τα τμήματα, πριν μεταμοσχευθούν, μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν φυσιολογικό ορό (water fon injection -WFI).

Οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν με πτητικό αναισθητικό sevoflurane 4%. Το τρίχωμα της ράχης απομακρύνθηκε με ξύρισμα και η περιοχή απολυμάνθηκε με διάλυμα ιωδίου. Με αποστειρωμένο νυστέρι μιας χρήσεως, έγινε τομή στη μεσότητα της ράχης όπου υποδόρια εμφυτεύθηκε ο στός της τραχείας. Μετά την τοποθέτηση του ιστού έγινε συρραφή της τομής και τα ζώα χωρίστηκαν σε ομάδες και τοποθετήθηκαν σε ατομικά αεριζόμενους κλωβούς Euro standard type II L (H-Temp, Techniplast, Milan, Italy).

Ο χρόνος παραμονής, παρακολούθησης και καταμέτρησης βάρους των επίμυων διήρκησε 1 μήνα. Τα ζώα τοποθετήθηκαν σε ατομικά αεριζόμενους κλωβούς, με 70 αλλαγές αέρα την ώρα κάτω από θετική πίεση. Στεγάζονταν σε θαλάμους με θερμοκρασία δωματίου 22⁰C, σε σχετική υγρασία 55%, με δωδεκάωρη εναλλαγή φωτός/σκότους, ένταση 300 Lux μετρημένη στο κέντρο του δωματίου και σε απόσταση 1 μέτρου από το δάπεδο.

Χρησιμοποιήθηκε τροφή σε μορφή pellets, ακτινοβολημένη και συσκευασμένη σε κενό αέρα (Tekland 2018, Harlan, Italy). Η χορήγηση του νερού γινόταν σε πλαστικά (polycarbonate) μπουκάλια χωρητικότητας 500ml (Techniplast, Italy). Η κατανάλωση τροφής και νερού *ad libitum*. Σε κάθε κλουβί είχαν τοποθετηθεί περίπου 300 gr στρωμνής τύπου corncob (Rehofix MK 2000, J.Rettenmaier & So Rosenberg, Germany). Η αλλαγή των κλωβών και της στρωμνής γινόταν μια φορά την εβδομάδα.

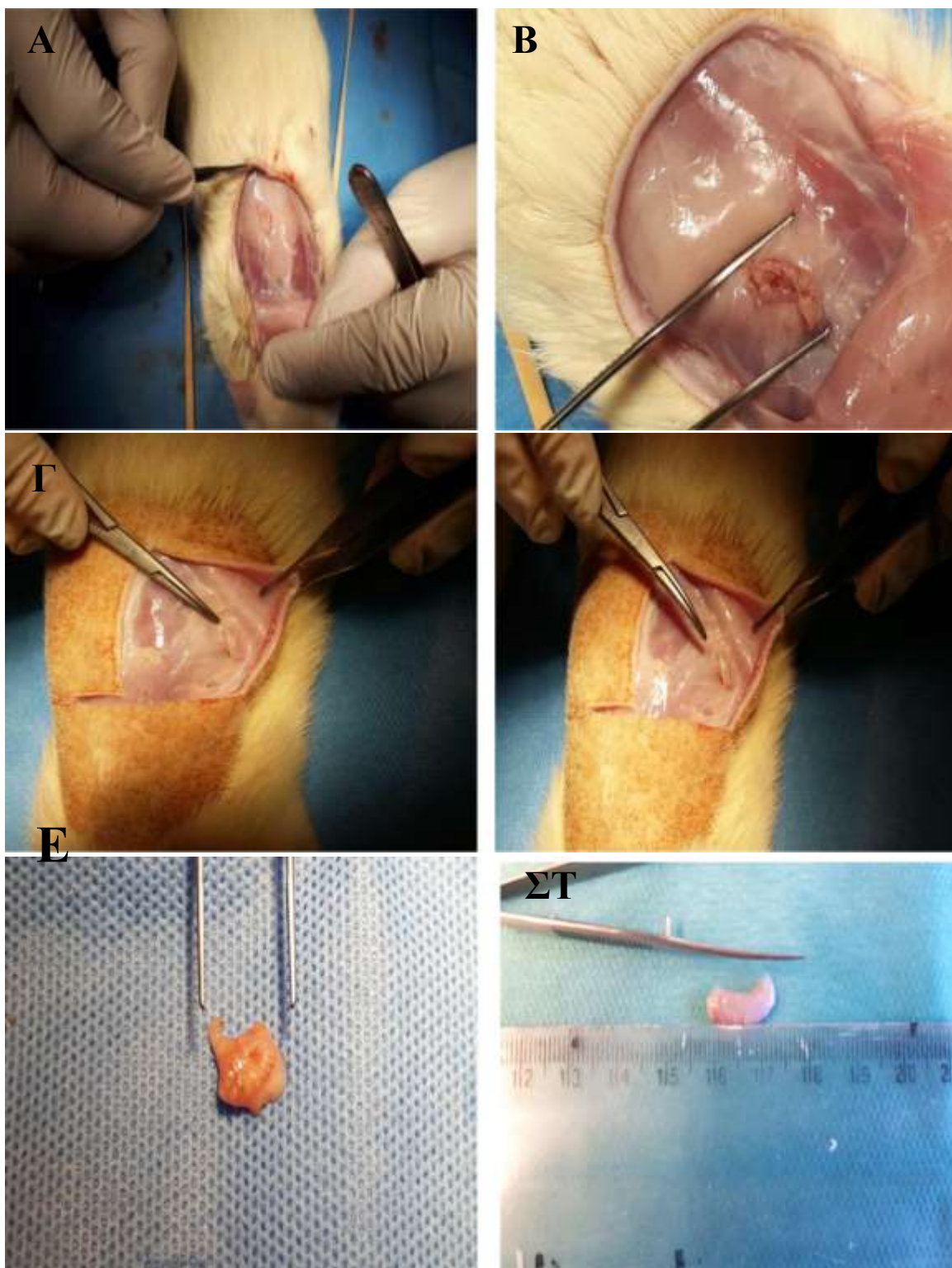


Εικόνα 16 (A,B,Γ):Αναισθησία επίμυος (A). Απεικόνιση της διαδικασίας τομής στη ράχη και εμφύτευση αποκυτταροποιημένων και εγγενών ιστών τραχείας (B-Γ).

8.9.3 Χειρουργείο λήψης εμφυτευμένου ιστού

Μετά το πέρας του ενός μήνα από την εμφύτευση των ιστών, πραγματοποιήθηκε χειρουργείο για τη λήψη των ιστών προκειμένου να αξιολογηθούν εκτενώς ιστολογικά και ανοσοϊστοχημικά.

Πριν το χειρουργείο, πραγματοποιήθηκε ευθανασία των ζώων, μέσω παροχής υψηλής συγκέντρωσης πτητικού αναισθητικού sevoflurane. Στη, συνέχεια, έγινε τομή στη μεσότητα της ράχης και διαχωρίστηκε ο υποδόριος ιστός από τον λιπώδη. Τα τμήματα του εμφυτευμένου ιστού εντοπίστηκαν και πραγματοποιήθηκε τομή περιμετρικά, έγινε λήψη και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για περαιτέρω έλεγχο.



Εικόνα 17 (Α,Β,Γ,Δ,Ε,ΣΤ): Ευθανασία επίμους κα λήψη εμφυτευμένης τραχείας

8.9.4 Ανοσοϊστοχημεία

Τα πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε στους εμφυτευμένους ιστούς προκειμένου να ελεγχθεί η ανοσιακή απάντηση των αλλογενών ζωικών προτύπων στα ικρίωματα καθώς και να αξιολογηθεί η επανακυτταροποίηση του ικριώματος. Για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD3, anti-CD4 και anti-CD11b προκειμένου να αναγνωριστεί το CD3/TCR σύμπλεγμα, τα T-λεμφοκύτταρα που αλληλεπιδρούν με το ταξης II σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας-MHC II και την αναγνώριση των μακροφάγων, ουδετερόφιλων, μονοπύρηνων, πολυμορφοπύρηνων και NK κυττάρων αντίστοιχα. Για τον έλεγχο επανακυτταροποίησης πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα anti-S100 ενώ παράλληλα έγινε χρώση με H&E όπως περιγράφεται στην παράγραφο 8.4.4.1. Για το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιήθηκε το Dako kit for secondary antibody.



Προετοιμασία διαλυμάτων ανοσοϊστοχημείας:

- Αραίωση του EnVision FLEX Target Retrieval Solution High 1:50
- Αραίωση του Wash buffer 1:20
- Αραίωση του DAB solution : 1 σταγόνα FLEX DAB + Chromogen για 1 ml FLEX Substrate Buffer.
- Αραίωση των πρωτευνόντων αντισωμάτων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα τα anti-CD4, anti-CD3, anti-CD11b, anti-S100 αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 1/100, 1/100, 1/400 και 1/1000 αντίστοιχα με PBS (1x) και 1% BSA.

CD3: Στην ανοσολογία, ο συν-υποδοχέας T κυττάρων CD3 βοηθά στην ενεργοποίηση τόσο των T κυτταροτοξικών κυττάρων όσο και των T βοηθητικών. Αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα και σχηματίζεται από τέσσερις ξεχωριστές αλυσίδες. Αυτές οι αλυσίδες συνδέονται με τον υποδοχέα T-κυττάρων (TCR) και την ζ-αλυσίδα (ζ-αλυσίδα) για να δημιουργήσουν ένα σήμα ενεργοποίησης στα T λεμφοκύτταρα. Τα μόρια TCR, ζ-αλυσίδας και CD3 μαζί συνιστούν το σύμπλοκο TCR. Το CD3 εκφράζεται αρχικά στο κυτταρόπλασμα των προθυμοκυττάρων, τα βλαστικά κύτταρα από τα οποία προκύπτουν τα T-κύτταρα στον θύμο αδένα. Τα προθυμοκύτταρα διαφοροποιούνται σε κοινά θυμοκύτταρα και

στη συνέχεια σε μυελικά θυμοκύτταρα και στο τελευταίο αυτό στάδιο το αντιγόνο CD3 αρχίζει να μεταναστεύει στην κυτταρική μεμβράνη. Το αντιγόνο βρίσκεται δεσμευμένο στις μεμβράνες όλων των ώριμων T-κυττάρων. Αυτή η υψηλή εξειδίκευση, συνδυασμένη με την παρουσία CD3 σε όλα τα στάδια ανάπτυξης T-κυττάρων, την καθιστά χρήσιμο ανοσοϊστοχημικό δείκτη για T-κύτταρα σε τομές ιστών (Leong et al., 2003).

CD4: Στη μοριακή βιολογία, το CD4 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια των ανοσοκυττάρων όπως τα T βοηθητικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και ήταν αρχικά γνωστό ως leu-3 και T4 (μετά το μονοκλωνικό αντίσωμα OKT4 που αντέδρασε με αυτό) πριν ονομαστεί CD4 το 1984. Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη CD4 κωδικοποιείται από το γονίδιο CD4. Τα CD4 και τα T βοηθητικά κύτταρα είναι λευκά αιμοσφαίρια που αποτελούν ουσιαστικό τμήμα του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος. Συχνά αναφέρονται ως κύτταρα CD4, T-βοηθητικά κύτταρα ή κύτταρα T4. Ονομάζονται βοηθητικά κύτταρα επειδή ένας από τους κύριους ρόλους τους είναι να στέλνουν μηνύματα σε άλλους τύπους κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων κυττάρων-φονείς CD8, τα οποία στη συνέχεια καταστρέφουν το μολυσματικό σωματίδιο. Εάν τα κύτταρα CD4 εξαντληθούν, το σώμα παραμένει ευάλωτο σε ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων που διαφορετικά θα μπορούσε να καταπολεμήσει. Το CD4 είναι ένας συν-υποδοχέας του T κυτταρικού υποδοχέα (TCR) και βοηθά το τελευταίο στην επικοινωνία με κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα. Το σύμπλοκο TCR και το CD4 συνδέονται έκαστο σε διαφορετικές περιοχές του αντιγόνου με επακόλουθη ενεργοποίηση των T κυττάρων. (Bernard et al., 1984, Isobe et al., 1986, Ansari-Lari et al., 1996)

CD 11b: Η πρωτεΐνη CD11 είναι στην πραγματικότητα ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο που αποτελείται από το CD11b και το CD18. Το CD11 εμπλέκεται σε πολυάριθμες ενώσεις που σχετίζονται με την προσκόλληση μεταξύ κυττάρων όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, κύτταρα φυσικού φονέα (NK) και κοκκιοκύτταρα.

S100 πρωτεΐνη: Οι πρωτεΐνες S100 είναι πρωτεΐνες δέσμησης ασβεστίου μικρού μοριακού βάρους που εκφράζονται σε σπονδυλωτά. Η οικογένεια αποτελείται από 21 γνωστά μέλη που εκφράζονται σε διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους και παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Τα μέλη της οικογένειας S100 έχουν τόσο ενδοκυτταρικές όσο και εξωκυτταρικές λειτουργίες. Η πρωτεΐνη S100 σε χονδροκύτταρα αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά από τους Stefansson (Stefansson et al., 1982) και συνεργάτες σε ιστό ανθρώπινου ενήλικα και εμβρύου χρησιμοποιώντας την ανοσοϊστοχημεία τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Στη συνέχεια, αρκετές ομάδες έχουν εντοπίσει πρωτεΐνη S100 σε φυσιολογικό ιστό και σε όγκους χόνδρου και οστού (Nakamura et al., 1983; Okajima et al., 1988; Hasegawa et al., 1995). Η πρωτεΐνη S100 μελετήθηκε κυρίως ως δείκτης για τον χονδροκυτταρικό φαινότυπο και τη χονδρογονική προέλευση (Ushigome et al., 1984; Li et al., 2002; Chano et al., 1995). Ωστόσο, έχει αναφέρει ότι η ένταση της πρωτεΐνης S100 αυξάνει στα χονδροκύτταρα κοντά στις αλλοιώσεις του χόνδρου και πρότεινε ότι η πρωτεΐνη S100 μπορεί να εμπλέκεται στη διαδικασία επιδιόρθωσης χόνδρου.

➤ **Διαδικασία αποπαραφίνωσης:** τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60 °C για 30 λεπτά και προσθήκη των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για την πλήρη απομάκρυνση της παραφίνης.

➤ **Διαδικασία ενυδάτωσης:** προσθήκη των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά,
- Αιθανόλη 96% για 2 λεπτά,
- Αιθανόλη 80% για 2 λεπτά

➤ **Διαδικασία ανοσοϊστοχημείας**

- Τοποθέτηση ιστών σε προθερμασμένο διάλυμα EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (μαζί με τα πλακάκια) σε υδατόλουτρο στους 95⁰C για 7 λεπτά.
- Αφήστε το να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά (προαιρετικά)
- Πλύσιμο με wash buffer για 5 λεπτά x2.

- Αποκλεισμός της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης με την προσθήκη αντιδραστηρίου Peroxidase Blocking Reagent για για 5-10 λεπτά (βέλτιστο 7 λεπτά)
- Πλύσιμο με wash buffer.
- Επώαση με BSA 0,1% και PBS-tween 0,1% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύσιμο με wash buffer.
- Κάλυψη του ιστού με το διάλυμα αντισωμάτων (80-100 μλ ή 50 μλ άμα τοποθετηθεί καλυπτρίδα).
- Επώαση για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (ή εναλλακτικά στους 4⁰ C για όλη τη διάρκεια της νύχτας).
- Πλύσιμο με wash buffer για 5 λεπτά x2.
- Κάλυψη των ιστών με το διάλυμα EnVision FLEX / HRP (Dako - δευτερογενές αντίσωμα) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1ώρα.
- Έλεγχος κατά διαστήματα ώστε να μη στεγνώσουν οι ιστοί.
- Πλύσιμο με wash buffer για 5 λεπτά x2.
- Κάλυψη των ιστών με το διάλυμα DAB και επώαση στο σκοτάδι για 5 λεπτά
- Πλύσιμο με wash buffer για 5 λεπτά x2.
- Τοποθέτηση τομών σε αιματοξυλίνη για 1 λεπτό.
- Πλύσιμο με wash buffer για 5 λεπτά x2.
- Πλύσιμο με dH₂O για 5 λεπτά x2.



Διαδικασία αφυδάτωσης: τοποθέτηση των τομών σε διαλύματα αλκοολών.
Συγκεκριμένα:

- Αιθανόλη 80% για 30 δευτερόλεπτα,
- Αιθανόλη 96% για 30 δευτερόλεπτα
- Δύο διαδοχικά διαλύματα απόλυτης αιθανόλης 100% για 1 λεπτό το καθένα,
- Ξυλόλη για 1 λεπτό

Μετά την ολοκλήρωση των χρώσεων προστέθηκε μικρή ποσότητα DPX επάνω στις τομές και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για την προστασία και διατήρηση των τομών. Τα δείγματα αφέθηκαν για να στεγνώσουν προκειμένου να ακολουθήσει η μικροσκόπηση τους.

Υλικά-Διαλύματα-Μηχανήματα

- Διάλυμα ξυλόλης (SIGMA).
- Διάλυμα αλκοόλης 100% (VWR)
- Διαλύματα αλκοολών 80%, 96%.
- Dako kit for secondary antibody (DAKO)
- Πλαστικά δοχεία (VWR).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης (THERMO SCIENTIFIC)
- Διάλυμα DPX (VWR)
- Θερμαινόμενη πλάκα (BIOLINE SCIENTIFIC)
- dH₂O
- Αντίσωμα Anti -CD3 (DAKO)
- Αντίσωμα Anti -CD4 (DAKO)
- Αντίσωμα Anti- CD11-b (DAKO)
- Αντίσωμα Anti- S100 (DAKO)
- Διάλυμα PBS 1x (GIBCO)
- Tween-20 (SIGMA)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA)
- Θάλαμος νηματικής ροής κλάσης II (BIOAIR)
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (KLS MARTIN)
- Πλαστικές κασετίνες έγκλεισης (BIO-OPTICA)
- Ποτήρι ζέσεως (DURAN)
- Διάλυμα φορμόλης 10% (SIGMA)
- Διάλυμα αλκοόλης 70%
- Χρώση Αιματοξυλίνη (SIGMA)
- Υδατόλουτρο (MEMMERT)
- Αεριζόμενοι κλωβοί Euro standard type II L (H-TEMP, TECHNIPLAST)
- Τροφή σε μορφή pellets (TEKLAND 2018).
- Πλαστικά (polycarbonate) μπουκάλια χωρητικότητας 500ml (TECHNIPLAST).
- Στρωμνή τύπου corncob (REHOFIX MK 2000).

9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1. Αξιολόγηση Μορφολογικών Χαρακτηριστικών Αποκυτταροποιημένων Ιστών

Η διαδικασία της αποκυτταροποίησης των ιστών πραγματοποιήθηκε για 5 συνεχόμενους κύκλους. Μετά το πέρας της διαδικασίας αποκυτταροποίησης πραγματοποιήθηκε ιστολογική αξιολόγηση προκειμένου να ελεγχθεί σε ποιο στάδιο ο ιστός της τραχείας είχε πλήρως αποκυτταροποιηθεί έχοντας απελευθερωθεί από τα πυρηνικά και κυτταρικά στοιχεία και διατηρώντας παράλληλα τη δομή του.

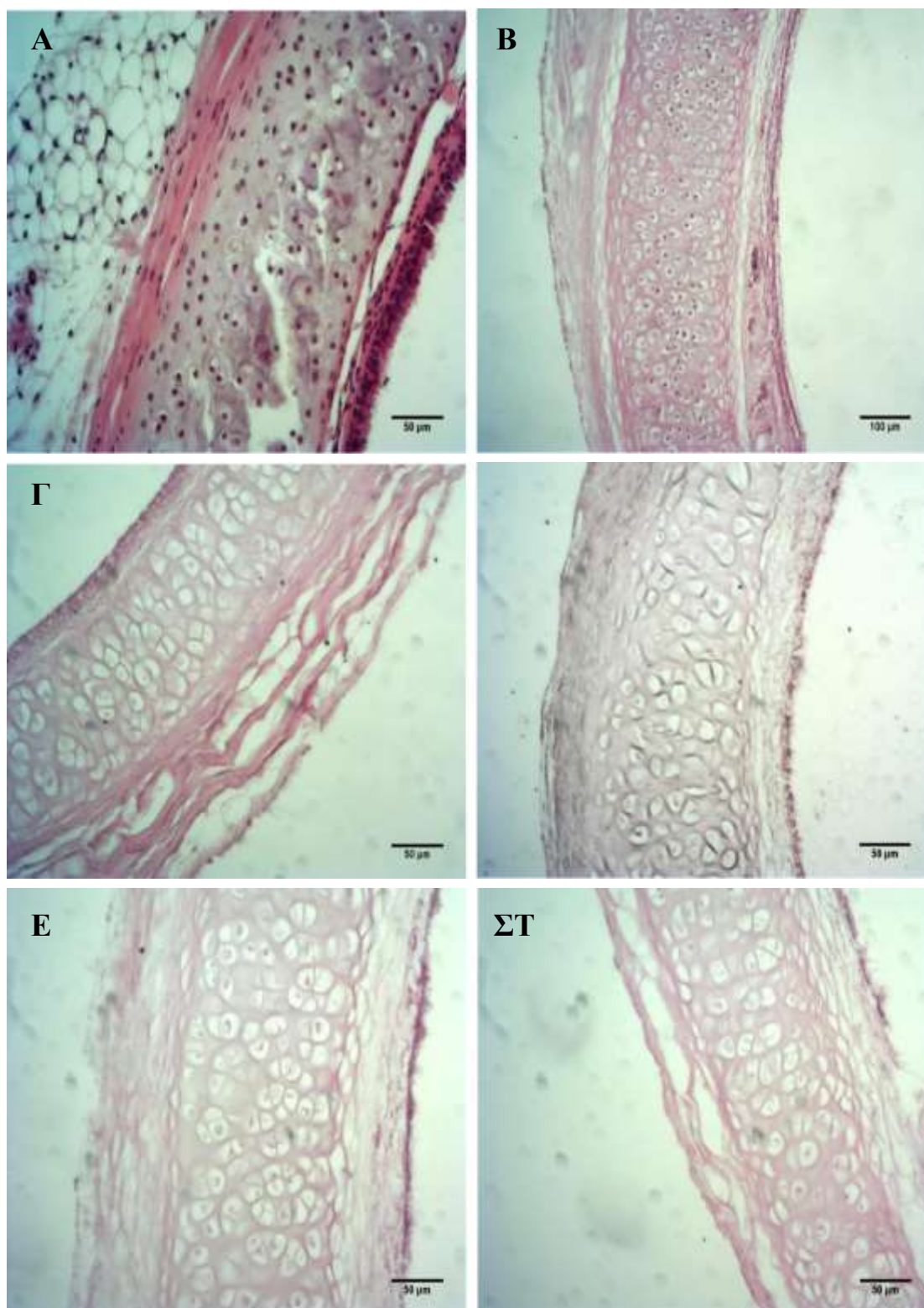
Η ιστολογική αξιολόγηση των τομών με Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη παρουσίασε πλήρη κυτταρική και πυρηνική απομάκρυνση στις αποκυτταροποιημένες τραχείες έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης, συγκρινόμενες με τις φυσιολογικές τραχείες.

Για την επιβεβαίωση της απομάκρυνσης των πυρηνικών στοιχείων αξιολογήθηκαν οι τομές που είχαν χρωματιστεί με DAPI. Τα αποτελέσματα έδειξαν πλήρη απομάκρυνση των πυρήνων στις αποκυτταροποιημένες τραχείες έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης ενώ οι πυρήνες ήταν εμφανείς στις τομές των φυσιολογικών τραχειών.

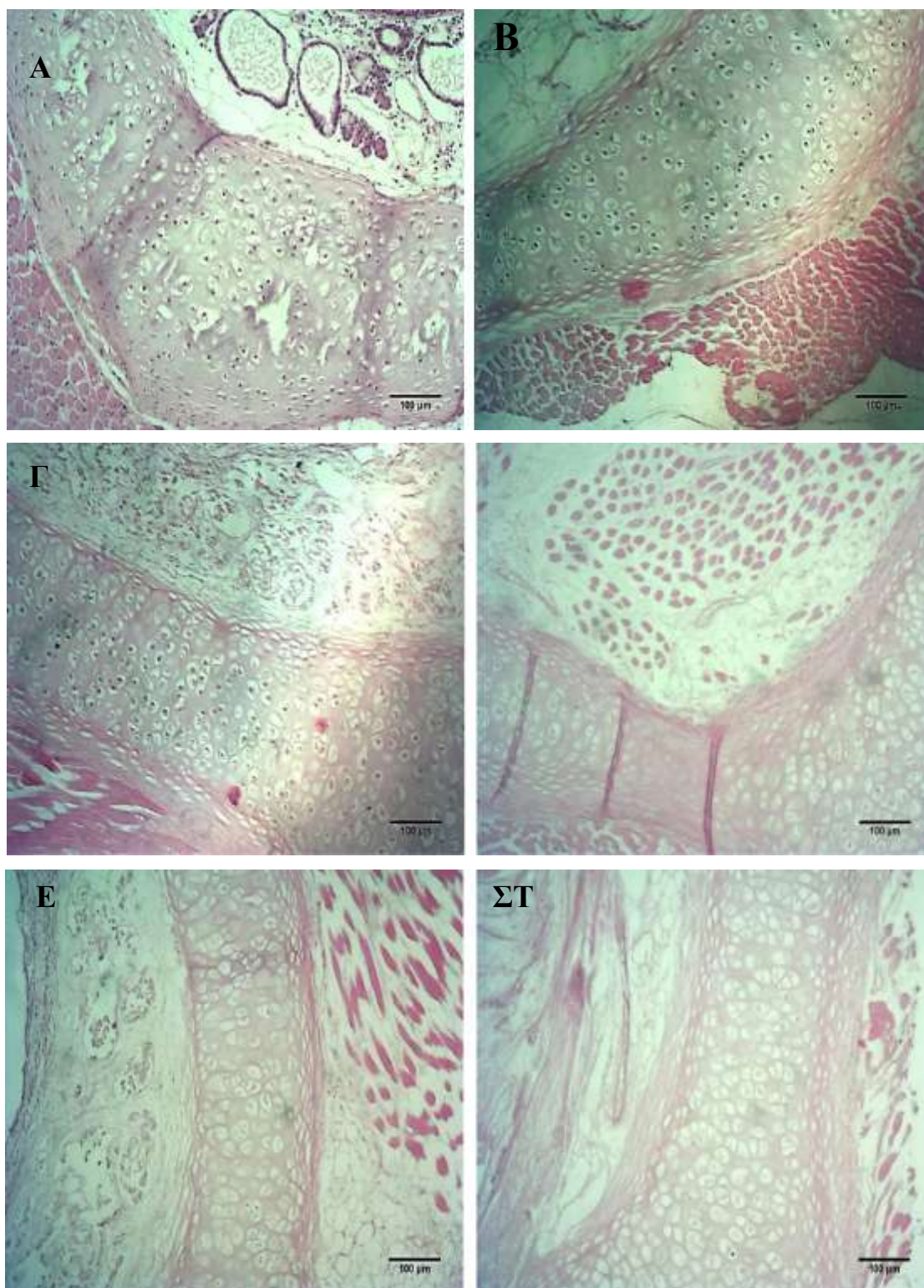
Επίσης, έπειτα από τους 3 κύκλους αποκυτταροποίησης, οι γλυκοζαμινογλυκάνες, το κολλαγόνο και η ελαστίνη παρέμειναν στους ιστούς των αποκυτταροποιημένων τραχειών που χρωματίστηκαν με Τολουιδίνη μπλε, τρίχρωμη χρώση Masson's trichrome και Elastic Van Gieson αντίστοιχα. Επομένως, διαπιστώθηκε πως η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία παρέμεινε ανέπαφη, γεγονός που καθιστά το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης αποτελεσματικό και τον ιστό κατάλληλο για πιθανή μεταμόσχευση.

9.1.1 Χρώση με Αιματοξυλίνη-Εωσίνη (H&E)

Η χρώση με Αιματοξυλίνη-Εωσίνη πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο του κυτταρικού περιεχομένου του ιστού τραχείας πριν και μετά την αποκυτταροποίησή του. Αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε και για τους 5 κύκλους αποκυτταροποίησης σε 2 σημεία της τραχείας όπου εντοπίζεται διαφορετικό πάχος ιστού, στο άνω τμήμα και στο μεσαίο, σε κάθετες τομές πάχους 5μm. Συγκεκριμένα, η αιματοξυλίνη χρωματίζει τους πυρήνες με το χαρακτηριστικό μωβ χρώμα ενώ η εωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα-εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με χρώμα ροζ.



Εικόνα 18: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του μέσου τμήματος της τραχείας με χρώση H&E σε μεγέθυνση 10x (B) και 20x (A,Γ,Δ,Ε,ΣΤ). Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης.

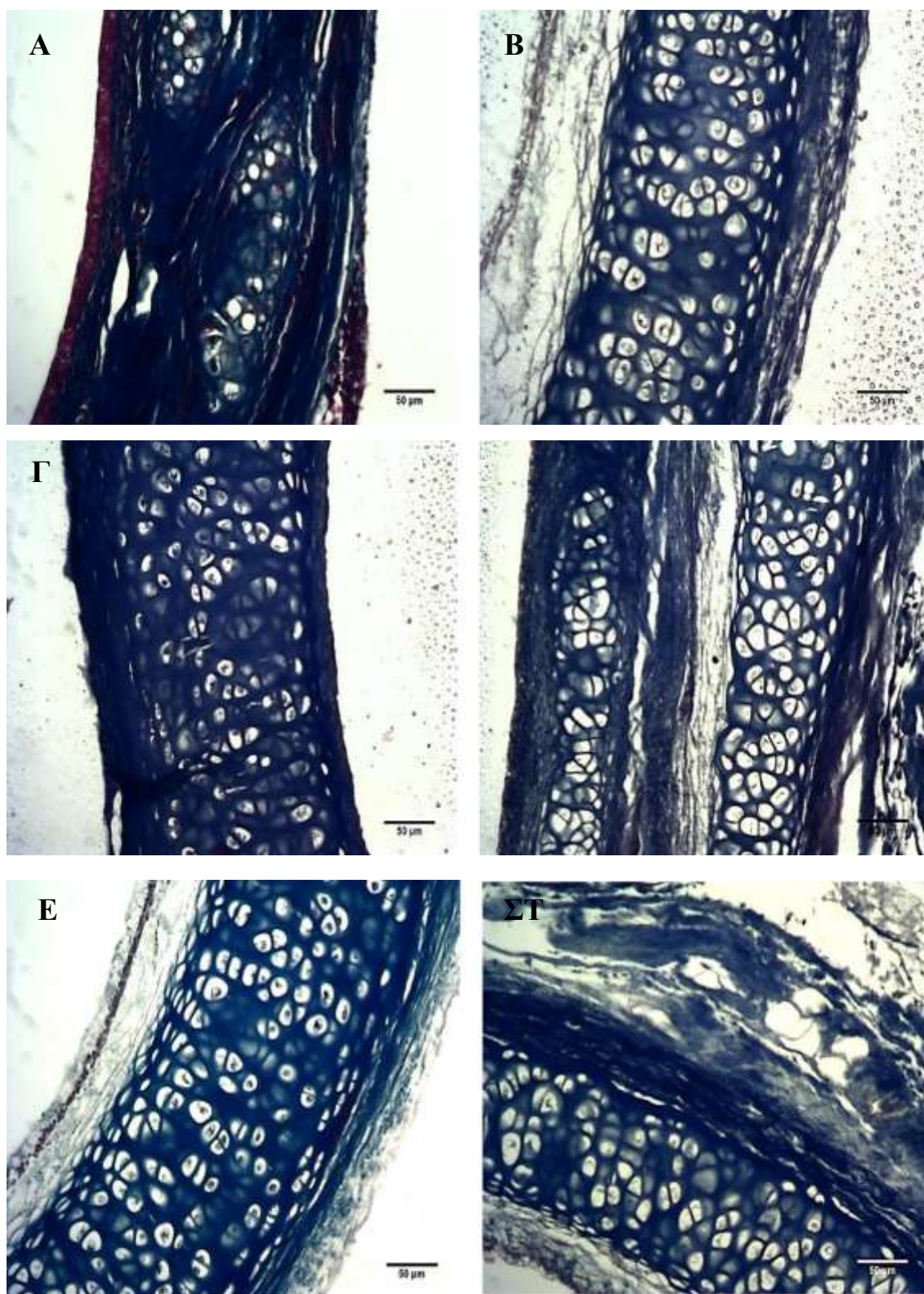


Εικόνα 19: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του άνω τμήματος της τραχείας με χρώση H&E σε μεγέθυνση 10x (Α,Β,Γ,Δ,Ε,ΣΤ). Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης.

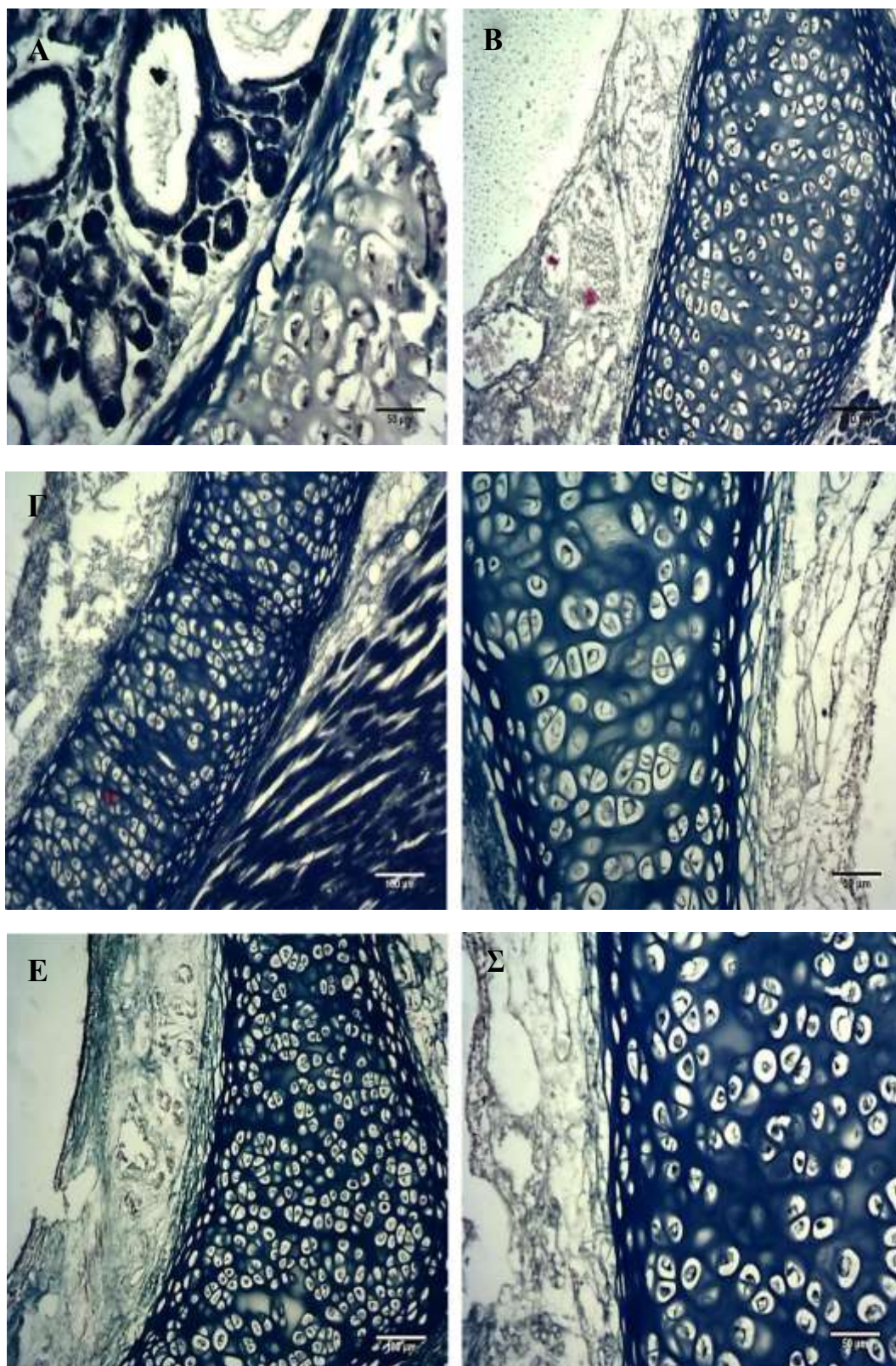
Οι παραπάνω εικόνες ιστολογικών χρώσεων έδειξαν πλήρη απομάκρυνση πυρηνικού υλικού έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης. Ενώ στο μέσο τμήμα της τραχείας παρατηρήθηκε πλήρης αποκυτταροποίηση από τον 2^ο κύκλο, δε φάνηκε να συμβαίνει το ίδιο στο άνω τμήμα της τραχείας όπου τα κύτταρα είναι εμφανή στον χόνδρινο ιστό. Αντιθέτως, στον 3^ο κύκλο αποκυτταροποίησης παρατηρήθηκε απουσία πυρηνικού και κυτταρικού υλικού και στα 2 τμήματα της τραχείας.

9.1.2. Χρώση με Masson's Trichrome

Η χρώση Masson's Trichrome πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η παρουσία του κολλαγόνου στους φυσιολογικούς και αποκυτταροποιημένους ιστούς. Το κολλαγόνο και οι πυρήνες που βρίσκονται στους ιστούς χρωματίστηκαν με μπλε χρώμα ενώ οι μυικές ίνες με κόκκινο. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε και για τους 5 κύκλους αποκυτταροποίησης σε 2 σημεία της τραχείας όπου εντοπίζεται διαφορετικό πάχος ιστού, στο άνω τμήμα και στο μεσαίο, σε κάθετες τομές πάχους 5μm.



Εικόνα 20: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του μέσου τμήματος της τραχείας με χρώση Masson's Trichrome σε μεγέθυνση 20x. Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης.

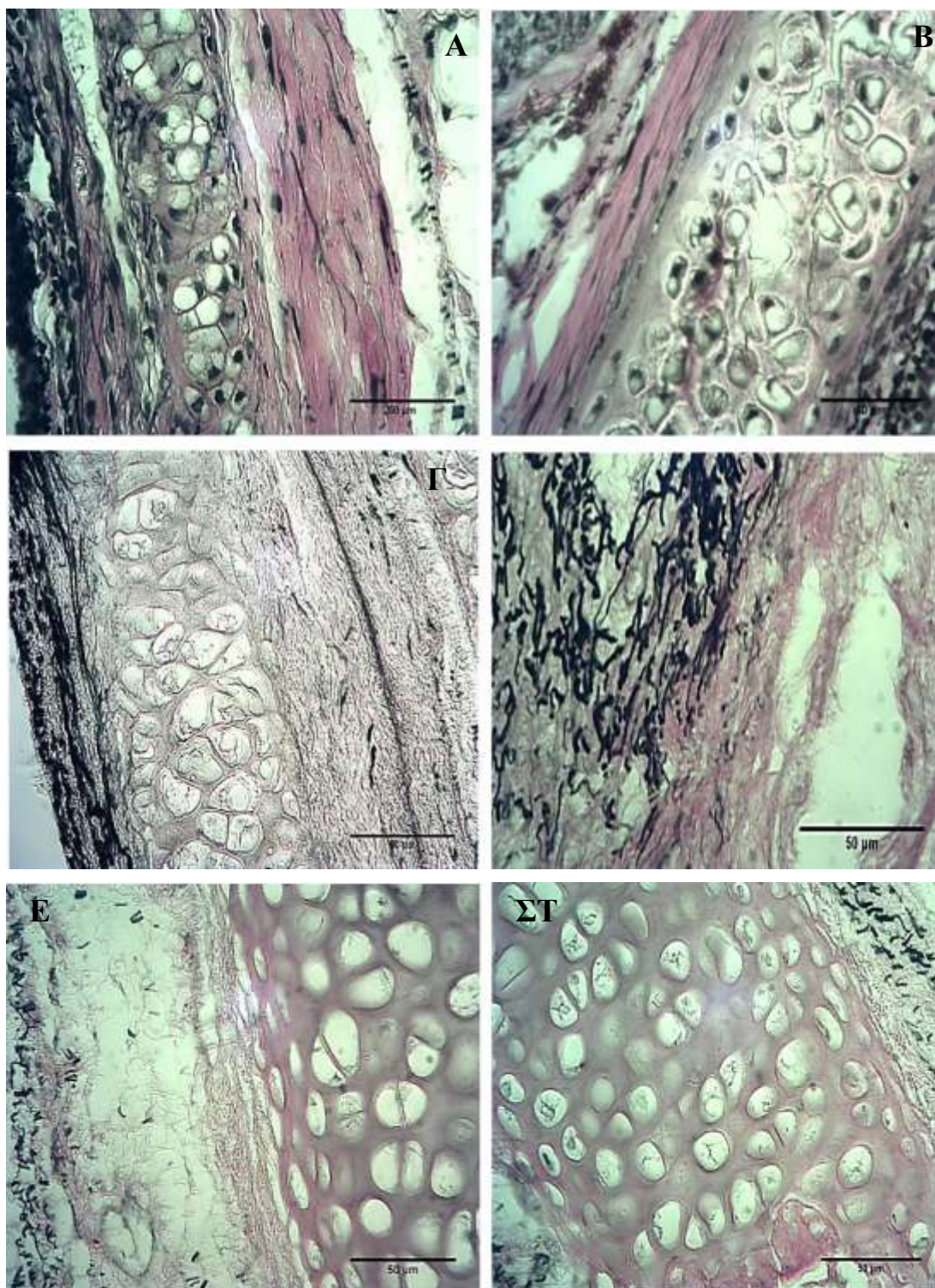


Εικόνα 21: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του άνω τμήματος της τραχείας με χρώση Masson's Trichrome σε μεγέθυνση 10x (B, Γ, Ε) και 20x (A, Δ, ΣΤ). Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης.

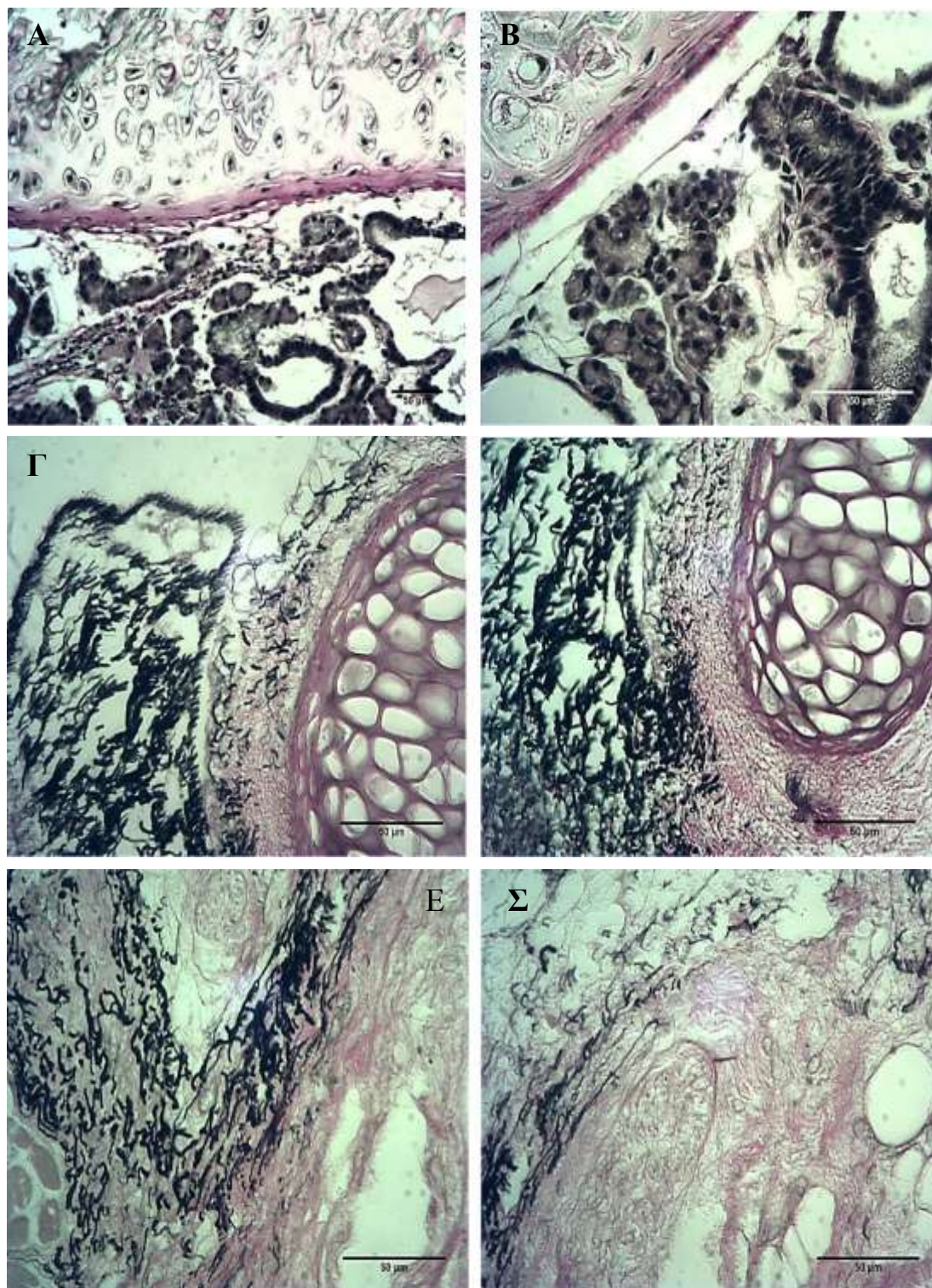
Στις παραπάνω εικόνες ιστολογικών χρώσεων της τραχείας παρατηρήθηκε διατήρηση του κολλαγόνου κατά τη διάρκεια όλων των κύκλων αποκυτταροποίησης. Αυτό αποτέλεσε σημαντική ιδιότητα για τη διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τη μηχανική λειτουργία του ιστού.

9.1.3. Χρώση με Elastic Van Gieson

Η χρώση Elastic Van Gieson πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η παρουσία της ελαστίνης στους φυσιολογικούς και αποκυτταροποιημένους ιστούς. Η ελαστίνη, ένα είδος συνδετικού ιστού εμφανίστηκε μικροσκοπικά σαν ίνες λεπτές. Συγκεκριμένα, με τη συγκεκριμένη χρώση χρωματίζονται η ελαστίνη και οι πυρήνες που βρίσκονται στους ιστούς με μαύρο χρώμα, το κολλαγόνο με ροζ ενώ οι μύες και τα λοιπά χαρακτηριστικά με κίτρινο χρώμα. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε και για τους 5 κύκλους αποκυτταροποίησης σε 2 σημεία της τραχείας όπου εντοπίζεται διαφορετικό πάχος ιστού, στο άνω τμήμα και στο μεσαίο, σε κάθετες τομές πάχους 5μm.



Εικόνα 22: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του μέσου τμήματος της τραχείας με χρώση Elastic Van Gieson σε μεγέθυνση 40x. Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης.

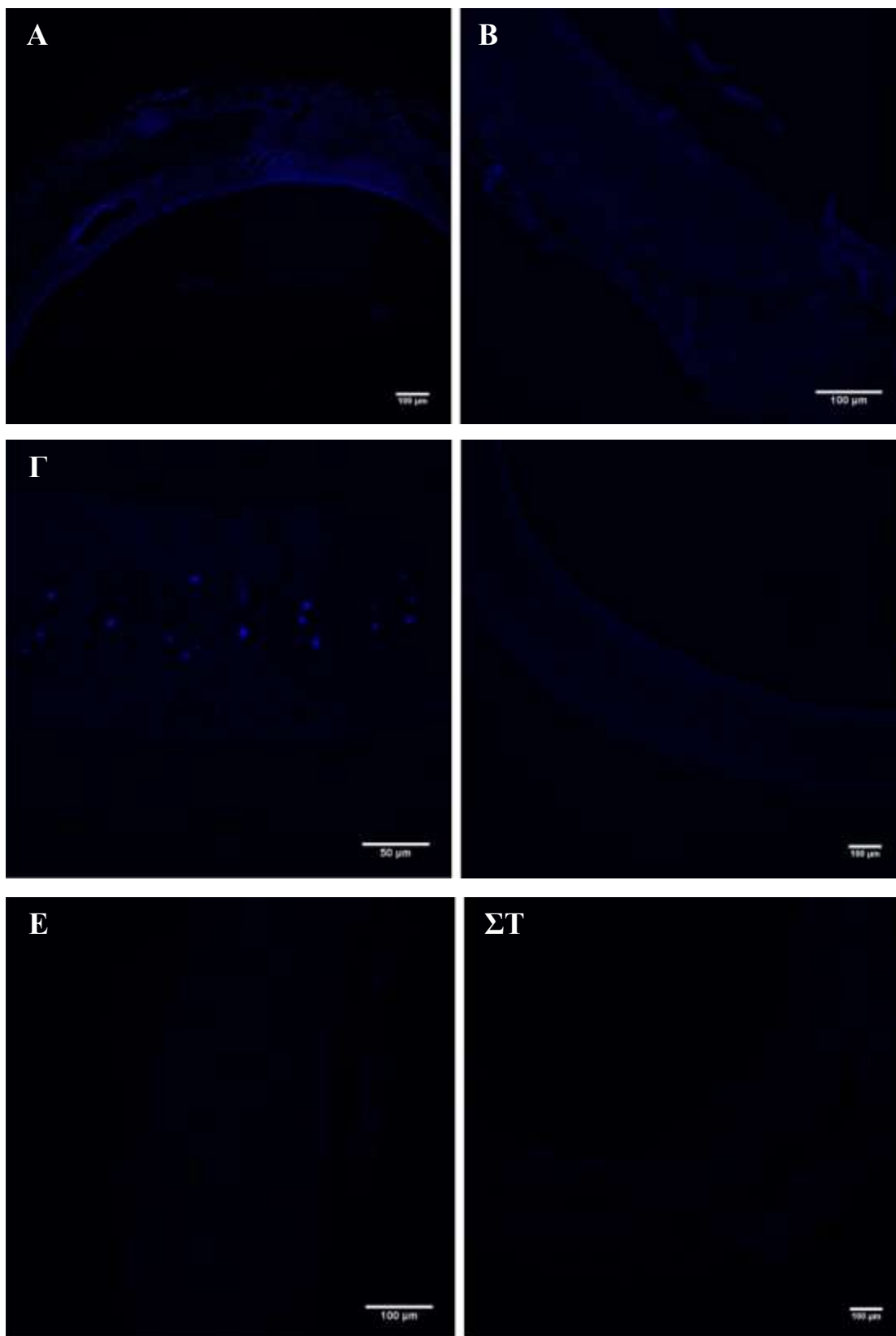


Εικόνα 23: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του άνω τμήματος της τραχείας με χρώση Elastic Van Gieson σε μεγέθυνση 20x (Α) και 40x (Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ). Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυνταροποίησης.

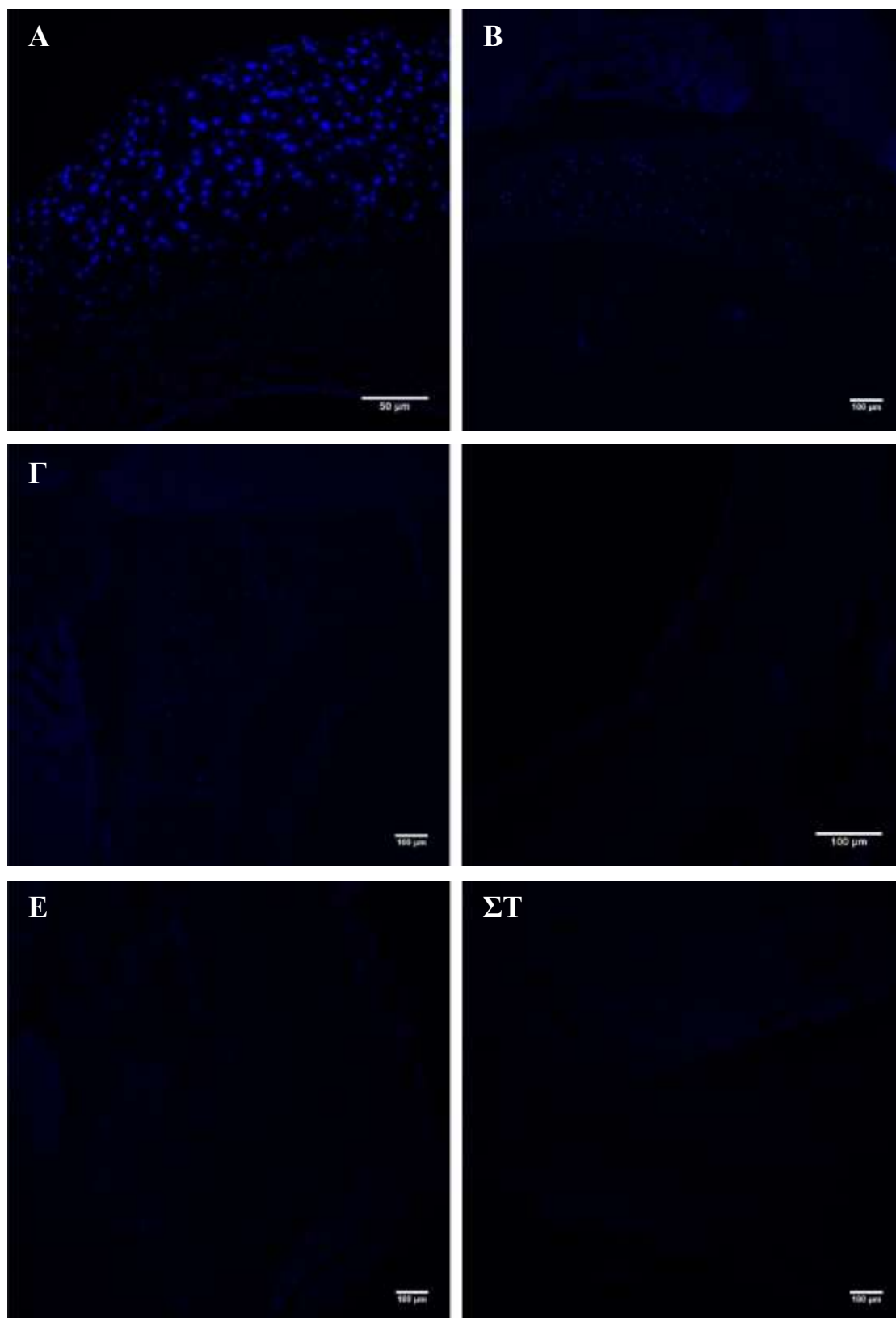
Έπειτα από τις ιστολογικές χρώσεις της τραχείας με Elastic Van Gieson, παρατηρήθηκε η παρουσία της ελαστίνης κατά τη διάρκεια όλων των κύκλων αποκυτταροποίησης με μια μικρή μείωση να παρατηρείται στον 4^ο και 5^ο κύκλο. Τα ινίδια της ελαστίνης παρέμειναν στον αποκυτταροποιημένο ιστό καθιστώντας την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία δομικά λειτουργική.

9.1.4 Χρώση DAPI

Η χρώση DAPI πραγματοποιήθηκε για επιπλέον έλεγχο του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης και ελέγχθηκε η απουσία του γενετικού υλικού μέσω φθορισμού. Η χρωστική DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) προσδένεται στην αδερίνη και τη θυμίνη του DNA και παρουσιάζει τους πυρήνες να φθορίζουν με την επίδραση ακτινοβολίας. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε και για τους 5 κύκλους αποκυτταροποίησης σε 2 σημεία της τραχείας όπου εντοπίζεται διαφορετικό πάχος ιστού, στο άνω τμήμα και στο μεσαίο, σε κάθετες τομές πάχους 5μm.



Εικόνα 24: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του μέσου τμήματος της τραχείας με φθορίζουσα χρώση DAPI σε μεγέθυνση 10x (A, Δ, ΣΤ), 20x (B, E) και 40x (Γ). A: εγγενής ιστός. B, Γ, Δ, E, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης

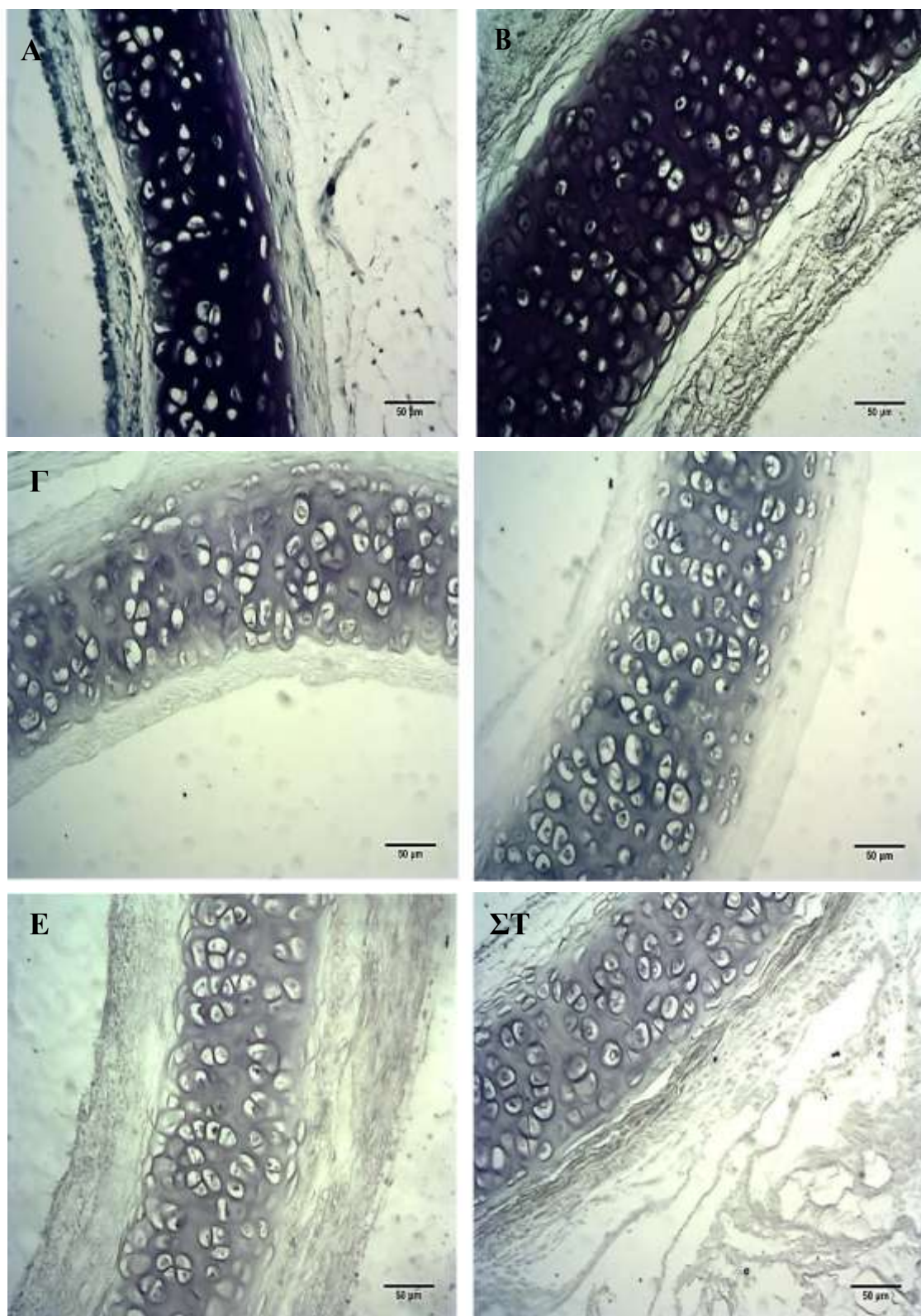


Εικόνα 25: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του άνω τμήματος της τραχείας με φθορίζουσα χρώση DAPI σε μεγέθυνση 10x (B, Γ, E, ΣΤ), 20x (Δ) και 40x (A). A: εγγενής ιστός. B, Γ, Δ, E, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης

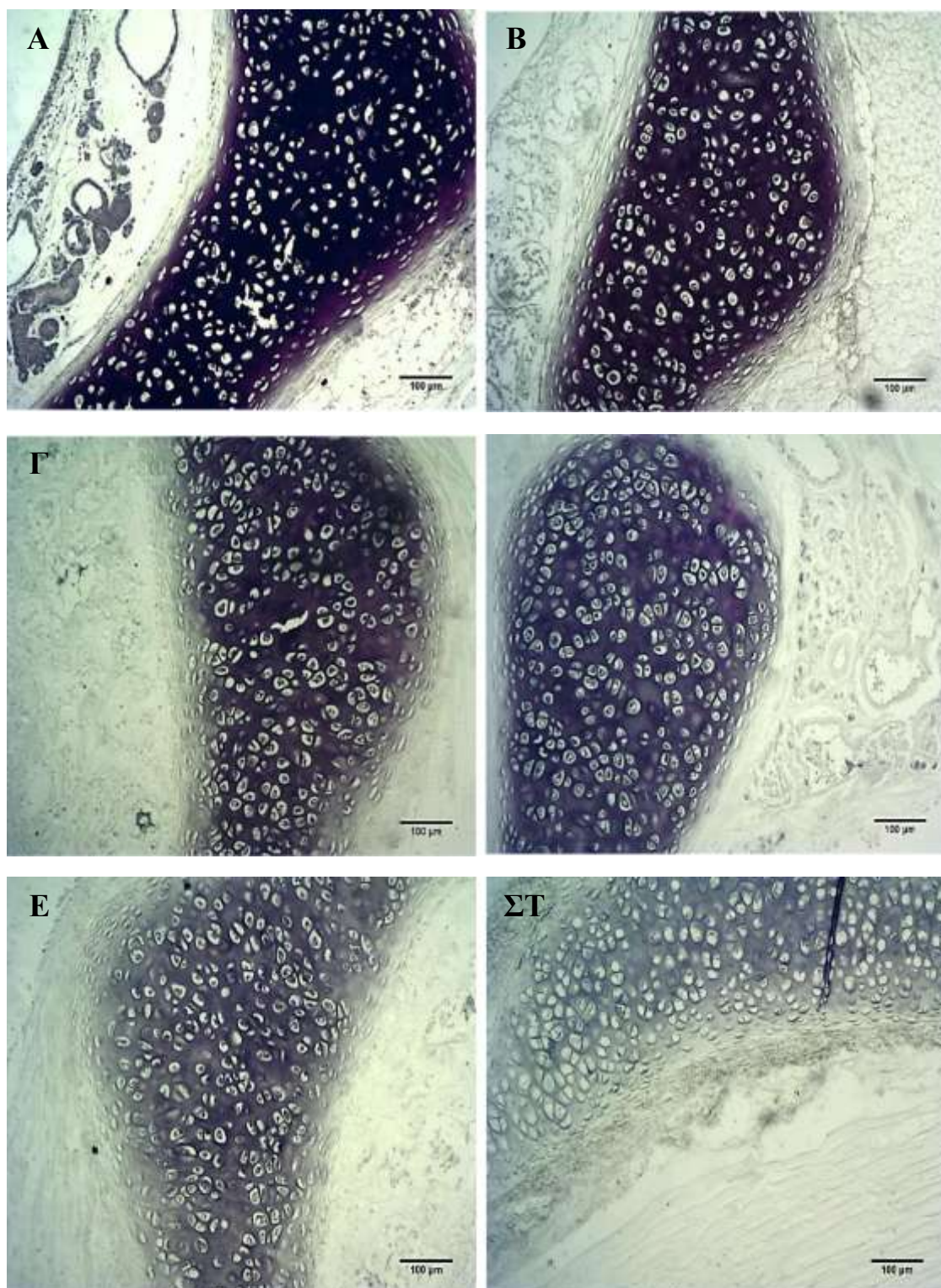
Στις παραπάνω εικόνες ιστολογικών χρώσεων παρατηρήθηκε πως οι ιστοί παρουσίασαν σε ορισμένα σημεία ελαφρύ εγγενή φθορισμό, πιθανόν λόγω της παρουσίας της ελαστίνης. Παρόλα αυτά, οι εικόνες έδειξαν πλήρη απομάκρυνση πυρηνικού υλικού κατά τη διεξαγωγή του φθορισμού έπειτα από 3 κύκλους αποκύτταροποίησης. Η παρατήρηση αυτή ήταν εμφανής και στα δυο τμήματα της τραχείας, μέσο και άνω.

9.1.5. Χρώση με Tolouidine Blue

Η χρώση Tolouidine Blue πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η παρουσία των γλυκοζαμινογλυκανών στους φυσιολογικούς και αποκύτταροποιημένους ιστούς. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες που βρέθηκαν στην εξωκυτάρια θεμέλια ουσία χρωματίστηκαν με το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε και για τους 5 κύκλους αποκύτταροποίησης σε 2 σημεία της τραχείας όπου εντοπίζεται διαφορετικό πάχος ιστού, στο άνω τμήμα και στο μεσαίο, σε κάθετες τομές πάχους 5 μ m.



Εικόνα 26: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του μέσου τμήματος της τραχείας με χρώση Toluidine Blue σε μεγέθυνση 20x. Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης.



Εικόνα 27: Απεικόνιση ιστολογικών χρώσεων του άνω τμήματος της τραχείας με χρώση Toluidine Blue σε μεγέθυνση 10x. Α: εγγενής ιστός. Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ: 1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} κύκλος αποκυτταροποίησης.

Στις παραπάνω εικόνες διαπιστώθηκε πως η περιεκτικότητα των GAGs μειώθηκε κατά τη διάρκεια της αποκυτταροποίησης με την πιο έντονη απουσία να παρατηρείται από τον 3^ο κύκλο και μετά. Σημαντικό θεωρείται πως παρατηρήθηκε μείωση και όχι απουσία των GAGs γεγονός που καθιστά τον ιστό δομικά λειτουργικό.

Ύστερα από την ολοκλήρωση των ιστολογικών χρώσεων για την αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης, διαπιστώθηκε ότι στον 3^ο κύκλο παρατηρήθηκε απομάκρυνση των πυρηνικών και κυτταρικών στοιχείων του ιστού με την παράλληλη διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Σε ορισμένες χρώσεις, όπως στην χρώση με Tolouidine Blue και με Elastic Van Gieson, παρατηρήθηκε μείωση των γυκοζαμινογλυκανών και των ινιδίων ελαστίνης αντίστοιχα, κατά τον 4^ο και 5^ο κύκλο αποκυτταροποίησης. Από τον 4^ο κύκλο και έπειτα θεωρήθηκε ότι η αποκυτταροποίηση επιδρά αρνητικά στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του ιστού καθιστώντας τον, πιθανόν, δομικά μη λειτουργικό. Αντιθέτως, στον 2^ο κύκλο παρατηρήθηκε ότι στο άνω τμήμα της τραχείας είχαν παραμείνει πυρηνικά στοιχεία του ιστού, Για το λόγο αυτό, οι επόμενες αξιολογήσεις που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν στον 3^ο κύκλο αποκυτταροποίησης.

9.2 Αξιολόγηση Φυσιολογικών Χαρακτηριστικών Αποκυτταροποιημένων Ιστών

Για την παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ιστών της τραχείας (n=7) και συγκεκριμένα το μήκος, το βάρος και η διάμετρος. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες που περιλαμβάνουν τις μεταβολές αυτών των χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια των 3 κύκλων αποκυτταροποίησης.

ΜΗΚΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ (mm)				
D/A Αρουραίος	Εγγενής Τραχεία	1^{ος} κύκλος αποκυτ/σης	2ος κύκλος αποκυτ/σης	3^{ος} κύκλος αποκυτ/σης
1	23,15	19,37	18,37	18,02
2	25	20,06	19,88	19,54
3	25	20,19	19,86	19,54
4	23,16	19,05	18,52	17,94
5	23,58	19,07	18,73	18,92
6	24,7	19,94	18,61	19,4
7	24,09	18,89	18,44	17,89
M.O	24,09	19,51	18,83	18,75

Πίνακας 3: Απεικόνιση αλλαγών μήκους των τραχειών κατά τη διάρκεια των τριών κύκλων αποκυτταροποίησης.

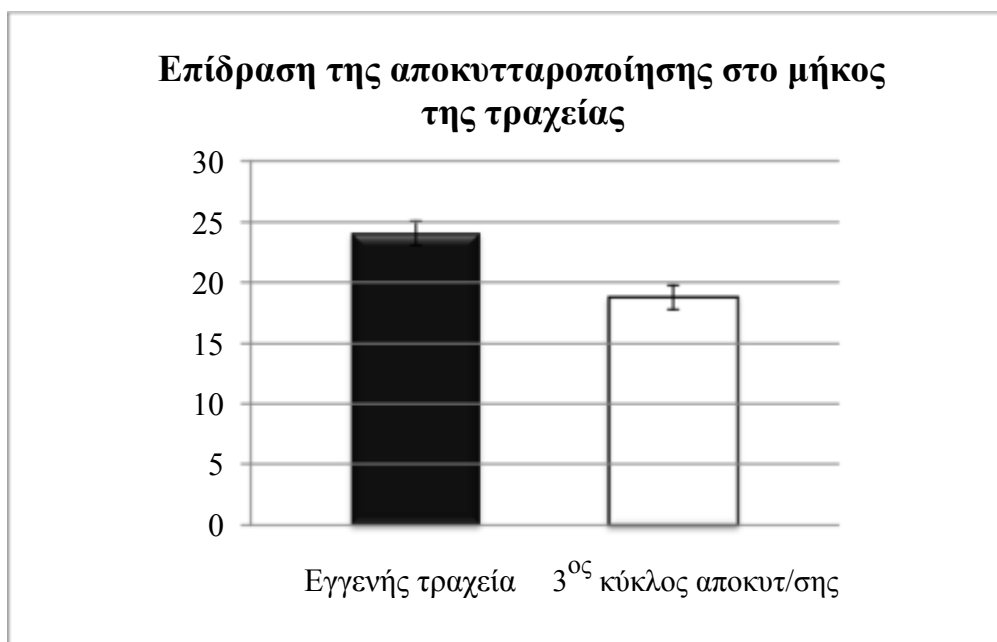
ΒΑΡΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ (gr)				
D/A Αρουραίος	Εγγενής Τραχεία	1^{ος} κύκλος αποκυτ/σης	2ος κύκλος αποκυτ/σης	3^{ος} κύκλος αποκυτ/σης
2	0,35	0,313	0,302	0,298
3	0,279	0,256	0,234	0,225
4	0,257	0,205	0,237	0,246
5	0,227	0,135	0,267	0,183
6	0,291	0,202	0,224	0,313
7	0,271	0,133	0,19	0,215
M.O	0,27	0,21	0,23	0,24

Πίνακας 4: Απεικόνιση αλλαγών βάρους των τραχειών κατά τη διάρκεια των τριών κύκλων αποκυτταροποίησης.

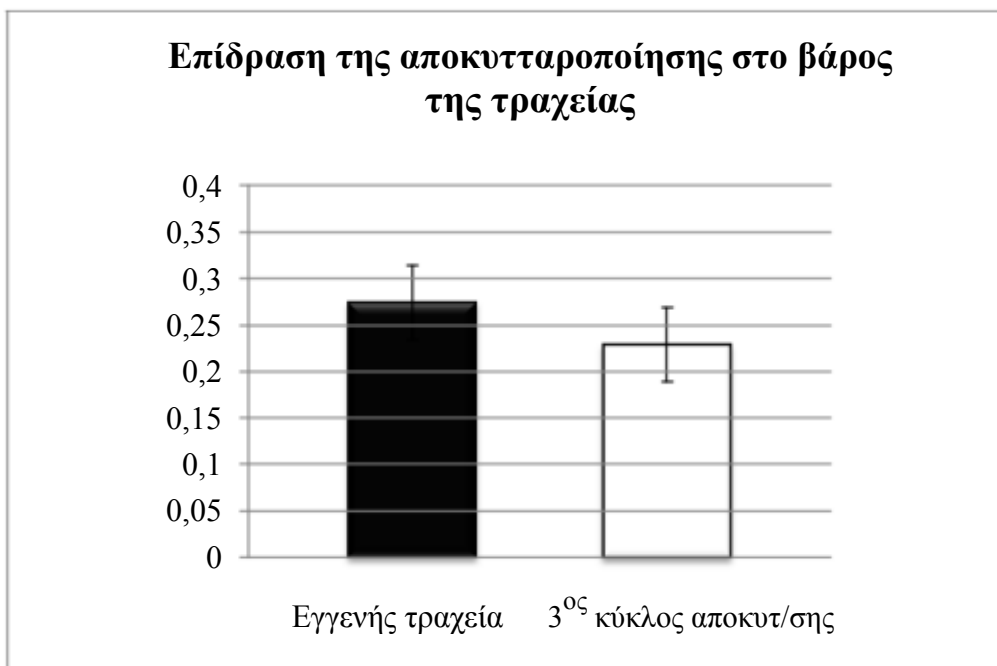
ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ (mm)				
D/A Αουραίος	Εγγενής Τραχεία	1 ^{ος} κύκλος αποκυτ/σης	2ος κύκλος αποκυτ/σης	3 ^{ος} κύκλος αποκυτ/σης
1	3,68	2,56	2,53	2,44
2	4,24	3,81	3,51	3,46
3	3,95	2,73	62,5	2,61
4	3,09	2,46	2,41	2,56
5	3,1	2,82	2,74	2,73
6	3,72	2,97	2,69	3,68
7	3,38	3,04	3,41	2,9
M.O	3,59	2,91	2,82	2,91

Πίνακας 5: Απεικόνιση αλλαγών διαμέτρου των τραχειών κατά τη διάρκεια των τριών κύκλων αποκυτταροποίησης.

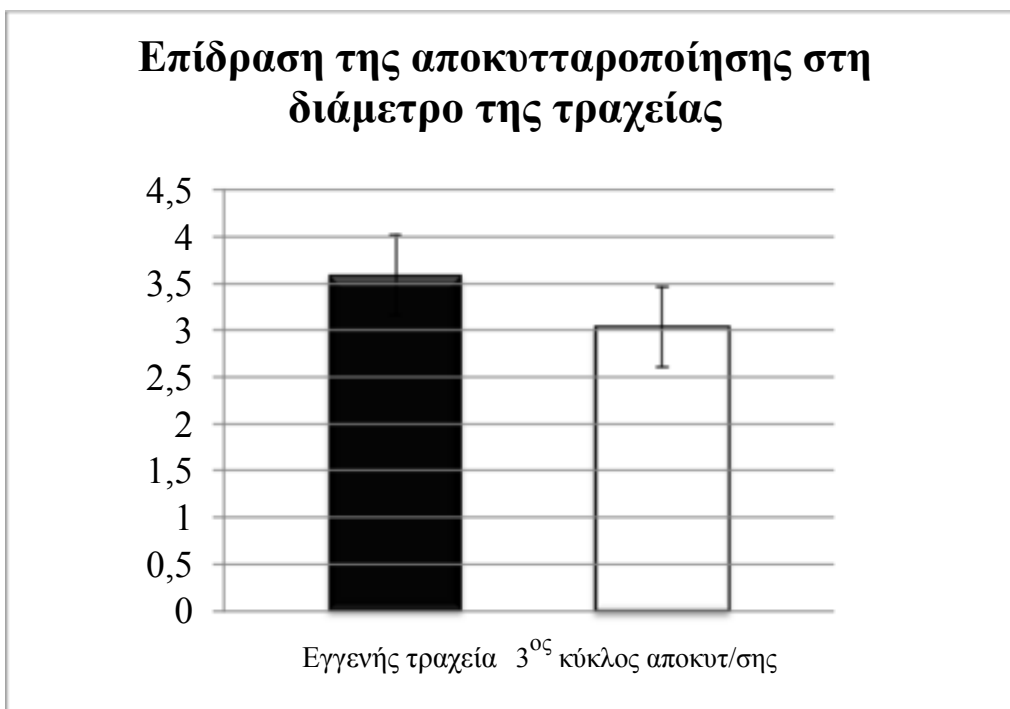
Επίσης, παρουσιάζονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν τη διαφορά των φυσιολογικών χαρακτηριστικών της τραχείας και περιλαμβάνουν τον μέσο όρο της εγγενούς τραχείας και της τραχείας έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης.



Σχήμα 1: Επίδραση της αποκυτταροποίησης στο μήκος της τραχείας.



Σχήμα 2: Επίδραση της αποκυτταροποίησης στο βάρος της τραχείας.



Σχήμα 3: Επίδραση της αποκυτταροποίησης στη διάμετρο της τραχείας.

Ο μέσος όρος του μήκους του αρχικού ιστού ήταν 24,09 mm, του βάρους 0,27gr και της διαμέτρου 3,59 mm (Πίνακας) ενώ χρειάστηκαν κατά μέσο όρο 96 h για την ολοκλήρωση ενός κύκλου αποκυτταροποίησης. Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης, δηλαδή στον 3^ο κύκλο, διαπιστώθηκε μείωση του μέσου όρου του μήκους σε 18,75 mm, του βάρους σε 0,24 gr και της διαμέτρου σε 2,91 mm που αντιστοιχούν σε μείωση κατά 22,16%, 11,11% και 18,94% αρχικού ιστού αντίστοιχα. Η μείωση αυτή ήταν σταδιακή σε κάθε κύκλο αποκυτταροποίησης που πραγματοποιήθηκε (Πίνακας 1). Το μήκος, το βάρος και η διάμετρος παρουσίασαν μια στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0.05$) μετά την ολοκλήρωση της αποκυτταροποίησης.

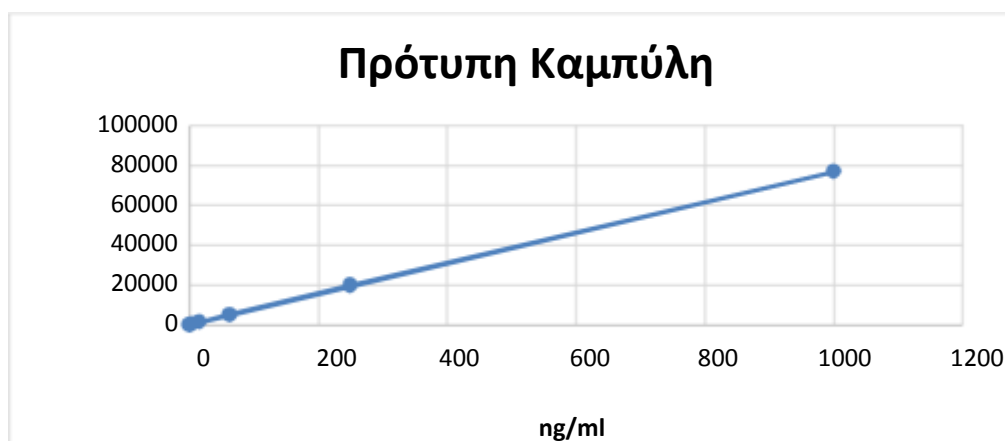
9.3. Ποσοτική αξιολόγηση των Αποκυτταροποιημένων Ιστών

9.3.1 Ευρήματα Ποσοτικοποίησης DNA

Για τον έλεγχο της περιεκτικότητας των ιστών σε DNA πραγματοποιήθηκε αρχικά η πρότυπη καμπύλη ώστε να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται παρακάτω:

Πρότυπα δείγματα	ng/ml	RFU
Blank	0	0
A	1000	77001,17
B	250	19807,77
C	62,5	5131,236
D	16	1292,126
E	3,9	359,253
F	1	105,791
G	0,2	35,352

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δειγμάτων πρότυπης καμπύλης.

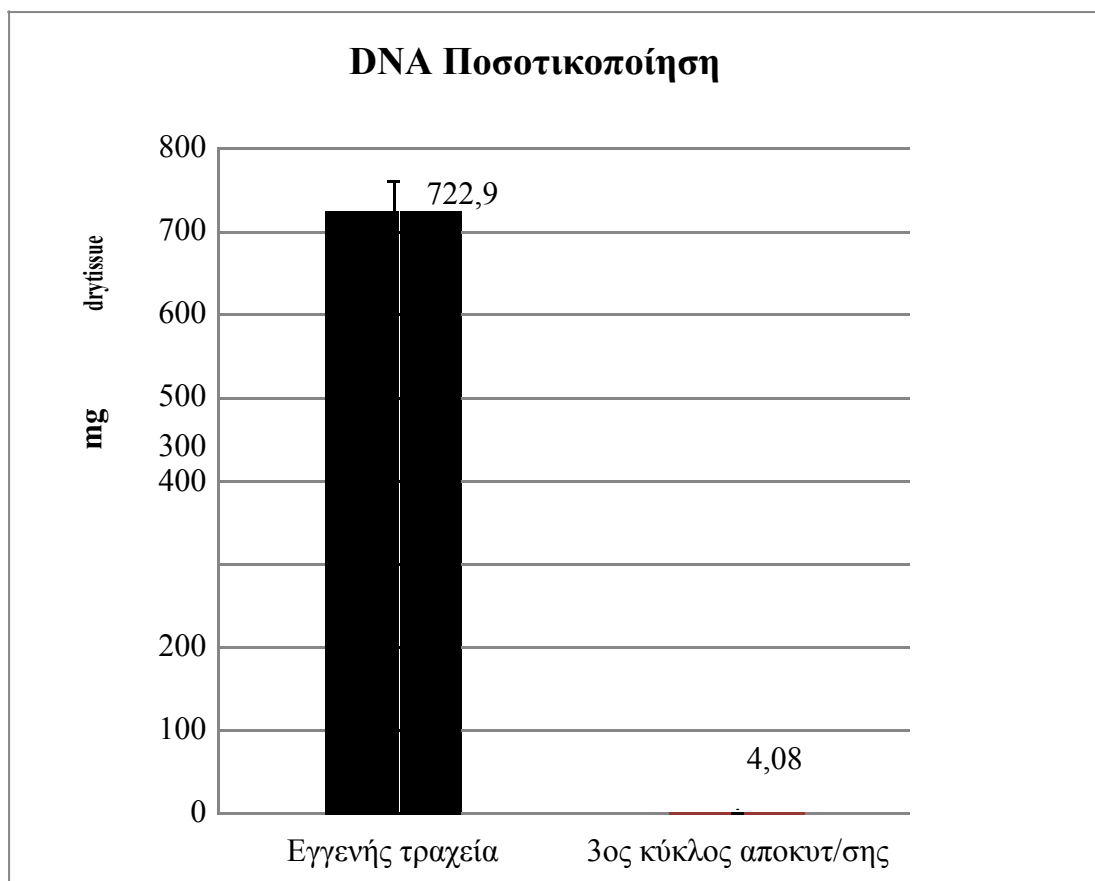


Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων για τον έλεγχο της περιεκτικότητας του DNA στους ιστούς της τραχείας με τα παρακάτω αποτελέσματα.

	DNA Ιστών Τραχείας				
	C(ng/μL)	Vt (μL)	Qty (ng)	Tissue (mg)	Yield (ng DNA/mg tissue)
Εγγενής ιστός 1	242,82	150	36424,36	50	728,48
Εγγενής ιστός 2	364,21	100	36421,7	51	714,15
Εγγενής ιστός 3	246,20	150	36930,53	50	738,61
Εγγενής ιστός 4	219,95	150	32993,99	50	659,88
Εγγενής ιστός 5	268,94	150	40341,95	52	775,81
Εγγενής ιστός 6	374,79	100	37479,04	52	720,75
Αποκυτ. Ιστός 1	7,362	40	294,4867	55	5,35
Αποκυτ. Ιστός 2	6,33	40	253,5503	59	4,29
Αποκυτ. Ιστός 3	8,38	40	335,363	60	5,59
Αποκυτ. Ιστός 4	6,05	40	242,089	58	4,17
Αποκυτ. Ιστός 5	5,74	40	229,6883	61	3,76
Αποκυτ. Ιστός 6	1,78	40	71,2456	55	1,29

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης DNA των εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών της τραχείας.

Επίσης, παρουσιάζεται το διάγραμμα που απεικονίζει την ποσότητα του γενετικού υλικού των εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών της τραχείας έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης.



Σχήμα 4: Ποσοτικοποίηση DNA ιστών τραχείας

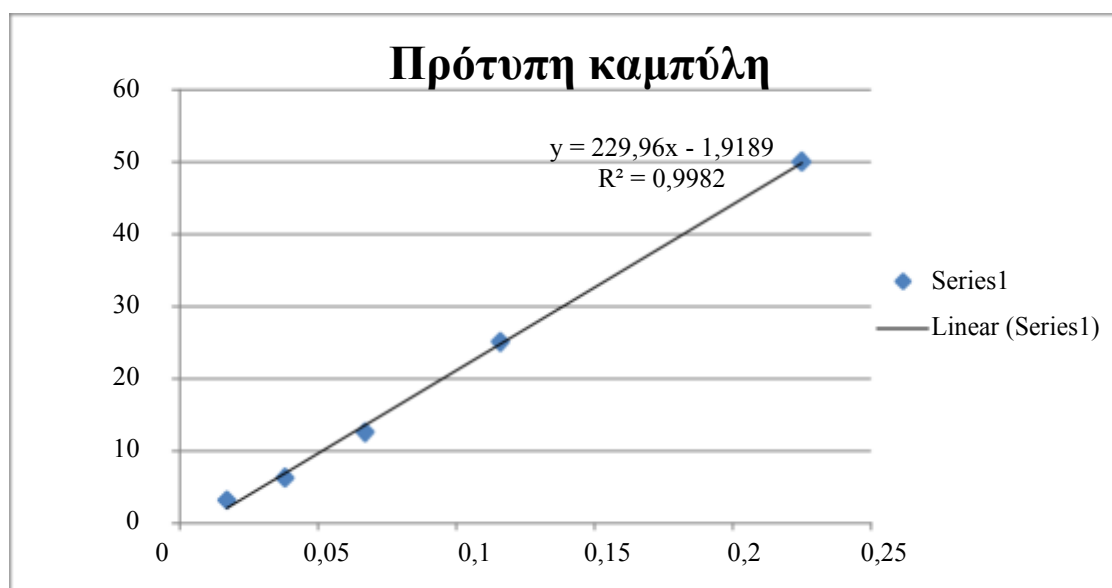
Ο έλεγχος της ποσοτικοποίησης του DNA έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης των τραχειών έδειξε πως το περιεχόμενο του DNA στις αποκυτταροποιημένες τραχείες ήταν 4,08 ng DNA/mg ιστού ενώ στις φυσιολογικές 722,9 ng DNA/mg ιστού (Εικόνα). Φαίνεται πως στις αποκυτταροποιημένες τραχείες παρέμεινε μόνο το 0,56% του αρχικού γενετικού υλικού. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του περιεχομένου DNA μεταξύ φυσιολογικών και αποκυτταροποιημένων τραχειών (p-value <0,005).

9.3.3. Ευρήματα Ποσοτικοποίησης Γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs)

Για τον έλεγχο της περιεκτικότητας των ιστών σε γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) πραγματοποιήθηκε αρχικά η πρότυπη καμπύλη ώστε να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των πρότυπων δειγμάτων απεικονίζονται παρακάτω:

Content	Raw Data (400 1)	Raw Data (525 2)	Raw Data (600 3)	Blank corrected based on Raw Data (400 1)	Blank corrected based on Raw Data (525 2)	Blank corrected based on Raw Data (600 3)
Blank B	0,103	0,271	0,835			
Standard S1	0,105	0,288	0,822	0,002	0,017	-0,013
Standard S2	0,108	0,309	0,826	0,005	0,038	-0,009
Standard S3	0,107	0,338	0,788	0,004	0,067	-0,047
Standard S4	0,112	0,387	0,696	0,009	0,116	-0,139
Standard S5	0,107	0,497	0,522	0,004	0,225	-0,312
Standard S6	0,11	0,616	0,282	0,007	0,345	-0,552
Standard S7	0,111	0,645	0,214	0,008	0,374	-0,62
Standard S8	0,101	0,644	0,203	-0,002	0,373	-0,632

Πίνακας 8: Αποτελέσματα δειγμάτων πρότυπης καμπύλης.



Στη συνέχεια απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τα δείγματα των ιστών της τραχείας όπως παρουσιάστηκαν από το μηχάνημα SPECTROstar Nano (BMG LABTECH):

Content	Raw Data (400 1)	Raw Data (525 2)	Raw Data (600 3)	Blank corrected based on Raw Data (400 1)	Blank corrected based on Raw Data (525 2)	Blank corrected based on Raw Data (600 3)
Εγγενής ιστός 1	0,143	0,446	0,669	0,04	0,175	-0,166
Εγγενής ιστός 2	0,12	0,354	0,756	0,017	0,083	-0,078
Εγγενής ιστός 3	0,135	0,458	0,597	0,032	0,187	-0,237
Εγγενής ιστός 4	0,12	0,357	0,764	0,017	0,085	-0,07
Εγγενής ιστός 5	0,144	0,485	0,565	0,041	0,214	-0,269
Εγγενής ιστός 6	0,124	0,34	0,796	0,021	0,069	-0,038
Εγγενής ιστός 7	0,141	0,442	0,671	0,038	0,171	-0,163
Εγγενής ιστός 8	0,126	0,383	0,765	0,023	0,112	-0,07
Αποκυτ. ιστός 1	0,162	0,426	0,696	0,059	0,155	-0,139
Αποκυτ. ιστός 2	0,124	0,366	0,771	0,021	0,095	-0,063
Αποκυτ. ιστός 3	0,133	0,438	0,657	0,03	0,167	-0,178
Αποκυτ. ιστός 4	0,128	0,386	0,768	0,025	0,114	-0,067
Αποκυτ. ιστός 5	0,157	0,476	0,638	0,054	0,205	-0,197
Αποκυτ. ιστός 6	0,127	0,359	0,774	0,024	0,088	-0,06
Αποκυτ. ιστός 7	0,15	0,514	0,556	0,047	0,243	-0,279
Αποκυτ. ιστός 8	0,118	0,354	0,747	0,015	0,082	-0,088

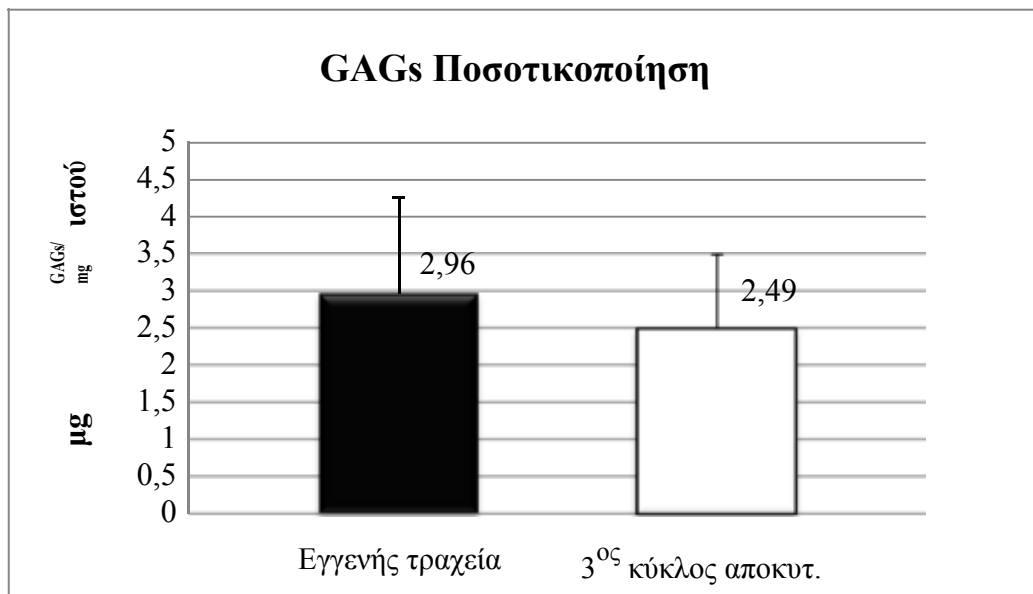
Πίνακας 9: Αποτελέσματα δειγμάτων εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας βάσει του SPECTROstar Nano.

Έπειτα από τη διεξαγωγή των παραπάνω αποτελεσμάτων έγινε μετατροπή βάσει της γραμμικής εξίσωσης ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα των γλυκοζαμινογλυκανών/mg ιστού. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των GAGs έπειτα από την κανονικοποίηση των δειγμάτων με την εξίσωση $229,96 \cdot X - 1,9189$. Η συγκέντρωση των GAGs υπολογίστηκε ως εξής: $229,96 \cdot (\text{Blank corrected based on Raw Data (525 2)}) - 1,9189$ ενώ η κανονικοποίηση των δειγμάτων σε $\mu\text{g GAGs/mg}$ ιστού υπολογίστηκε: Συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$)/ Αρχικό βάρος (mg).

Δείγματα	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$)	Αρχικό βάρος (mg)	Κανονικοποίηση $\mu\text{g GAGs/mg}$ ιστού
Εγγενής ιστός 1	38	20	3,832
Εγγενής ιστός 2	17	20	1,717
Εγγενής ιστός 3	41	20	4,108
Εγγενής ιστός 4	18	20	1,763
Εγγενής ιστός 5	47	20	4,729
Εγγενής ιστός 6	14	20	1,395
Εγγενής ιστός 7	37	20	3,740
Εγγενής ιστός 8	24	20	2,384
Αποκυτ. ιστός 1	34	25	2,698
Αποκυτ. ιστός 2	20	25	1,594
Αποκυτ. ιστός 3	36	25	2,919
Αποκυτ. ιστός 4	24	25	1,944
Αποκυτ. ιστός 5	45	25	3,618
Αποκυτ. ιστός 6	18	25	1,465
Αποκυτ. ιστός 7	54	25	4,320
Αποκυτ. ιστός 8	17	25	1,355

Πίνακας 10: Αποτελέσματα συγκέντρωσης GAGs των δειγμάτων εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας.

Επίσης, παρουσιάζεται το διάγραμμα που απεικονίζει την ποσότητα των GAGs/mg ιστού των εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών της τραχείας έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης.



Σχήμα 5: Ποσοτικοποίηση GAGs.

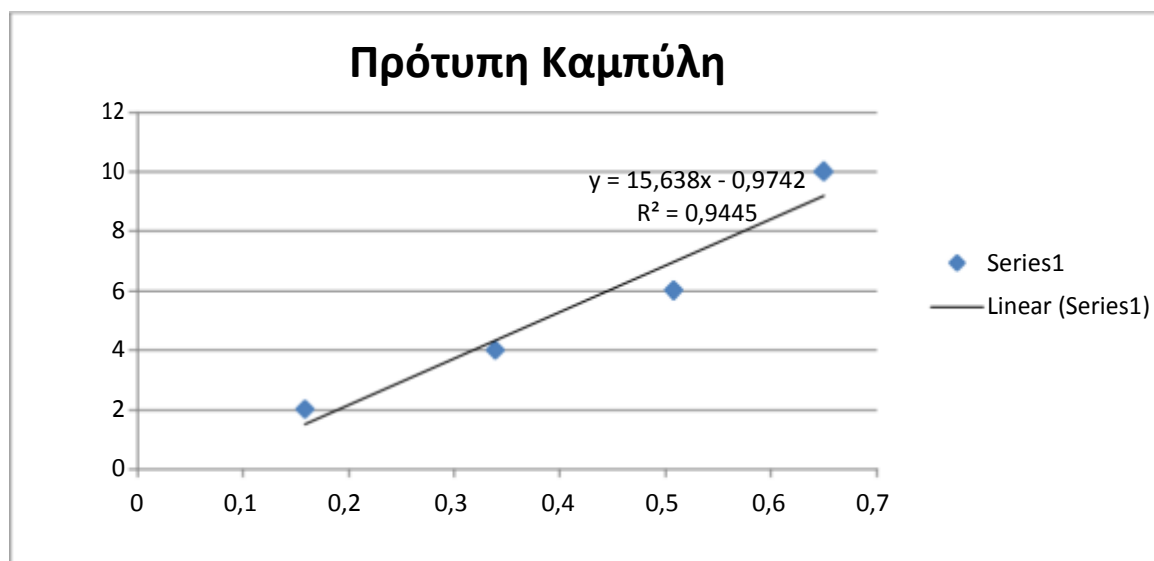
Το περιεχόμενο των γλυκοζαμινογλυκανών των τραχειών μετά από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης ήταν 2,49 μg/mg ιστού ενώ των φυσιολογικών τραχειών 2,96 μg/mg ιστού (Εικόνα). Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, οι γλυκοζαμινογλυκάνες μειώθηκαν, κατά τη διαδικασία της αποκυτταροποίησης, κατά ποσοστό 15,9% του αρχικού τους περιεχομένου. Η διαφορά που βρέθηκε μεταξύ του περιεχομένου των GAGs στις φυσιολογικές και αποκυτταροποιημένες τραχείες δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} > 0,05$).

9.3.4 Ευρήματα Ποσοτικοποίησης Υδροξυπρολίνης

Όπως προαναφέρθηκε, η μέτρηση των επιπέδων της υδροξυπρολίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της περιεκτικότητας σε κολλαγόνο. Για τον έλεγχο της περιεκτικότητας των ιστών σε κολλαγόνο πραγματοποιήθηκε αρχικά η πρότυπη καμπύλη ώστε να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των πρότυπων δειγμάτων απεικονίζονται παρακάτω:

Content	Raw Data (560 1)	Raw Data (600 2)	Blank corrected based on Raw Data (560 1)	Blank corrected based on Raw Data (600 2)	µg hydroxyproline/ well of samples
Blank B	0,044	0,041			
Standard S1	0,203	0,062	0,159	0,021	1,5
Standard S2	0,383	0,087	0,339	0,046	4,3
Standard S3	0,551	0,113	0,508	0,072	7,0
Standard S4	0,471	0,101	0,427	0,061	5,7
Standard S5	0,693	0,13	0,65	0,089	9,2

Πίνακας 11: Αποτελέσματα δειγμάτων πρότυπης καμπύλης.



Στη συνέχεια απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τα δείγματα των ιστών της τραχείας όπως παρουσιάστηκαν από το μηχάνημα SPECTROstar Nano (BMG LABTECH):

Content	Raw Data (560 1)	Raw Data (600 2)	Blank corrected based on Raw Data (560 1)	Blank corrected based on Raw Data (600 2)
Εγγενής ιστός 1	0,454	0,105	0,411	0,064
Εγγενής ιστός 2	0,454	0,084	0,301	0,043
Εγγενής ιστός 3	0,575	0,099	0,532	0,058
Εγγενής ιστός 4	0,288	0,065	0,244	0,025
Εγγενής ιστός 5	0,249	0,061	0,205	0,02
Εγγενής ιστός 6	0,266	0,065	0,223	0,024
Εγγενής ιστός 7	0,427	0,091	0,383	0,051
Εγγενής ιστός 8	0,294	0,07	0,251	0,029
Αποκυτ. ιστός 1	0,489	0,096	0,446	0,055
Αποκυτ. ιστός 2	0,316	0,085	0,272	0,045
Αποκυτ. ιστός 3	0,395	0,075	0,351	0,034
Αποκυτ. ιστός 4	0,577	0,09	0,534	0,05
Αποκυτ. ιστός 5	0,44	0,077	0,396	0,036
Αποκυτ. ιστός 6	0,492	0,082	0,448	0,041
Αποκυτ. ιστός 7	0,292	0,061	0,249	0,021
Αποκυτ. ιστός 8	0,584	0,09	0,54	0,049

Πίνακας 12: Αποτελέσματα δειγμάτων εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών τραχειάς βάσει του SPECTROstar Nano.

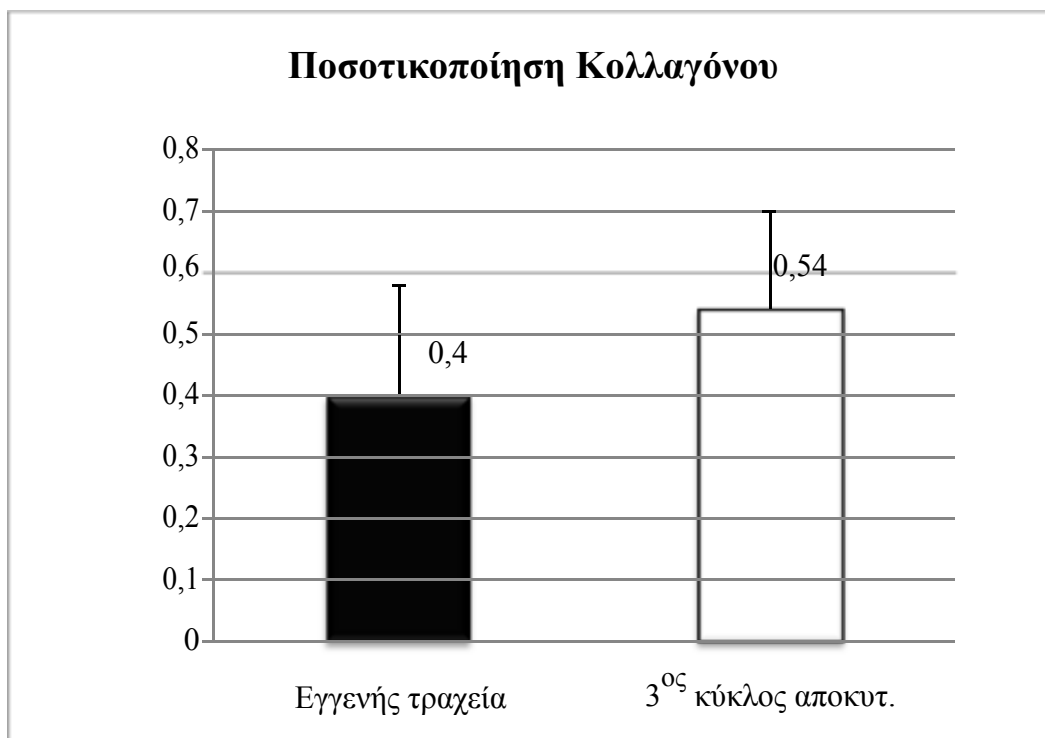
Έπειτα από τη διεξαγωγή των παραπάνω αποτελεσμάτων έγινε μετατροπή βάσει της γραμμικής εξίσωσης ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα της υδροξυπρολίνης/mg ιστού. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης της υδροξυπρολίνης έπειτα από την κανονικοποίηση των δειγμάτων με την εξίσωση $15,638 \cdot X - 0,9742$. Η συγκέντρωση των της υδροξυπρολίνης/οπή υπολογίστηκε ως

εξής: 15,638* (Blank corrected based on Raw Data (560 1))- 0,9742 ενώ η κανονικοποίηση των δειγμάτων σε μg υδροξυπρολίνης/mg ιστού υπολογίστηκε: Συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{ml}$)/ Αρχικό βάρος (mg).

Δείγματα	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{οπή}$)	Αρχικό βάρος (mg)	Κανονικοποίηση μg υδροξυπρολίνης/mg ιστού
Εγγενής ιστός 1	5,45	10,00	0,55
Εγγενής ιστός 2	3,73	10,00	0,37
Εγγενής ιστός 3	7,35	10,00	0,73
Εγγενής ιστός 4	2,84	10,00	0,28
Εγγενής ιστός 5	2,23	10,00	0,22
Εγγενής ιστός 6	2,51	10,00	0,25
Εγγενής ιστός 7	5,02	10,00	0,50
Εγγενής ιστός 8	2,95	10,00	0,30
Αποκυτ. ιστός 1	6,00	10,00	0,60
Αποκυτ. ιστός 2	3,28	10,00	0,33
Αποκυτ. ιστός 3	4,51	10,00	0,45
Αποκυτ. ιστός 4	7,38	10,00	0,74
Αποκυτ. ιστός 5	5,22	10,00	0,52
Αποκυτ. ιστός 6	6,03	10,00	0,60
Αποκυτ. ιστός 7	2,92	10,00	0,29
Αποκυτ. ιστός 8	7,47	10,00	0,75

Πίνακας 13: Αποτελέσματα συγκέντρωσης υδροξυπρολίνης των δειγμάτων εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας.

Επίσης, παρουσιάζεται το διάγραμμα που απεικονίζει την ποσότητα της υδροξυπρολίνης/mg ιστού των εγγενών και αποκυτταροποιημένων ιστών της τραχείας έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης.

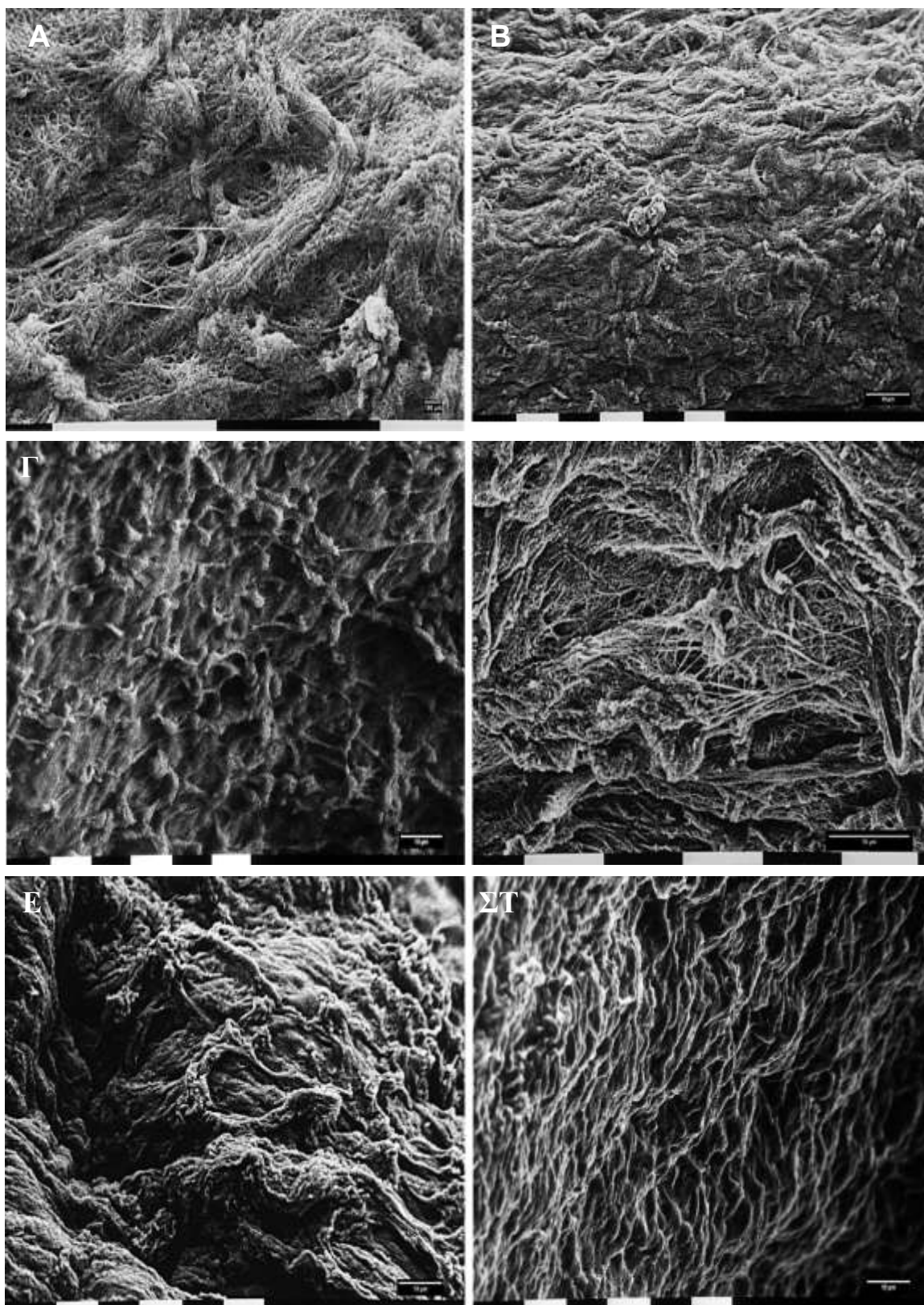


Σχήμα 6: Ποσοτικοποίηση κολλαγόνου.

Ο έλεγχος της ποσοτικοποίησης της υδροξυπρολίνης έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης των τραχειών έδειξε πως το περιεχόμενο της στις αποκυτταροποιημένες τραχείες είναι 0,54 μg υδροξυπρολίνης/mg ιστού ενώ στις φυσιολογικές 0,4 μg υδροξυπρολίνης/mg ιστού (Εικονα). Τα αποτελέσματα δείχνουν διατήρηση και αύξηση κατά 35% του ποσοστού της υδροξυπρολίνης στους αποκυτταροποιημένους ιστούς. Η αύξηση πιθανόν να οφείλεται στην απελευθέρωση του κολλαγόνου κατά τη διαδικασία της αποκυτταροποίησης. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του περιεχομένου υδροξυπρολίνης στις φυσιολογικές και αποκυτταροποιημένες τραχείες ($p\text{-value} > 0,05$).

9.4 Αξιολόγηση Ιστών με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης προκειμένου να εξεταστεί η ποιοτική αξιολόγηση των ιστών της τραχείας. Η ανάλυση των εικόνων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης έδειξε πως η δομή των αποκυτταροποιημένων ιστών έχει παραμείνει ανέπαφη έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης. Συγκεκριμένα, οι ίνες κολλαγόνου φάνηκε να έχουν διατηρηθεί στους αποκυτταροποιημένους ιστούς (Εικόνα 28), επιβεβαιώνοντας τη διατήρηση της δομής του κολλαγόνου. Όπως φάνηκε από τις εικόνες, τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις αποκυτταροποιημένες τραχείες, η εσωτερική και η εξωτερική επιφάνεια παρέμεινε αναλλοίωτη.



Εικόνα 28: Απεικόνιση εικόνων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης σε φυσιολογικές Α,Β,Γ (x4200, x1050, x1000 αντίστοιχα) και αποκυτταροποιημένες τραχείες Δ,Ε,ΣΤ (x2000, x1000, x1000 αντίστοιχα).

9.5 Δεδομένα Εμβιομηχανικής Δοκιμής

Τα δείγματα τραχείας, όπως προαναφέρθηκε φωτογραφήθηκαν οι πλευρικές και μετωπικές πλευρές με έγχρωμη ψηφιακή κάμερα Leica DFC500 (Leica Microsystems GmbH) στο στερεοσκόπιο Nikon SMZ800 (Nikon Instruments Europe BV). Η εσωτερική και η εξωτερική περιφέρεια, το πάχος, η διατομή και το πλάτος των δειγμάτων των δακτυλίων καθώς και το μήκος, το πλάτος και το πάχος των λωρίδων του ιστού υπολογίστηκαν από τις εικόνες, που λήφθηκαν στο στερεοσκόπιο, με το πρόγραμμα Image-Pro Plus v.4.5 (Media Cybernetics Inc). Οι υπολογισμοί του πάχους και του πλάτους παραγματοποιήθηκαν αυτόματα σε εκατό ισαπέχουσες θέσεις κατά μήκος των δακτυλίων περιφέρειας και το μήκος των λωρίδων του ιστού και στη συνέχεια λαμβάνοντας τον μέσο όρο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στους επόμενους πίνακες.

Εγγενής Τραχεία			
Δείγματα ιστού	Πλάτος (mm)	Πάχος (mm)	Μήκος (mm)
Διαμήκης 1α	3,52	0,32	7,63
Διαμήκης 2α	2,95	0,28	11,01
Διαμήκης 3α	3,31	0,28	10,95
Διαμήκης 4α	3,35	0,30	10,47
Διαμήκης 5α	3,43	0,31	11,07
Διαμήκης 6α	3,47	0,26	9,24
Διαμήκης 7α	3,21	0,29	10,51
Διαμήκης 8α	2,68	0,31	8,35
Διαμήκης 9α	2,88	0,33	9,49
Διαμήκης 10α	3,002	0,35	9,04
Διαμήκης 11α	3,07	0,32	8,98
Διαμήκης 12α	3,43	0,31	7,63
Μέσος όρος	3,19	0,31	9,53
Διαμήκης 1β	3,56	0,25	7,76
Διαμήκης 2β	3,16	0,32	11,97
Διαμήκης 3β	3,13	0,25	9,23
Διαμήκης 4β	3,02	0,24	10,17
Διαμήκης 5β	3,70	0,29	7,87
Διαμήκης 6β	3,24	0,31	9,43
Διαμήκης 7β	3,32	0,25	7,21
Διαμήκης 8β	3,62	0,29	9,49
Διαμήκης 9β	3,42	0,36	11,21
Διαμήκης 10β	3,47	0,39	8,9
Διαμήκης 11β	3,64	0,34	5,76
Μέσος όρος	3,39	0,30	9

Πίνακας 14: Αποτελέσματα μετρήσεων πλάτους, πάχους και μήκους των εγγενών τραχειών σε διαμήκη κατεύθυνση στις δυο εκατέρωθεν πλευρές (α, β).

Εγγενής Τραχεία					
Δείγματα ιστού	Πλάτος (mm)	Πάχος (mm)	Εσωτερικό μήκος (mm)	Εξωτερικό μήκος (mm)	Διάμετρος (mm)
Εγκάρσιος 1(πάνω)	1,69	0,35	7,10	9,24	3,11
Εγκάρσιος 2πάνω	1,67	0,27	8,10	9,59	3,24
Εγκάρσιος 3πάνω	1,27	0,31	7,38	9,78	2,56
Εγκάρσιος 4πάνω	1,77	0,33	7,58	9,74	3,86
Εγκάρσιος 5πάνω	1,85	0,33	7,73	9,86	2,94
Εγκάρσιος 6πάνω	1,32	0,42	6,61	9,30	3,11
Εγκάρσιος 7πάνω	1,61	0,35	6,93	9,15	3
Εγκάρσιος 8πάνω	1,45	0,38	6,43	9,04	3,42
Εγκάρσιος 9πάνω	2,56	0,26	7,71	9,50	3,36
Εγκάρσιος 10πάνω	1,63	0,38	7,22	9,68	3,05
Εγκάρσιος 11πάνω	1,57	0,34	7,08	9,34	3,34
Μέσος όρος	1,67	0,34	7,26	9,47	3,18
Εγκάρσιος 1μεσαίο	1,64	0,33	8,42	10,56	3,71
Εγκάρσιος 2μεσαίο	1,67	0,25	7,92	9,42	3,3
Εγκάρσιος 3μεσαίο	0,86	0,20	9,09	10,30	2,92
Εγκάρσιος 4μεσαίο	1,33	0,25	8,22	9,77	3,61
Εγκάρσιος 5μεσαίο	2,02	0,33	7,63	9,89	3,08
Εγκάρσιος 6μεσαίο	1,70	0,32	8,17	10,42	3,45
Εγκάρσιος 7μεσαίο	2,38	0,32	7,39	9,44	3,08
Εγκάρσιος 8μεσαίο	1,54	0,23	7,17	8,95	3,06
Εγκάρσιος 9μεσαίο	1,83	0,21	9,88	10,98	3,12
Εγκάρσιος 10μεσαίο	2,00	0,27	8,42	10,25	3,05
Εγκάρσιος 11μεσαίο	1,16	0,27	6,63	8,61	3,44
Μέσος όρος	1,65	0,27	8,09	9,87	3,25

Πίνακας 15: Αποτελέσματα μετρήσεων πλάτους, πάχους και διαμέτρου των εγγενών τραχειών σε περιφερειακή-εγκάρσια κατεύθυνση σε επάνω και μεσαίο τμήμα.

Αποκυτταροποιημένη Τραχειά			
Δείγματα ιστού	Πλάτος (mm)	Πάχος (mm)	Μήκος (mm)
Διαμήκης 1α	3,37	0,34	6,53
Διαμήκης 2α	3,84	0,35	6,47
Διαμήκης 3α	3,28	0,36	7,56
Διαμήκης 4α	3,64	0,25	7,3
Διαμήκης 5α	3,36	0,32	8,23
Διαμήκης 6α	3,31	0,30	8,43
Διαμήκης 7α	2,82	0,24	4,95
Διαμήκης 8α	3,89	0,35	8,18
Διαμήκης 9α	3,77	0,31	8,04
Διαμήκης 10α	3,37	0,40	8,03
Διαμήκης 11α	3,92	0,48	7,87
Διαμήκης 12α	4,21	0,39	4,38
Μέσος όρος	3,57	0,34	7,16
Διαμήκης 1β	3,23	0,35	6,84
Διαμήκης 2β	3,01	0,42	6,38
Διαμήκης 3β	2,56	0,34	6,69
Διαμήκης 4β	2,90	0,30	9,44
Διαμήκης 5β	3,48	0,42	8,42
Διαμήκης 6β	3,32	0,40	8,81
Διαμήκης 7β	4,21	0,39	5,24
Διαμήκης 8β	3,49	0,31	10,37
Διαμήκης 9β	3,72	0,51	7,17
Διαμήκης 10β	3,15	0,39	5,09
Διαμήκης 11β	3,64	0,39	6,68
Μέσος όρος	3,34	0,38	7,37

Πίνακας 16: Αποτελέσματα μετρήσεων πλάτους, πάχους και μήκους των αποκυτταροποιημένων τραχειών σε διαμήκη κατεύθυνση στις δυο εκατέρωθεν πλευρές (α, β).

Αποκυτταροποιημένη Τραχεία					
Δείγματα ιστού	Πλάτος (mm)	Πάχος (mm)	Εσωτερικό μήκος (mm)	Εξωτερικό μήκος (mm)	Διάμετρος (mm)
Εγκάρσιος 1πάνω	1,53	0,34	6,75	8,75	3,45
Εγκάρσιος 2πάνω	1,67	0,36	7,68	9,91	3,37
Εγκάρσιος 3πάνω	2,24	0,40	7,54	9,92	3,37
Εγκάρσιος 4πάνω	2,17	0,27	7,34	8,83	3,63
Εγκάρσιος 5πάνω	2,50	0,41	7,08	9,48	3,66
Εγκάρσιος 6πάνω	1,92	0,35	7,18	9,59	3,44
Εγκάρσιος 7πάνω	1,91	0,38	7,47	9,78	3,48
Εγκάρσιος 8πάνω	2,31	0,39	7,22	9,64	3,72
Εγκάρσιος 9πάνω	1,75	0,42	6,85	9,36	3,01
Εγκάρσιος 10πάνω	2,15	0,40	7,53	10,06	3,07
Εγκάρσιος 11πάνω	1,76	0,40	7,41	10,14	3,59
Μέσος όρος	1,99	0,37	7,28	9,59	3,43
Εγκάρσιος 1μεσαίο	1,61	0,33	6,88	8,99	3,29
Εγκάρσιος 2μεσαίο	1,80	0,38	7,11	9,80	3,21
Εγκάρσιος 3μεσαίο	2,03	0,35	4,79	7,56	3,34
Εγκάρσιος 4μεσαίο	1,41	0,32	6,66	8,92	3,39
Εγκάρσιος 5μεσαίο	1,56	0,36	6,74	9,27	3,32
Εγκάρσιος 6μεσαίο	1,93	0,47	7,59	10,87	3,18
Εγκάρσιος 7μεσαίο	1,56	0,30	7,69	9,83	3,5
Εγκάρσιος 8μεσαίο	1,38	0,37	7,16	9,70	3,54
Εγκάρσιος 9μεσαίο	1,76	0,50	7,65	10,64	3,11
Εγκάρσιος 10μεσαίο	2,06	0,39	9,58	12,75	3,14
Εγκάρσιος 11μεσαίο	1,43	0,37	8,36	10,24	3,7
Μέσος όρος	1,68	0,38	7,29	9,87	3,33

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μετρήσεων πλάτους, πάχους και διαμέτρου των αποκυτταροποιημένων τραχειών σε περιφερειακή-εγκάρσια κατεύθυνση σε επάνω και μεσαίο τμήμα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν όλοι οι υπολογισμοί ημι-αυτόματα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Mathematica (v.9.0, Wolfram Research Inc, Boston, MA, ΗΠΑ). Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν στην παραμόρφωση αστοχίας (λ_f), την τάση αστοχίας (Σ_f), παραμόρφωση που αντιστοιχεί στο μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (λ_p) και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (M_p) και παρουσιάζονται στους επόμενους πίνακες.

Εγγενής Τραχεία				
Δείγματα ιστού	λ_f	Σ_f	λ_p	M_p
Διαμήκης 1α	2,465	3999,08	2,246	9710
Διαμήκης 1β	2,269	4581,37	2,02	$1,136 \times 10^4$
Διαμήκης 2α	1,546	2453,03	1,47	$1,338 \times 10^4$
Διαμήκης 2β	1,48	2684	1,426	$1,676 \times 10^4$
Διαμήκης 3α	2,135	4672,82	2,061	$1,634 \times 10^4$
Διαμήκης 3β	1,851	5474,4	1,61	$1,606 \times 10^4$
Διαμήκης 4α	1,839	5288,42	1,726	$1,942 \times 10^4$
Διαμήκης 4β	1,714	1790,93	1,691	8221
Διαμήκης 5α	1,904	2564,4	1,876	$1,274 \times 10^4$
Διαμήκης 5β	1,896	3517,51	1,815	$1,3 \times 10^4$
Διαμήκης 6α	2,399	5341,73	2,197	$1,371 \times 10^4$
Διαμήκης 6β	2,143	4280,08	1,841	$1,09 \times 10^4$
Διαμήκης 7α	1,966	4194,33	1,819	$1,157 \times 10^4$
Διαμήκης 7β	1,381	3680,78	1,25	$1,712 \times 10^4$
Διαμήκης 8α	2,147	4685	1,926	$1,361 \times 10^4$
Διαμήκης 8β	2,030	4046,08	1,929	$1,37 \times 10^4$
Διαμήκης 9α	1,730	2893,54	1,548	$1,099 \times 10^4$
Διαμήκης 9β	1,934	2392	1,757	8378
Διαμήκης 10α	2,077	3746,91	1,754	$1,071 \times 10^4$
Διαμήκης 10β	1,891	2430,79	1,826	7095
Διαμήκης 11α	1,642	2818,01	1,5	8708
Διαμήκης 11β	1,590	3246,92	1,45	$1,227 \times 10^4$
Διαμήκης 12α	1,694	3415,47	1,549	$1,685 \times 10^4$

Πίνακας 18: Απεικόνιση αποτελεσμάτων των εγγενών τραχειών αυτά αφορούν στην παραμόρφωση αστοχίας (λ_f), την τάση αστοχίας (Σ_f), παραμόρφωση που αντιστοιχεί στο μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (λ_p) και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (M_p) στη διαμήκη κατεύθυνση

Εγγενής Τραχεία				
Δείγματα ιστού	λf	Σf	λp	Mp
Εγκάρσιος 1πάνω	1,703	3159,29	1,633	9451
Εγκάρσιος 1μεσαίο	1,388	1636,49	1,293	9297
Εγκάρσιος 2πάνω	1,579	2495,31	1,502	1,402x10 ⁴
Εγκάρσιος 2μεσαίο	1,505	1999,78	1,389	1,185x10 ⁴
Εγκάρσιος 3πάνω	1,539	4049,89	1,495	1,8x10 ⁴
Εγκάρσιος 3μεσαίο	1,40	3097,59	1,219	1,554x10 ⁴
Εγκάρσιος 4πάνω	1,569	2855,32	1,434	1,169x10 ⁴
Εγκάρσιος 4μεσαίο	1,376	2745,09	1,28	1,723x10 ⁴
Εγκάρσιος 5πάνω	1,616	3252,64	1,473	9712
Εγκάρσιος 5μεσαίο	1,874	1977,55	1,63	6151
Εγκάρσιος 6πάνω	1,613	2278,86	1,518	8848
Εγκάρσιος 6μεσαίο	1,985	2462,93	1,817	8850
Εγκάρσιος 7πάνω	1,6	1971,45	1,319	8245
Εγκάρσιος 7μεσαίο	1,737	1634,71	1,607	6507
Εγκάρσιος 8πάνω	1,386	1878,9	1,338	9913
Εγκάρσιος 8μεσαίο	1,337	1436,27	1,308	1,392x10 ⁴
Εγκάρσιος 9πάνω	1,683	3535,63	1,417	1,032x10 ⁴
Εγκάρσιος 9μεσαίο	1,436	1411	1,346	1,005x10 ⁴
Εγκάρσιος 10πάνω	1,542	2401,12	1,265	1,058x10 ⁴
Εγκάρσιος 10μεσαίο	1,625	1479,27	1,471	7319
Εγκάρσιος 11πάνω	1,511	2123,55	1,458	1,369x10 ⁴
Εγκάρσιος 11μεσαίο	1,531	1752,74	1,243	7695

Πίνακας 19: Απεικόνιση αποτελεσμάτων των εγγενών τραχειών αυτά αφορούν στην παραμόρφωση αστοχίας (λf), την τάση αστοχίας (Σf), παραμόρφωση που αντιστοιχεί στο μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (λp) και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (Mp) στην εγκάρσια κατεύθυνση

Αποκυτταροποιημένη Τραχεία				
Δείγματα ιστού	λf	Σf	λp	Μp
Διαμήκης 1α	2,477	3249,68	2,001	5048
Διαμήκης 1β	1,896	1977,95	1,827	4148
Διαμήκης 2α	2,434	2515,9	2,137	3425
Διαμήκης 2β	1,995	1786,88	1,885	4184
Διαμήκης 3α	2,977	2474,61	2,61	3100
Διαμήκης 3β	2,126	4259,14	2,117	1,049x10 ⁴
Διαμήκης 4α	2,341	4250,35	2,132	6938
Διαμήκης 4β	2,334	2939,61	1,925	3686
Διαμήκης 5α	1,933	1870,85	1,657	4242
Διαμήκης 5β	2,739	2522,26	2,594	4577
Διαμήκης 6α	2,050	2557,26	1,655	3493
Διαμήκης 6β	2,107	1487	1,966	3066
Διαμήκης 7α	2,179	5375,13	2,074	1,203x10 ⁴
Διαμήκης 7β	2,005	1785,79	1,87	4696
Διαμήκης 8α	2,025	2502,87	1,893	5248
Διαμήκης 8β	2,293	2115	2,05	4180
Διαμήκης 9α	2,122	2006,87	1,828	3338
Διαμήκης 9β	2,028	1105,12	1,965	2356
Διαμήκης 10α	2,54	2178,8	2,256	3244
Διαμήκης 10β	2,345	2581,78	2,036	7181
Διαμήκης 11α	2,720	1117,02	2,17	1155
Διαμήκης 11β	2,396	1679,73	2,064	2168
Διαμήκης 12α	2,220	2708,56	1,932	5060

Πίνακας 20: Απεικόνιση αποτελεσμάτων των αποκυτταροποιημένων τραχειών αυτά αφορούν στην παραμόρφωση αστοχίας (λf), την τάση αστοχίας (Σf), παραμόρφωση που αντιστοιχεί στο μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (λp) και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (Μp) στη διαμήκη κατεύθυνση

Αποκυτταροποιημένη Τραχεία				
Δείγματα ιστού	λf	Σf	λp	Μp
Εγκάρσιος 1πάνω	1,455	3586,08	1,368	$1,996 \times 10^4$
Εγκάρσιος 1μεσαίο	1,348	2850,94	1,267	$2,003 \times 10^4$
Εγκάρσιος 2πάνω	1,579	4002,16	1,518	$1,39 \times 10^4$
Εγκάρσιος 2μεσαίο	1,978	4349,1	1,722	$1,496 \times 10^4$
Εγκάρσιος 3πάνω	1,490	1642,19	1,448	8688
Εγκάρσιος 3μεσαίο	1,784	2583,93	1,726	9770
Εγκάρσιος 4πάνω	1,555	3448,96	1,407	$1,587 \times 10^4$
Εγκάρσιος 4μεσαίο	1,355	2474,69	1,231	$1,324 \times 10^4$
Εγκάρσιος 5πάνω	1,59	2196	1,431	9790
Εγκάρσιος 5μεσαίο	1,410	2677,81	1,275	$1,19 \times 10^4$
Εγκάρσιος 6πάνω	1,587	2665,22	1,503	9944
Εγκάρσιος 6μεσαίο	1,435	1205,75	1,381	8532
Εγκάρσιος 7πάνω	3,573	9074,51	1,472	8275
Εγκάρσιος 7μεσαίο	1,504	1177,22	1,381	5761
Εγκάρσιος 8πάνω	3,478	6938,22	2,602	3732
Εγκάρσιος 8μεσαίο	1,533	2295,55	1,422	$1,053 \times 10^4$
Εγκάρσιος 9πάνω	1,553	2270,44	1,368	9947
Εγκάρσιος 9μεσαίο	1,399	1457,83	1,326	9384
Εγκάρσιος 10πάνω	1,656	1676,89	1,579	$1,03 \times 10^4$
Εγκάρσιος 10μεσαίο	1,412	1537,21	1,271	8402
Εγκάρσιος 11πάνω	1,505	1496,63	1,368	6829
Εγκάρσιος 11μεσαίο	1,386	2657,4	1,297	$1,575 \times 10^4$

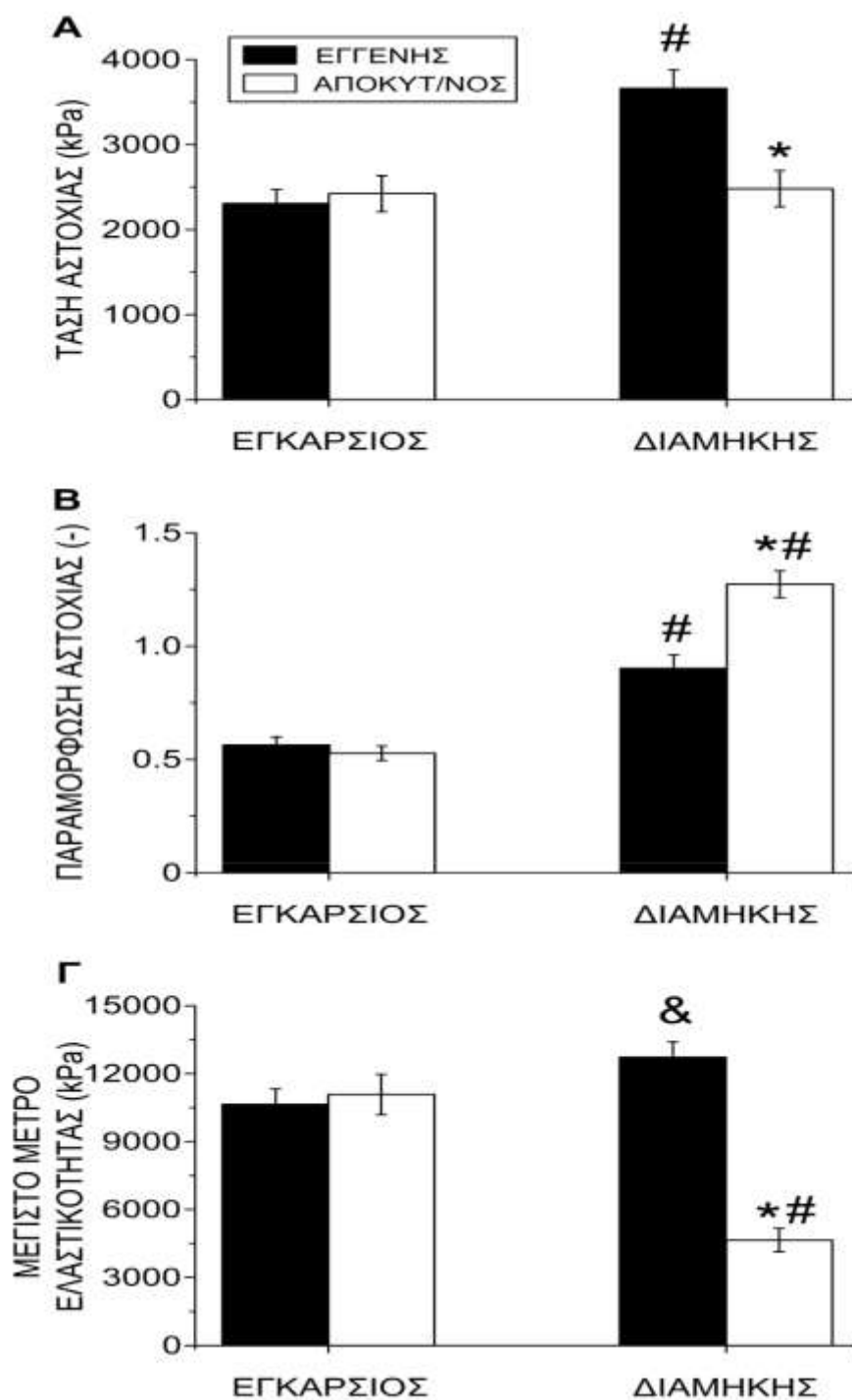
Πίνακας 21: Απεικόνιση αποτελεσμάτων των αποκυτταροποιημένων τραχειών αυτά αφορούν στην παραμόρφωση αστοχίας (λf), την τάση αστοχίας (Σf), παραμόρφωση που αντιστοιχεί στο μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (λp) και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας (Μp) στην εγκάρσια κατεύθυνση.

Το παρακάτω σχήμα (σχήμα 7) παρουσιάζει την τάση αστοχίας, την παραμόρφωση αστοχίας και τα δεδομένα μέγιστου μέτρου ελαστικότητας σε εγγενείς και αποκυτταροποιημένες τραχείες. Σε σύγκριση με την πρώτη, η τελευταία εμφάνισε σημαντικά αυξημένη παραμόρφωση αστοχίας, αλλά μειώθηκε η τάση αστοχίας και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας στη διαμήκη κατεύθυνση. Δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των εγγενών και των αποκυτταροποιημένων τραχειών στην περιφερειακή κατεύθυνση. Στις εγγενείς τραχείες, μεγαλύτερες τιμές παραμέτρων βρέθηκαν κατά μήκος σε σχέση με την περιφέρεια, με όλες τις κατευθυντήριες διαφορές να έχουν

μεγάλη στατιστική σημασία. Σε αντίθεση με τις εγγενείς τραχείες, δεν υπήρχαν διαφορές στην κατεύθυνση όσον αφορά στην τάση αστοχίας στις αποκυτταροποιημένες τραχείες, ενώ η παραμόρφωση αστοχίας ήταν σημαντικά υψηλότερη κατά μήκος και το μέγιστο μέτρο ελαστικότητας ήταν σημαντικά υψηλότερο περιφερειακά-εγκάρσια.

Οι εμβιομηχανικές δοκιμές αποκάλυψαν ορισμένες διαφορές στις παραμέτρους αστοχίας μεταξύ εγγενών και αποκυτταροποιημένων τραχειών, υποδηλώνοντας ότι οι τελευταίες ήταν σημαντικά ασθενέστερες και πιο μαλακές αλλά πιο εκτάσιμες από την πρώτη, αν και μόνο κατά μήκος (Σχήμα 7). Τα τμήματα της τραχείας που προορίζονταν για το σκοπό αυτής της μελέτης περιελάμβαναν σχεδόν ολόκληρη την τραχεία και δείγματα των οποίων η ανατομική θέση ήταν γνωστή δοκιμάστηκαν, δικαιώνοντάς μας να συμπεράνουμε ότι οι διαπιστωθείσες διαφορές ήταν ανεξάρτητες από την ανατομική θέση του εξεταζόμενου δείγματος. Παρ'όλα αυτά, ακόμη και η αντιμετώπιση του θέματος της ανατομικής εξάρτησης από τις εμβιομηχανικές ιδιότητες του ιστού έδειξε ότι οι παράμετροι αστοχίας ήταν ανεξάρτητες από την περιοχή.

Οι μονοαξονικές δοκιμές επιλέχθηκαν επειδή αντιπροσωπεύουν ένα απλό μέσο προσδιορισμού της ακαμψίας, της εκτασιμότητας και της αντοχής του βιολογικού ιστού, αλλά τα αποτελέσματά μας θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με γενικότερα πρωτόκολλα πολυαξονικών δοκιμών. Αυτές είναι τεχνικά απαιτητικές, αλλά σε αντίθεση με την μονοαξονική τάση που συγκρίνει τις ιδιότητες μεταξύ των κατευθύνσεων με τη δοκιμή διαφορετικών δειγμάτων (π.χ. περιμετρικά-εγκάρσια έναντι διαμήκους), χωρίς να διατηρείται η δομική ακεραιότητα του αγγειακού τοιχώματος, ο έλεγχος του φουσκώματος σε άθικτες τραχείες επιτρέπει ταυτόχρονη εξέταση της απόκρισης παραμόρφωσης-τάσης σε όλες τις κύριες κατευθύνσεις υπό φυσιολογικές συνθήκες φόρτωσης.



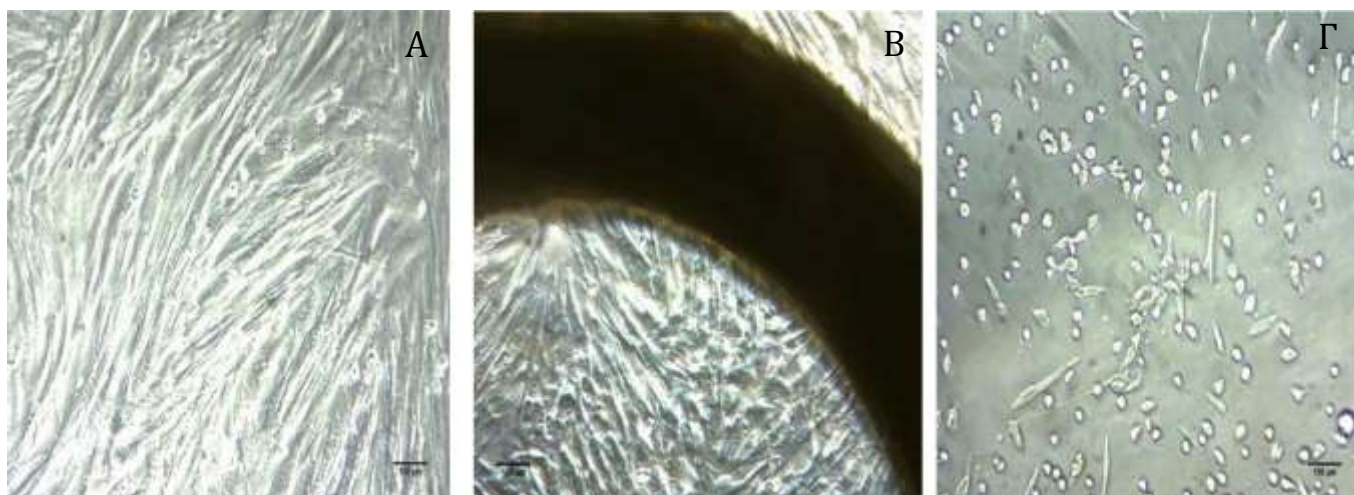
Σχήμα 7: Συγκρίσεις σε (Α) τάση αστοχίας, (Β) παραμόρφωση αστοχίας και (Γ) μέγιστο μέτρο ελαστικότητας μεταξύ εγγενών και αποκυτταροποιημένων τραχειών για κάθε κατεύθυνση ιστού, καθώς και μεταξύ διευθύνσεων (εγκάρσιος και διαμήκης) για κάθε τύπο τραχείας. Το σύμβολο * υποδηλώνει $p < 10^{-4}$ σε σύγκριση με τις εγγενείς τραχείες, ενώ τα σύμβολα # και & υποδηλώνουν $p < 10^{-4}$ και $p < 0.05$ σε σύγκριση με την περιφερειακή-εγκάρσια κατεύθυνση.

9.6 Αξιολόγηση Κυτταροτοξικότητας Πρωτοκόλλου Αποκυτταροποίησης

Στην ιστομηχανική έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες πηγές κυττάρων για την επανακυτταροποίηση κριωμάτων. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν βασικό παράγοντα για την επιτυχή αναγέννηση των ιστών. Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος από ομφάλιο λώρο (WJ MSCs) προκειμένου να ελεγχθεί η κυτταροτοξικότητα των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αποκυτταροποίηση των ιστών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν 2 έλεγχοι.

9.6.1 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας με τεστ επαφής- Δοκιμασία Α

Δοκιμασία Α- τεστ επαφής



Εικόνα 29: Απεικόνιση της καλλιέργειας των WJ MSCs με την προσθήκη (A) καλλιεργητικού υλικού, (B) καλλιεργητικού υλικού και ιστού αποκυτταροποιημένης τραχείας και (Γ) καλλιεργητικού υλικού με 10% DMSO.

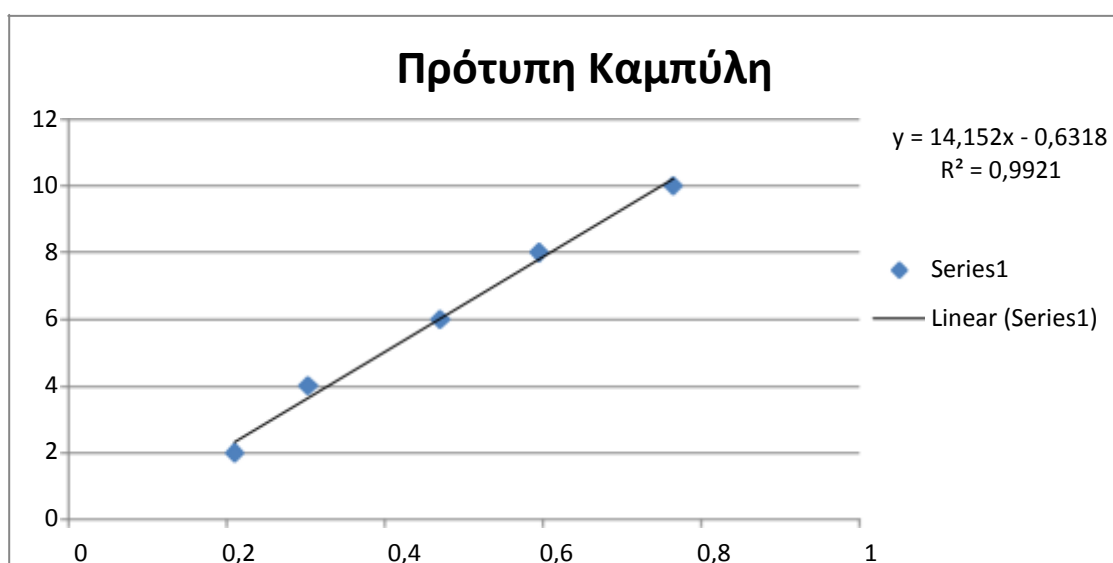
Τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα ομφάλιου λώρου (WJ MSCs), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό και αποκυτταροποιημένη τραχεία αναπτύχθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν φυσιολογικά συγκρινόμενα με τα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί μόνο με την προσθήκη καλλιεργητικού υλικού (Εικόνα 29 A,B). Ωστόσο, παρατηρήθηκε απόπτωση των κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί με καλλιεργητικό υλικό και 10% DMSO (Εικόνα 29 Γ).

9.6.2 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας –Δοκιμασία Β

Για την συγκεκριμένη δοκιμασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος του μεταβολισμού ATP των ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων σε καλλιέργεια χωρίς την παρουσία και με την παρουσία αποκυτταροποιημένης τραχείας. Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των διαλυμάτων αποκυτταροποίησης στους ιστούς πραγματοποιήθηκε αρχικά η πρότυπη καμπύλη ώστε να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των πρότυπων δειγμάτων απεικονίζονται παρακάτω:

Δείγματα Πρότυπης καμπύλης	Raw Data (570)	Blank corrected based on Raw Data (570)
Blank B	0,045	-
Standard S1	0,254	0,21
Standard S2	0,348	0,303
Standard S3	0,515	0,47
Standard S4	0,64	0,595
Standard S5	0,81	0,765

Πίνακας 22: Αποτελέσματα δειγμάτων πρότυπης καμπύλης.



Στη συνέχεια απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τα δείγματα των μεσεγγυματικών κυττάρων και των αποκυτταροποιημένων ιστών της τραχείας όπως παρουσιάστηκαν από το μηχάνημα SPECTROstar Nano (BMG LABTECH):

Δείγματα	Raw Data (570)	Blank corrected based on Raw Data (570)
WJ MSCs 1	0,5	0,473
WJ MSCs 2	0,49	0,46
WJ MSCs 3	0,72	0,695
WJ MSCs 4	0,71	0,6785
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 1	0,68	0,658
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 2	0,72	0,6905
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 3	0,78	0,7535
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 4	0,69	0,659

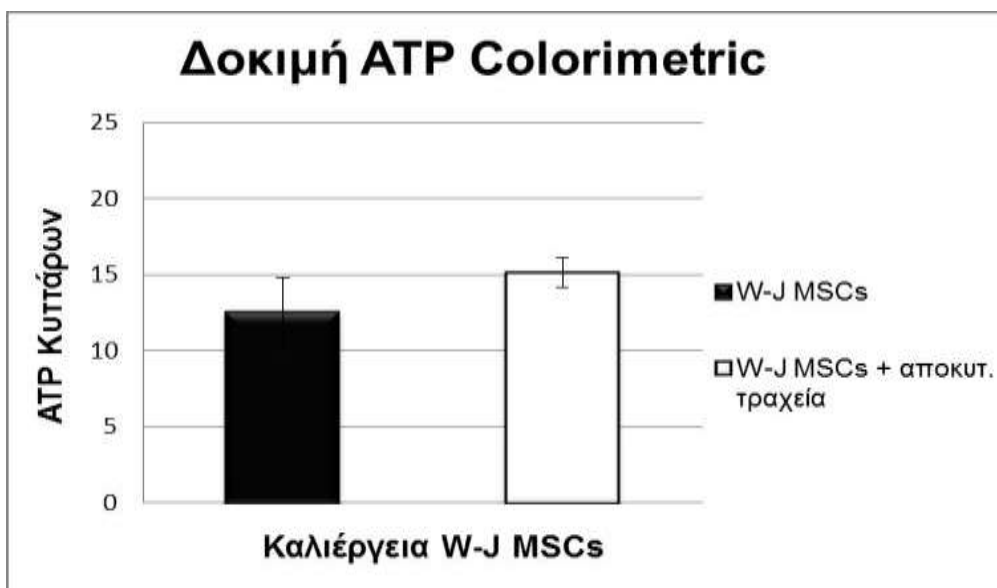
Πίνακας 23: Αποτελέσματα δειγμάτων WJ MSCs και WJ MSCs+αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας βάσει του SPECTROstar Nano.

Έπειτα από τη διεξαγωγή των παραπάνω αποτελεσμάτων έγινε μετατροπή βάσει της γραμμικής εξίσωσης ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα nmol ATP των κυττάρων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσότητας ATP που μεταβολίζουν τα κύτταρα έπειτα από την κανονικοποίηση των δειγμάτων με την εξίσωση $14,152 \cdot x - 0,6318$. Η ποσότητα ATP υπολογίστηκε ως εξής: $14,152 \cdot x$ (Blank corrected based on Raw Data (570)) $- 0,6318$ ενώ η κανονικοποίηση των δειγμάτων σε nmol ATP βάσει κυττάρων υπολογίστηκε: nmol ATP/ Αριθμός κυττάρων $\times 10^6$.

Περιεχόμενα	nmol ATP	Αριθμός κυττάρων x 10 ⁶	Κανικοποίηση σε nmol ATP βάσει κυττάρων
WJ MSCs 1	6,06	1,2	5,05
WJ MSCs 2	5,87	1,2	4,89
WJ MSCs 3	9,20	1,3	7,07
WJ MSCs 4	8,97	1,3	6,9
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 1	8,68	1,2	7,23
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 2	9,14	1,2	7,61
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 3	10,03	1,3	7,71
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 4	8,69	1,3	6,68

Πίνακας 24: Αποτελέσματα ποσότητας nmol ATP των δειγμάτων των WJ MSCs και WJ MSCs+αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας.

Επίσης, παρουσιάζεται το διάγραμμα που απεικονίζει την ποσότητα nmol ATP των δειγμάτων των WJ MSCs και WJ MSCs+αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης.



Σχήμα 8: Έλεγχος μεταβολισμού των κυττάρων.

Τα κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν με καλλιεργητικό υλικό το οποίο περιείχε και την αποκυτταροποιημένη τραχεία φάνηκε να μεταβολίζουν ATP σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό απ'ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο με την προσθήκη καλλιεργητικού υλικού (Σχήμα 8) ($p\text{-value}>0.05$). Αυτό μας έδειξε πως τα διαλύματα της αποκυτταροποίησης δεν επηρέασαν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των κυττάρων.

9.6.2.1 Προσδιορισμός Ρυθμού Πολλαπλασιασμού WJ MSCs (CDT)

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και έπειτα από κάθε ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer προκειμένου να υπολογιστεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους και αν αξιολογηθεί κατά πόσο επηρεάστηκε η ανάπτυξή τους από τα διαλύματα αποκυτταροποίησης. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν 2 συνθήκες καλλιέργειών όπου στη μια περίπτωση καλλιεργήθηκαν μόνο μεσεγχυματικά κύτταρα ενώ στην δεύτερη μεσεγχυματικά κύτταρα με αποκυτταροποιημένη τραχεία.

Δείγματα	Ανακαλλιέργεια (P)	Χρόνος μεταξύ ανακαλλιεργειών (ώρες)	Πληθυσμός κυττάρων ($N_1 \rightarrow N_2$)	Ζωτικότητα κυττάρων (%)
WJ MSCs 1	P1 \rightarrow P2	120	$6 \times 10^3 \rightarrow 2,5 \times 10^6$	91
WJ MSCs 2	P1 \rightarrow P2	120	$7,2 \times 10^3 \rightarrow 2,6 \times 10^6$	91
WJ MSCs 3	P1 \rightarrow P2	120	$6,8 \times 10^3 \rightarrow 2,3 \times 10^6$	89
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 1	P1 \rightarrow P2	120	$7,1 \times 10^3 \rightarrow 2,7 \times 10^6$	90
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 2	P1 \rightarrow P2	120	$6,9 \times 10^3 \rightarrow 2,8 \times 10^6$	88
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 3	P1 \rightarrow P2	120	$6,9 \times 10^3 \rightarrow 2,5 \times 10^6$	89

Πίνακας 25: Καταγραφή πληθυσμού κυττάρων/ανακαλλιέργεια για το ίδιο δείγμα WJ MSCs στις δυο διαφορετικές συνθήκες: καλλιέργεια WJ MSCs και WJ MSCs+αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας

Στη συνέχεια βάσει του παρακάτω αλγορίθμου υπολογίστηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού προκειμένου να συγκριθούν οι καλλιέργειες.

$$CDT = t / \{ \log_{10} (N/N_0) \times 3,32 \}$$

T= χρόνος σε ώρες

N= τελικός αριθμός κυττάρων

N₀= αρχικός αριθμός κυττάρων

3,32= σταθερά

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Δείγματα	Ανακαλλιέργεια (P)	Ρυθμός διπλασιασμού κυττάρων CDT (ώρες)	Μέσος όρος ρυθμού διπλασιασμού κυττάρων (CDT)
WJ MSCs 1	P1 ->P2	58,39	63,93
WJ MSCs 2	P1 ->P2	64,89	
WJ MSCs 3	P1 ->P2	68,49	
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 1	P1 ->P2	62,33	62,13
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 2	P1 ->P2	59,43	
WJ MSCs + αποκυτ.τραχεία 3	P1 ->P2	64,63	

Πίνακας 26: Υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού κυττάρων (CDT) για το ίδιο δείγμα WJ-MSCs στις δυο διαφορετικές συνθήκες: καλλιέργεια WJ-MSCs και WJ-MSCs + αποκυτταροποιημένων ιστών τραχείας

Όπως διαπιστώθηκε από τα παραπάνω αποτελέσματα ο ρυθμός διπλασιασμού των κυττάρων (CDT) είναι παρόμοιος σε όλες τις καλλιέργειες και στις δυο συνθήκες. Ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε πως η αποκυτταροποιημένη τραχεία και κατ'επέκταση τα διαλύματα αποκυτταροποίησης δε φάνηκε να επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επίσης, η ζωτικότητα των κυττάρων ήταν πολύ καλή σε όλες τις καλλιέργειες κάτι που επιβεβαιώνει το παραπάνω συμπέρασμα.

9.7 Έλεγχος βιοσυμβατότητας και ανοσιακής απόκρισης εμφυτευμένου ικριώματος τραχείας *in vivo*

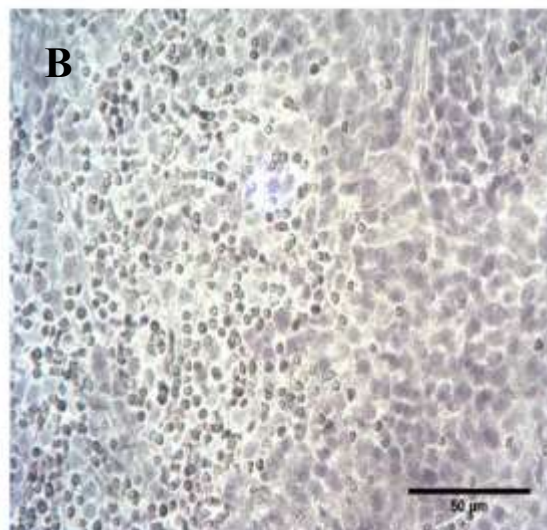
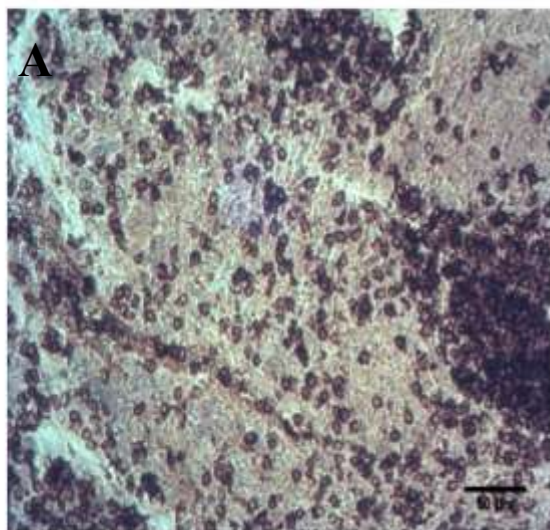
Κατά το χειρουργείο λήψης ανακτήθηκαν όλα τα δείγματα τραχείας που είχαν εμφυτευθεί. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για μονιμοποίηση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 8.4 ώστε να ελεγχθούν για τη έκφραση των αντισωμάτων anti-CD4, anti-CD3, anti-CD11b ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές 5μm. Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος των αντισωμάτων με γνωστά δείγματα θετικού ελέγχου (positive control) και αρνητικού ελέγχου (negative control) ώστε να επιβεβαιωθεί η σωστή λειτουργία και έκφραση των αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ιστός σπλήνας αρουραίου για το anti-CD3 και anti-CD11b και ιστός νεφρού για το anti-CD4 ενώ ως δείγμα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε απλός ιστός τραχείας ο οποίος δεν είχε μεταμοσχευθεί. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

- **CD 3:** Για τον συγκεκριμένο έλεγχο, οι ιστοί επώαστηκαν με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού ελέγχου-σπλήνας (εικόνα Α) και αρνητικού ελέγχου-τραχείας (εικόνα Γ) και μόνο με πρωτογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού ελέγχου-σπλήνας (εικόνα Β) και δείγμα αρνητικού ελέγχου-τραχείας (εικόνα Δ) ώστε να αξιολογηθεί η έκφραση του αντισώματος.

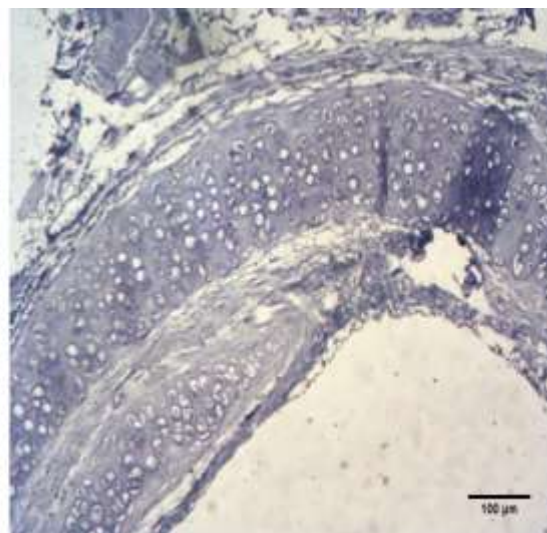
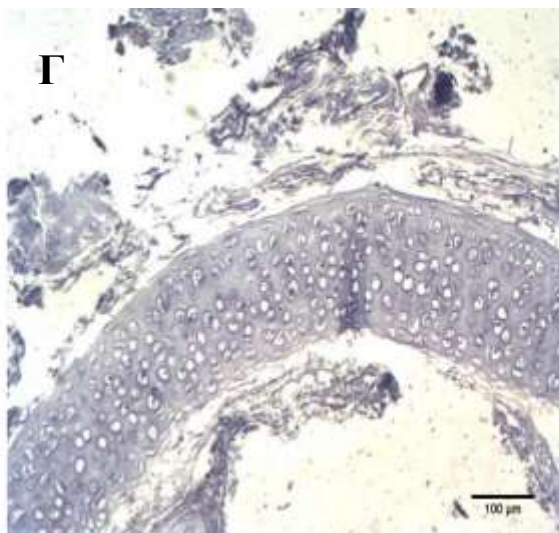
Πρωτογενές και
Δευτερογενές αντίσωμα

Πρωτογενές αντίσωμα

Δείγμα
θετικού
ελέγχου



Δείγμα
αρνητικού
ελέγχου



Εικόνα 30: Απεικόνιση ιστολογικών τομών σημασμένες με πρωτογενές (anti-CD3) και δευτερογενές αντίσωμα. Σήμανση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Α) και αρνητικού (Εικόνα Γ) ελέγχου για έλεγχο έκφρασης αντισωμάτων και σήμανση μόνο με πρωτογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Β) και αρνητικού (Εικόνα Δ) ελέγχου

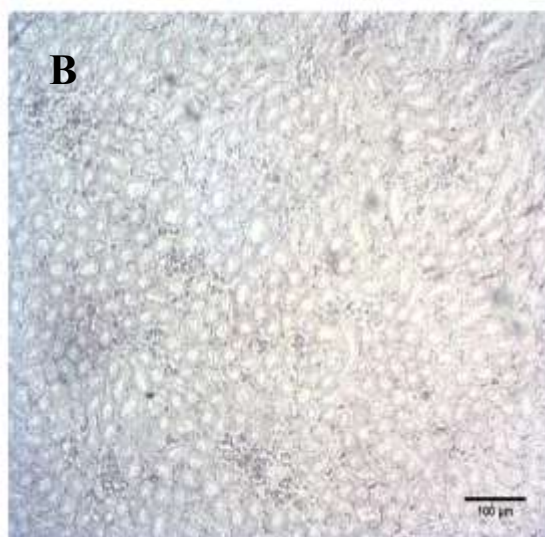
- **CD 4:** Για τον συγκεκριμένο έλεγχο, οι ιστοί επώαστηκαν με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού ελέγχου-νεφρού (εικόνα Α) και αρνητικού ελέγχου-τραχείας (εικόνα Γ) και μόνο με πρωτογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού ελέγχου-νεφρού (εικόνα Β) και δείγμα αρνητικού ελέγχου-τραχείας (εικόνα Δ) ώστε να αξιολογηθεί η έκφραση του αντισώματος.

**Πρωτογενές και
Δευτερογενές αντίσωμα**

Πρωτογενές αντίσωμα

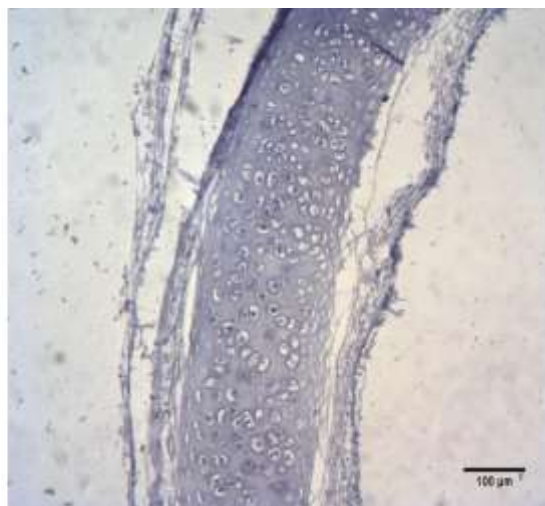
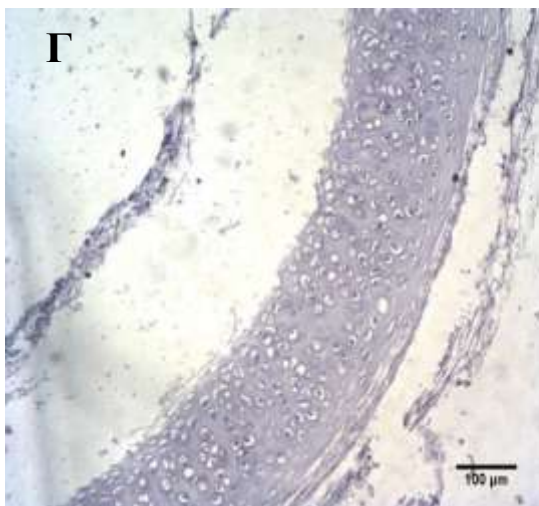
A

**Δείγμα
θετικού
ελέγχου**



Γ

**Δείγμα
αρνητικού
ελέγχου**

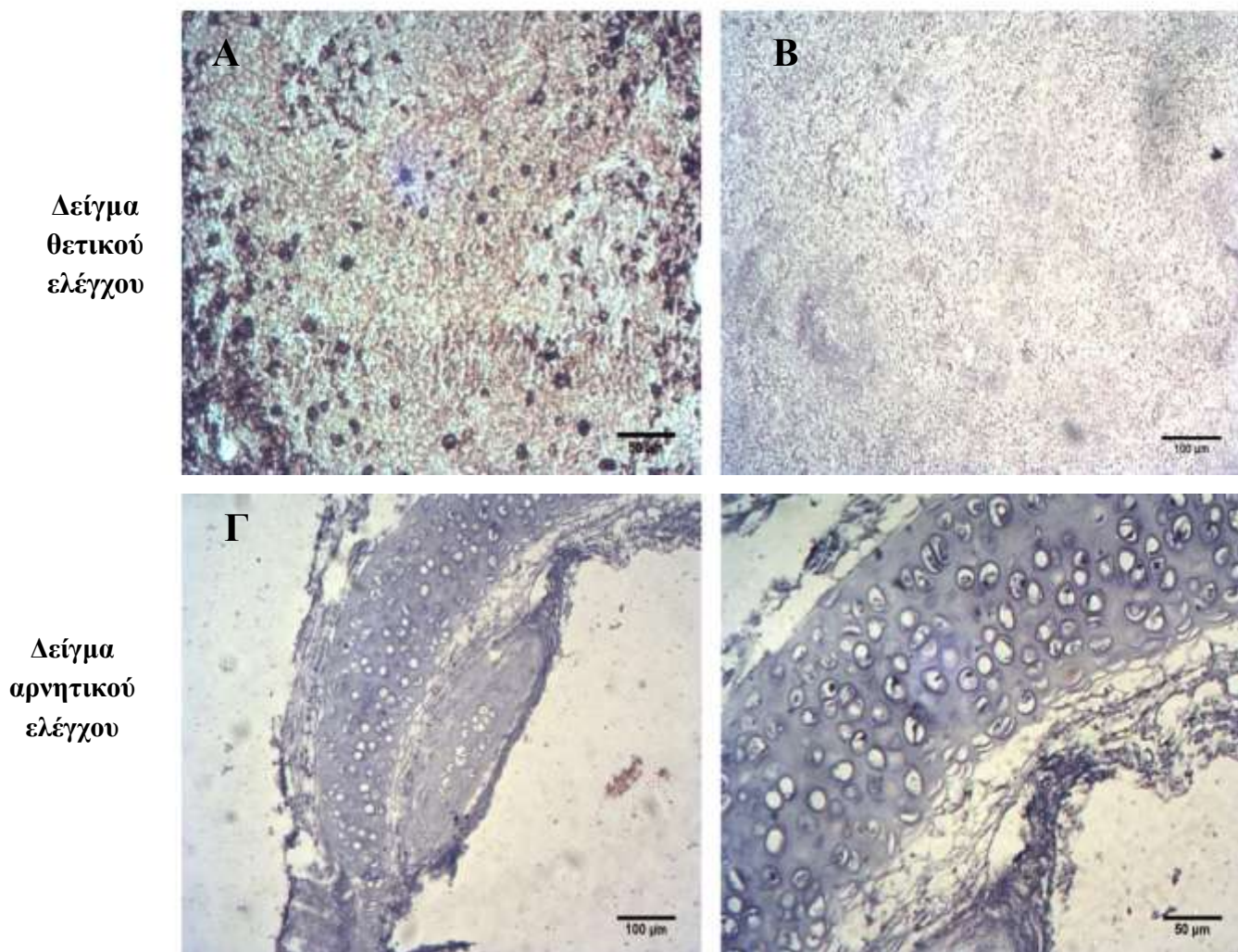


Εικόνα 31: Απεικόνιση ιστολογικών τομών σημασμένες με πρωτογενές (anti-CD4) και δευτερογενές αντίσωμα. Σήμανση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Α) και αρνητικού (Εικόνα Γ) ελέγχου για έλεγχο έκφρασης αντισωμάτων και σήμανση μόνο με πρωτογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Β) και αρνητικού (Εικόνα Δ) ελέγχου.

- **CD 11b:** Για τον συγκεκριμένο έλεγχο, οι ιστοί επώαστηκαν με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού ελέγχου-σπλήνας (εικόνα Α) και αρνητικού ελέγχου-τραχείας (εικόνα Γ) και μόνο με πρωτογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού ελέγχου-σπλήνας (εικόνα Β) και δείγμα αρνητικού ελέγχου-τραχείας (εικόνα Δ) ώστε να αξιολογηθεί η έκφραση του αντισώματος.

**Πρωτογενές και
Δευτερογενές αντίσωμα**

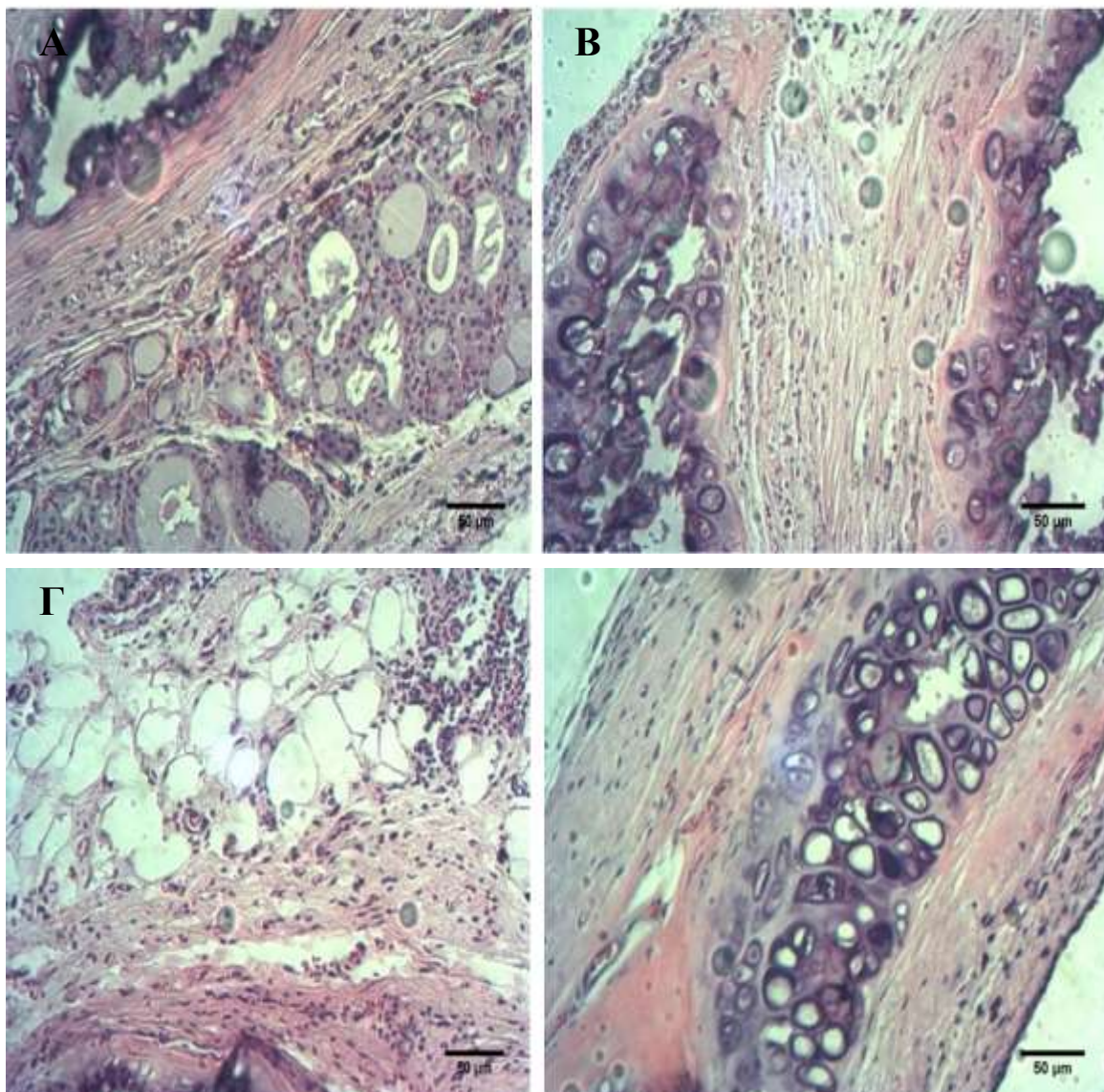
Πρωτογενές αντίσωμα



Εικόνα 32: Απεικόνιση ιστολογικών τομών σημασμένες με πρωτογενές (anti-CD11b) και δευτερογενές αντίσωμα. Σήμανση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Α) και αρνητικού (Εικόνα Γ) ελέγχου για έλεγχο έκφρασης αντισωμάτων και σήμανση μόνο με πρωτογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Β) και αρνητικού (Εικόνα Δ) ελέγχου.

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες, διαπιστώθηκε πως τα αντισώματα εκφράζονται σωστά στα δείγματα οπότε συνεχίστηκε ο έλεγχος βιοσυμβατότητας και ανοσιακής απάντησης στα εμφυτευμένα δείγματα τραχείας. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε αποκυτταροποιημένα δείγματα τραχείας αρουραίου DA που εμφυτεύθηκαν σε αρουραίους Sprague Dawley (DAαποκ./SD) και σε εγγενείς τραχείες αρουραίου DA που εμφυτεύθηκαν σε αρουραίους Sprague Dawley (DAεγγενής./SD). Αρχικά πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη και εοσίνη (H&E) για τον έλεγχο της παρουσίας πυρήνων και την εμφάνιση των κυττάρων ανοσιακής απόκρισης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός έλεγχος των δειγμάτων με τα αντισώματα anti-CD4, anti-CD3, anti-CD11b. Τα αποτελέσματα της ανοσιακής απάντησης των δειγμάτων αυτών απεικονίζονται παρακάτω.

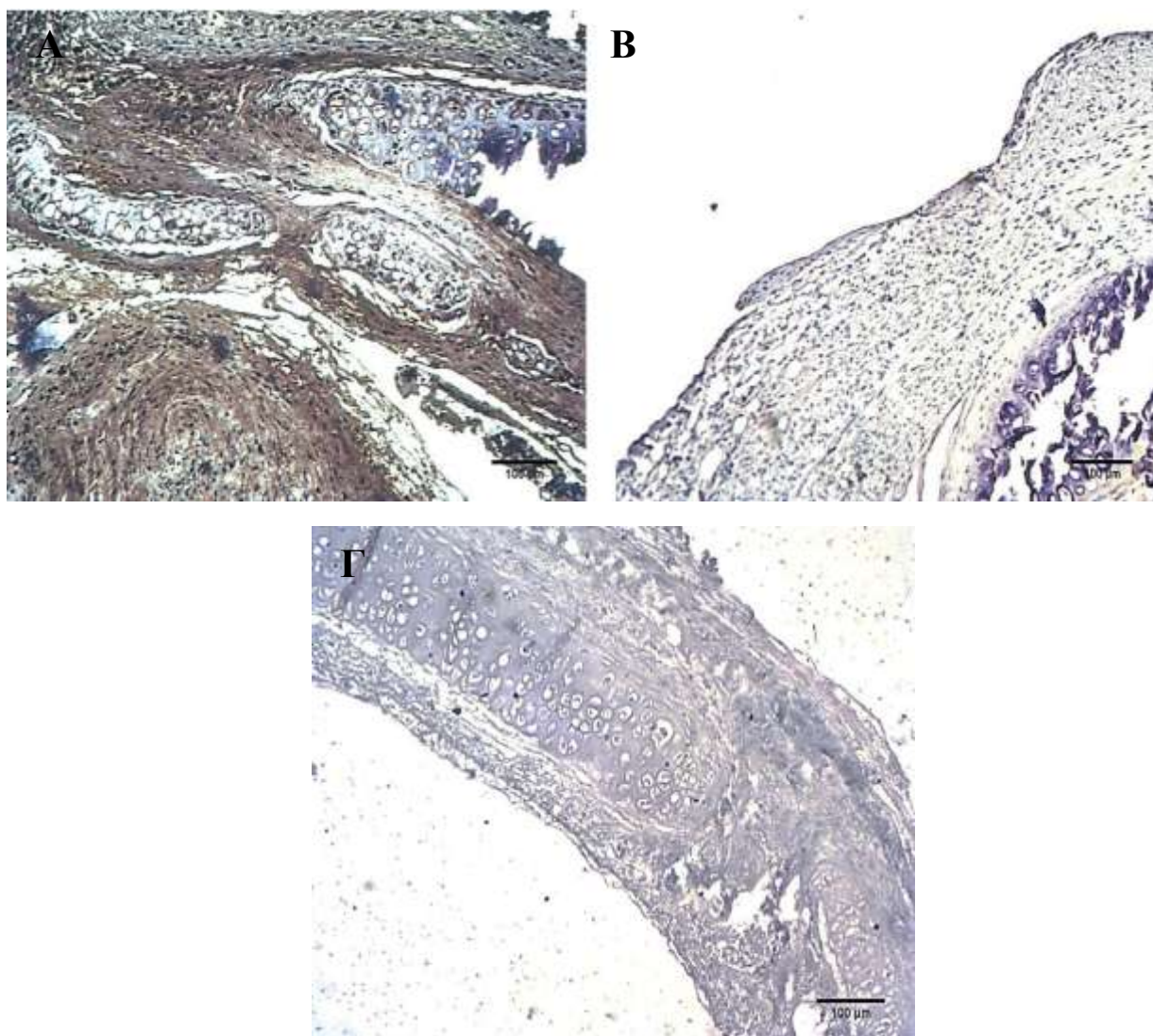
Εγγενής Τραχεία

Αποκυτταροποιημένη
Τραχεία

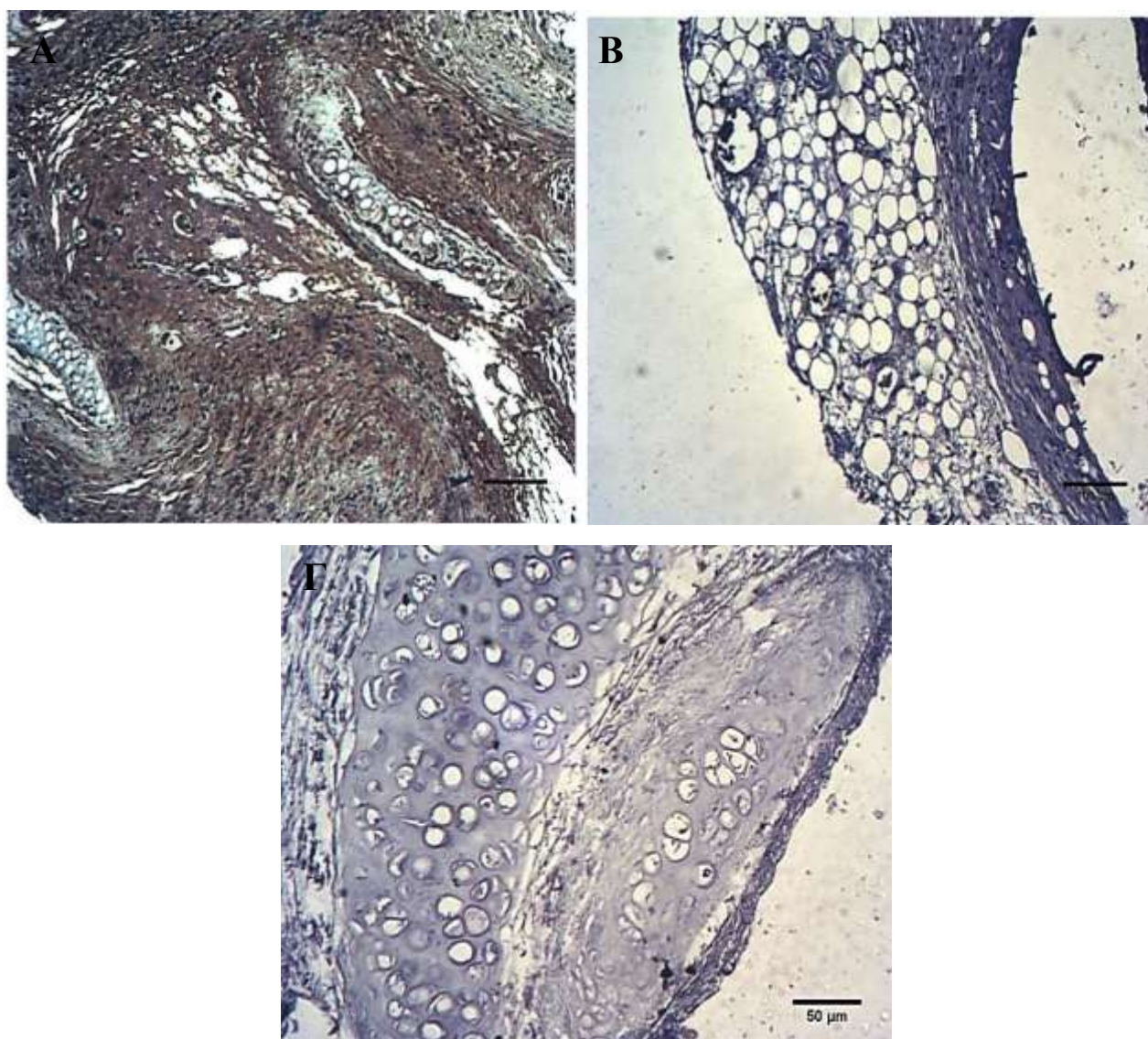
Εικόνα 33: Χρώση τομών εμφυτευμένης εγγενούς (Εικόνα Α,Γ) και αποκυτταροποιημένης τραχείας (Εικόνα Β, Δ) με χρώση Η&Ε σε μεγέθυνση 20x.

Στις εικόνες Α και Γ που απεικονίζουν τον εγγενή ιστό, παρατηρήθηκε έντονη διήθηση με κύτταρα που προσομοίαζαν μακροφάγα και μονοκύτταρα γεγονός που δείχνει την έντονη ανοσιακή απόκριση. Στις εικόνες Β και Δ που απεικονίζουν τον αποκυτταροποιημένο ιστό, παρατηρήθηκε μικρή παρουσία αυτών των κυττάρων ενώ αντίθετα φάνηκαν κύτταρα που προσομοίαζαν με ινοβλάστες γεγονός που δείχνει την επανακυτταροποίηση και αναγέννηση του ιστού.

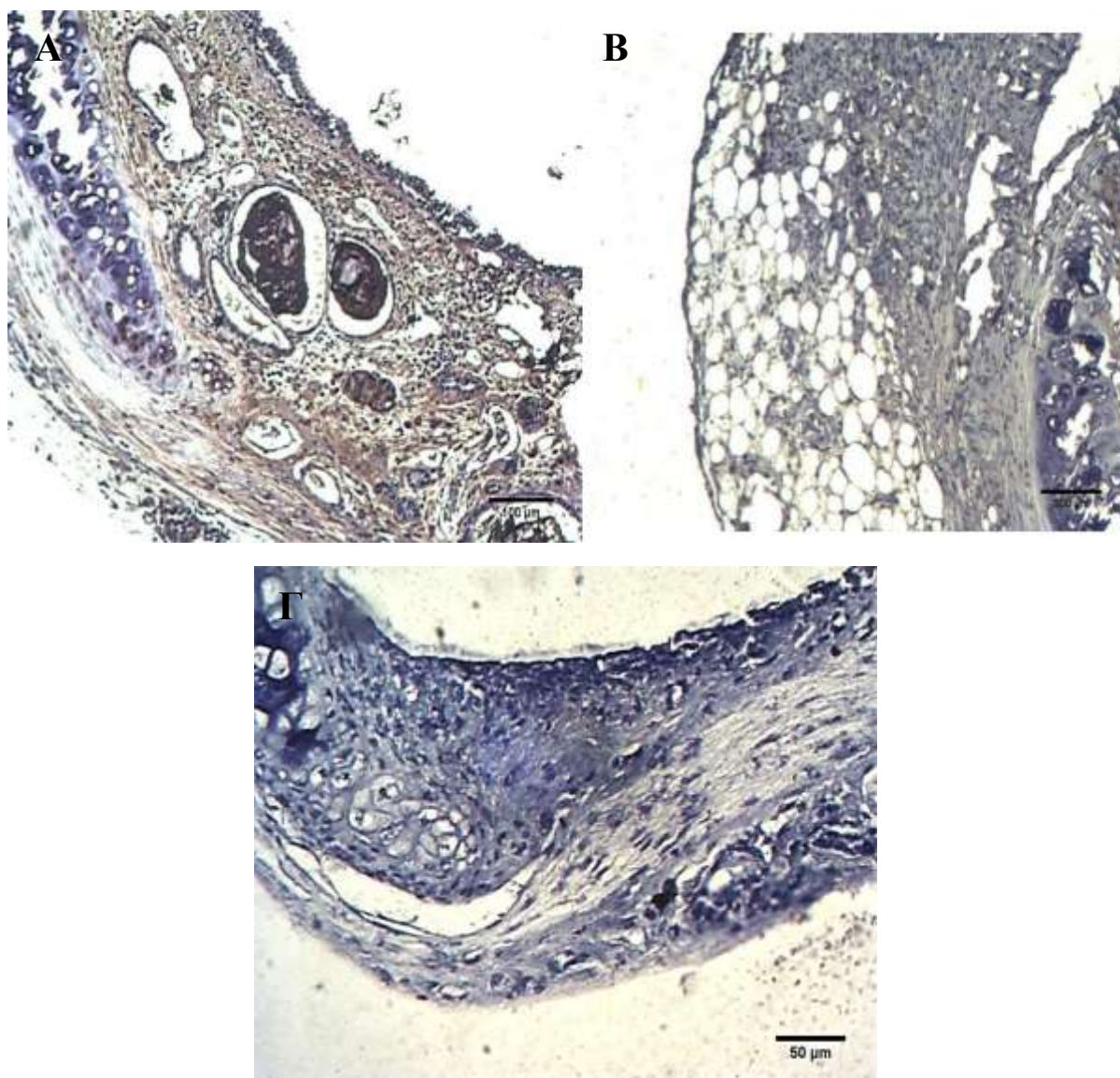
Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι εικόνες από τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο των εμφυτευμένων τραχειών με τα αντισώματα anti-CD3, anti-CD4, anti-CD11b.



Εικόνα 34: Σήμανση εμφυτευμένης εγγενούς τραχείας (Εικόνα Α) ως δείγμα θετικού ελέγχου, εμφυτευμένης αποκυτταροποιημένης τραχείας (Εικόνα Β) και δείγματος τραχείας αρνητικού ελέγχου (Εικόνα Γ) με αντίσωμα anti-CD3 σε μεγέθυνση 10x.



Εικόνα 35: Σήμανση εμφυτευμένης εγγενούς τραχείας (Εικόνα Α) ως δείγμα θετικού ελέγχου, εμφυτευμένης αποκυτταροποιημένης τραχείας (Εικόνα Β) και δείγματος τραχείας αρνητικού ελέγχου (Εικόνα Γ) με αντίσωμα anti-CD4 σε μεγέθυνση 10x (Εικόνα Α,Β) και 20x (Εικόνα Γ).

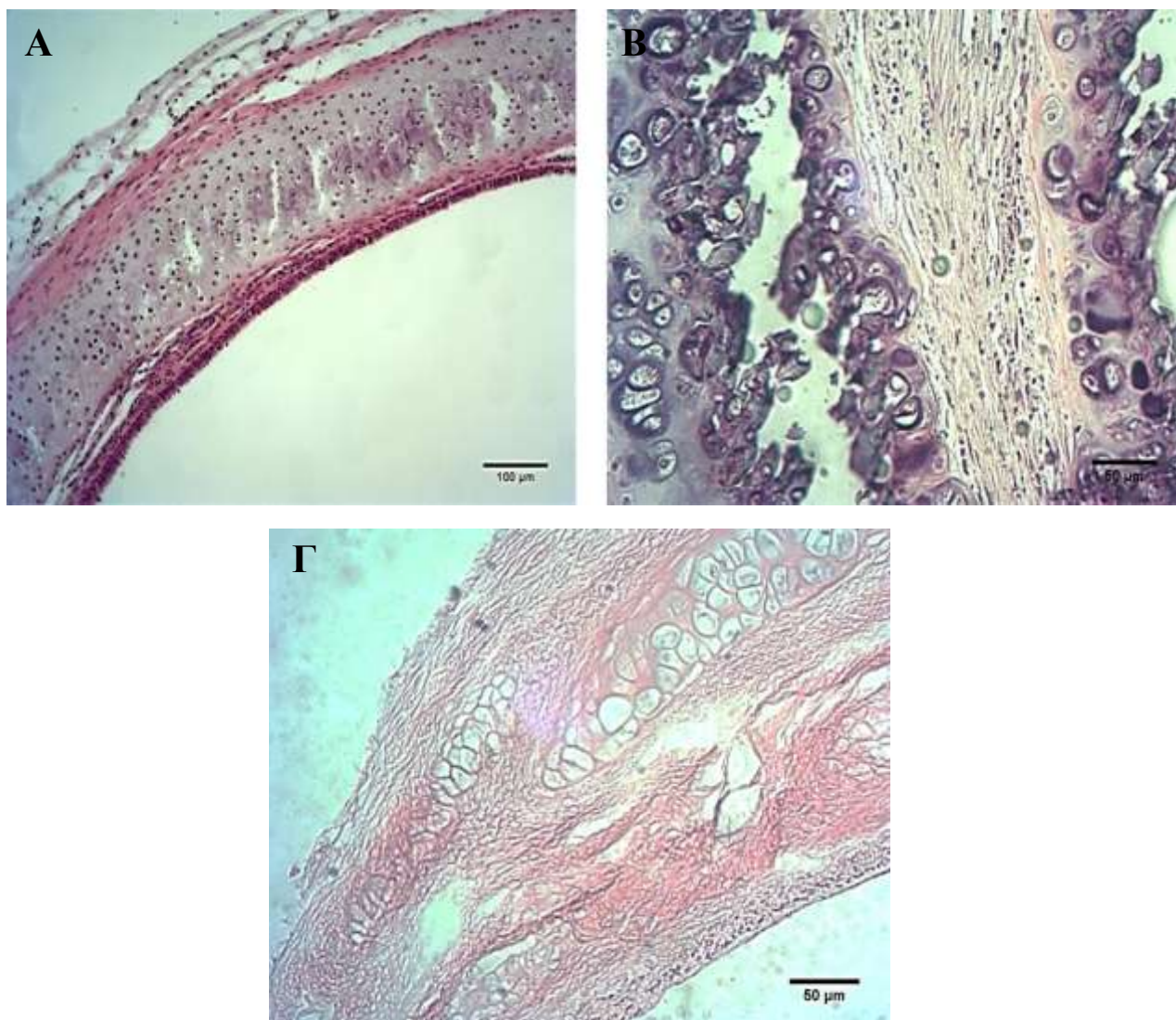


Εικόνα 36: Σήμανση εμφυτευμένης εγγενούς τραχείας (Εικόνα Α) ως δείγμα θετικού ελέγχου, εμφυτευμένης αποκυτταροποιημένης τραχείας (Εικόνα Β) και δείγματος τραχείας αρνητικού ελέγχου (Εικόνα Γ) με αντίσωμα anti-CD11b σε μεγέθυνση 10x (Εικόνα Α,Β) και 20x (Εικόνα Γ).

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, παρατηρήθηκε έντονη παρουσία των CD3, CD4 και CD11b κυττάρων στις εμφυτευμένες εγγενείς τραχείες γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία μεγάλου αριθμού T βοηθητικών κυττάρων και μακροφάγων και κατά συνέπεια έντονη ανοσολογική απάντηση. Αντίθετα, στις αποκυτταροποιημένες τραχείες δε φάνηκε καθόλου έκφραση των CD4 κυττάρων ενώ πολύ μικρή ήταν η παρουσία των CD3 και CD11b κυττάρων. Συμπερασματικά, οι αποκυτταροποιημένες τραχείες που εμφυτεύθηκαν παρουσίασαν μικρή ανοσολογική απάντηση γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης και εοσίνης (H&E) όπου παρατηρήθηκε η παρουσία κυττάρων που προσομοιάζουν ινοβλάστες, χαρακτηριστικό αναγέννησης και επανακυτταροποίησης του ιστού.

9.8 Ιστολογικός έλεγχος αναγέννησης και επανακυτταροποίησης του ικριώματος.

Για τον ιστολογικό έλεγχο επανακυτταροποίησης πραγματοποιήθηκαν χρώσεις με αιματοξυλίνη και εοσίνη (H&E) ώστε να αξιολογηθεί η παρουσία πυρήνων καθώς και ανοσοϊστοχημεία κατά την οποία οι ιστοί επώαστηκαν με αντίσωμα anti-S100 το οποίο εκφράζεται στον χόνδρινο ιστό της τραχείας και αποτέλεσε δείκτη επανακυτταροποίησης του ιστού. Τα δείγματα του ιστού προήλθαν από το αποκυτταροποιημένο εμφυτευμένο ικρίωμα τραχείας το οποίο παρέμεινε στον αρουραίο-λήπτη για 1 μήνα, μονιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε εγκάρσιες τομές 5 μ m. Τα αποτελέσματα των χρώσεων παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 37: Χρώση ιστών τραχείας με αιματοξυλίνη και εοσίνη (H&E) για έλεγχο παρουσίας πυρήνων. Δείγμα θετικού ελέγχου (Εικόνα Α) σε μεγέθυνση 10x, δείγμα ελέγχου επανακυτταροποίησης (Εικόνα Β) και δείγμα αρνητικού ελέγχου (Εικόνα Γ) σε μεγέθυνση 20x.

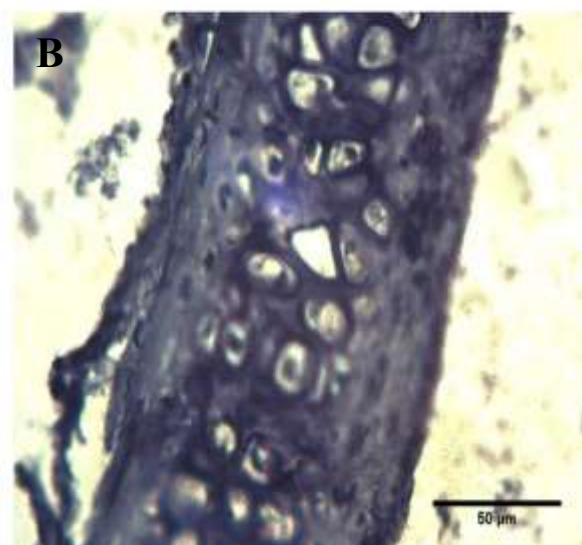
Όπως φάνηκε από τη χρώση με H&E, το αποκυτταροποιημένο δείγμα τραχείας που εμφυτεύθηκε στη ράχη αρουραίου παρουσίασε πυρήνες κυττάρων που προσομοίαζαν τους ινοβλάστες γεγονός που υποδεικνύει την τάση που έχει ο ιστός για ανάπλαση και επανακυτταροποίηση. Το δείγμα της τραχείας που εμφυτεύθηκε είναι παρόμοιο με τον φυσιολογικό ιστό όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Α (δείγμα θετικού ελέγχου) ενώ δε φάνηκε να παρουσιάζει ομοιότητα με τον πλήρως αποκυτταροποιημένο ιστό της εικόνας Γ που αποτέλεσε το δείγμα αρνητικού ελέγχου.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα anti-S100. Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος του αντισώματος ώστε να επιβεβαιωθεί η σωστή έκφρασή του και έπειτα ακολούθησε ο έλεγχος των δειγμάτων όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

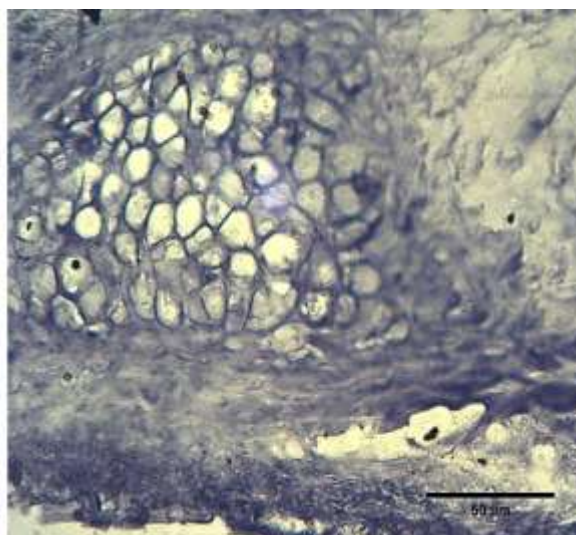
**Πρωτογενές και
Δευτερογενές αντίσωμα**

Πρωτογενές αντίσωμα

**Δείγμα
θετικού
ελέγχου**

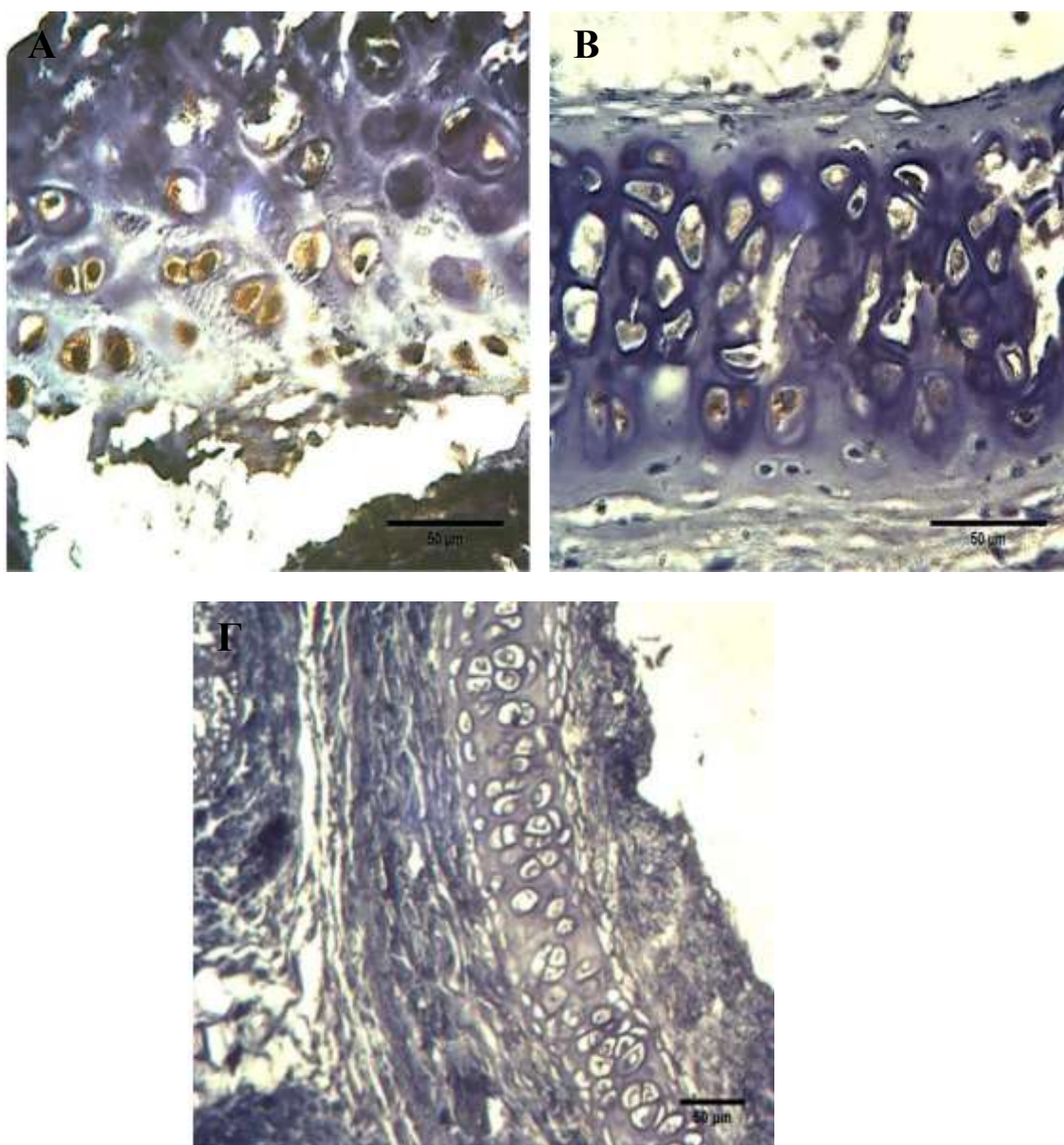


**Δείγμα
αρνητικού
ελέγχου**



Εικόνα 38: Απεικόνιση ιστολογικών τομών σημασμένες με πρωτογενές (anti-S100) και δευτερογενές αντίσωμα. Σήμανση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Α) και αρνητικού (Εικόνα Γ) ελέγχου για έλεγχο έκφρασης αντισωμάτων και σήμανση μόνο με πρωτογενές αντίσωμα σε δείγμα θετικού (Εικόνα Β) και αρνητικού (Εικόνα Δ) ελέγχου σε μεγέθυνση 40x.

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες, διαπιστώθηκε πως το αντίσωμα εκφράζεται σωστά στα δείγματα οπότε συνεχίστηκε ο έλεγχος για την αναγέννηση του χόνδρινου ιστού στα εμφυτευμένα δείγματα τραχείας. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε αποκυτταροποιημένα δείγματα τραχείας αρουραίου DA που εμφυτεύθηκαν σε αρουραίους Sprague Dawley (DAαποκ./SD).



Εικόνα 39: Σήμανση εγγενούς τραχείας (Εικόνα A) ως δείγμα θετικού ελέγχου, εμφυτευμένης αποκυτταροποιημένης τραχείας (Εικόνα B) ως δείγμα χόνδρινης αναγέννησης και δείγματος αποκυτταροποιημένης τραχείας ως δείγμα αρνητικού ελέγχου (Εικόνα Γ) με αντίσωμα anti-S100 σε μεγέθυνση 40x (Εικόνα A,B) και 20x (Εικόνα Γ).

Όπως φάνηκε από τις παραπάνω εικόνες, το αντίσωμα anti-S100 εκφράστηκε τόσο στις εγγενείς τραχείες όπως ήταν αναμενόμενο όσο και στο αποκυτταροποιημένο δείγμα τραχείας που εμφυτεύθηκε στη ράχη αρουραίου. Αυτό το αποτέλεσμα έδειξε ότι ο χόνδρινος ιστός παρουσίασε στοιχεία ανάπλασης και αναγέννησης υποδεικνύοντας πως ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαντιδραστήρας για να αποκατασταθεί η δομή και η λειτουργία του ιστού. Το δείγμα της τραχείας που εμφυτεύθηκε ήταν παρόμοιο με τον φυσιολογικό-εγγενή ιστό όπως παρουσιάζεται στην εικόνα Α (δείγμα θετικού ελέγχου) ενώ δε φάνηκε να παρουσιάζει ομοιότητα με τον πλήρως αποκυτταροποιημένο ιστό της εικόνας Γ που αποτέλεσε το δείγμα αρνητικού ελέγχου.

10. Συζήτηση

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν περιορισμένες λύσεις για την επισκευή μεγάλων περιφερικών τραχειακών ελαττωμάτων. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι είναι δύσκολο να συναρμολογηθεί καθαρά αυτόλογη δομή που μπορεί να μιμηθεί τη δομή και λειτουργία της φυσικής τραχείας. Οι δότες είναι περιορισμένοι και η έλλειψη κυρίαρχου αγγειακού μίσχου εμποδίζει την άμεση επαναγγείωση μέσω μικροχειρουργικής αναστόμωσης (Nakanishi et al., 1993; Cibantos-Filho et al., 2004). Αν και η μηχανική ιστών έχει μεγάλες δυνατότητες δημιουργίας ενός πλήρως αυτόλογου αεραγωγού, υπάρχουν πολλοί περιορισμοί που εμποδίζουν σήμερα την ευρεία χρήση της κλινικά. Επί του παρόντος δεν είναι σαφές ποιες από τις διαφορετικές τεχνικές ιστομηχανικής για αεραγωγούς είναι πιο αποτελεσματική.

Ένας αριθμός πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης έχουν εγκριθεί από τη ρυθμιστική αρχή για χρήση σε ανθρώπους. Ο αυξανόμενος κατάλογος των βιολογικών ικρίωμάτων που χρησιμοποιούνται για εφαρμογές στη μηχανική ιστών/αναγεννητική ιατρική καθιστά τη συνεχιζόμενη ανάπτυξη των πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης μια κλινικά σημαντική προσπάθεια (Gilbert et al., 2006).

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η χρήση ενός πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης που βασίζεται στη χημική δράση απορρυπαντικών και περιλαμβάνει τα διαλύματα 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) και θεραπευτικό μέσο/Fetal Bovine Serum (FBS). Παρατηρήθηκε ότι μετά από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, τα κύτταρα και η αντιγονικότητα μειώθηκαν αρκετά ενώ η δομική ακεραιότητα διατηρήθηκε σε μεγάλο βαθμό. Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην αποκυτταροποίηση της τραχείας αρουραίου ώστε να μπορεί να συγκριθεί με άλλες μελέτες. Παρόλα αυτά, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αποκυτταροποίηση άλλων ιστών όπως οι αρτηρίες κ ο πνεύμονας (Liqiong et al., 2009; Petersen et al., 2010).

Στην παρούσα μελέτη φάνηκε η αποτελεσματικότητα του παραπάνω πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης όπως επιβεβαιώθηκε και με πρωτόκολλα άλλων μελετών σε μοντέλο τραχείας αρουραίου κυρίως σε μη χονδροειδείς ιστούς. Παρόλα αυτά το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης στην παρούσα μελέτη χρειάστηκε να εφαρμοστεί για 3 κύκλους ώστε να είναι αποτελεσματικό σε μη χονδροειδείς αλλά και χόνδρινους ιστούς όπου παρατηρήθηκε απομάκρυνση πυρηνικών και κυτταρικών στοιχείων έπειτα από τις χρώσεις με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και DAPI. Στο τέλος της

διαδικασίας παρατηρήθηκαν ελάχιστα κυτταρικά θραύσματα στον χόνδρινο ιστό τα οποία πιθανόν να έχουν ως αποτέλεσμα μια περιορισμένη απόκριση ξενιστή. Επίσης, η ποσοτικοποίηση DNA έδειξε πως στις αποκυτταροποιημένες τραχείες παρέμεινε 4,08ng DNA/mg ιστού σε αντίθεση με τις φυσιολογικές τραχείες όπου παρέμεινε 722,9 ng DNA/mg ιστού. Όπως φάνηκε, στις αποκυτταροποιημένες τραχείες παρέμεινε μόνο το 0,56% του αρχικού γενετικού υλικού και αυτή η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ του περιεχομένου DNA μεταξύ φυσιολογικών και αποκυτταροποιημένων τραχειών (p -value <0,005). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης ως προς την απομάκρυνση πυρηνικών και κυτταρικών στοιχείων από τον ιστό καθώς σύμφωνα με τα ευρήματα ορισμένων μελετών, συστήνεται ποσότητα <50 ng dsDNA/mg εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ως αξιόπιστο κριτήριο που επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης (Vacanti et al., 1999). Αντιθέτως, άλλα πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης, κυρίως βασισμένα σε χημική-ενζυματική δράση, έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε μη χονδροειδείς ιστούς από τον πρώτο κύκλο αλλά όχι τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα στον χόνδρινο ιστό (Zang et al., 2012) ως εκ τούτου, η επανειλημμένη έκθεση σε απορρυπαντικά ήταν απαραίτητη για να σπάσουν μεμβράνες χονδροκυττάρων και να αφαιρεθούν εντελώς τα αντιγόνα μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας. Οι Zang και συνεργάτες χρησιμοποίησαν πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης βασισμένο σε χημική και ενζυματική δράση και χρειάστηκαν 5 κύκλοι αποκυτταροποίησης με παρατήρηση ελάχιστων πυρηνικών υλικών να εξακολουθούν να υπάρχουν στον χόνδρο στο τέλος της διαδικασίας, καθώς και μη επαρκώς διαλυτά κυτταροσκελετικά συστατικά (Zang et al., 2012). Στη μελέτη μας, το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης που χρησιμοποιήθηκε και εφαρμόστηκε πρώτη φορά στον ιστό της τραχείας είχε σκοπό να επιτύχει την αποτελεσματικότερη αποκυτταροποίηση του ιστού σε βέλτιστο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα πρόσφατα δημοσιευμένα άρθρα, τα οποία απαιτούσαν 3-45 ημέρες ή ακόμα και περισσότερο χρονικό διάστημα (Remlinger et al. 2010; Deslauriers et al., 1975; Jungebluth et al., 2009).

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποκυτταροποίησης, η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία διαταράσσεται, πράγμα που επιτρέπει την έκθεση των κυττάρων στα υλικά αποκυτταροποίησης και την αφαίρεση του κυτταρικού υλικού (Gilbert et al., 2006). Η διαδικασία αποκυτταροποίησης επηρεάζει τη σύνθεση και τη δομή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Gilbert et al., 2006). Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι η

βασική ουσία του τραχειακού χόνδρου και, σε συνδυασμό με την ικανότητα αποθήκευσης νερού, παρέχει στην τραχεία τη μηχανική του αντοχή για να αντισταθεί στις δυνάμεις συμπίεσης (Zang et al., 2012; Roberts et al., 1998). Στη μελέτη μας έπειτα από τους 3 κύκλους αποκυτταροποίησης, οι γλυκοζαμινογλυκάνες, το κολλαγόνο και η ελαστίνη που χρωματίστηκαν με τις χρώσεις Τολουιδίνη μπλε, Masson's trichrome και Elastic Van Gieson αντίστοιχα, παρέμειναν στους ιστούς των αποκυτταροποιημένων τραχειών. Η ελαστίνη, οι γλυκοζαμινογλυκάνες και το κολλαγόνο έχουν σημαντική επίδραση στη συμπεριφορά των κυττάρων (Roberts et al., 1998; Kim et al., 2011). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ποσοτικοποίησης της υδροξυπρολίνης, που αποτελεί σημαντικό συστατικό του κολλαγόνου, και των γλυκοζαμινογλυκανών η οποίες έδειξαν αύξηση 37,1% και μείωση 15,9%, αντίστοιχα, στις τραχείες έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης ενώ καμιά διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική βάσει της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε. Η αύξηση της υδροξυπρολίνης πιθανόν να οφείλεται στη διατήρησή της και την απελευθέρωση των άλλων συστατικών του ιστού (διαλυτές πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα, άλατα, υδατάνθρακες) που προέκυψε με τη διαδικασία της αποκυτταροποίησης (Courtman et al., 1994). Επομένως, διαπιστώθηκε πως η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία παρέμεινε ανέπαφη, γεγονός που καθιστά το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης αποτελεσματικό και τον ιστό κατάλληλο για πιθανή μεταμόσχευση. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη μελέτη των Zang και συνεργατών οι οποίοι παρατήρησαν απώλεια του περιεχομένου γλυκοζαμινογλυκανών στον χόνδρινο ιστό της τραχείας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποκυτταροποίησης. Αυτή η μείωση δεν ήταν έκπληξη καθώς τα ιοντικά απορρυπαντικά μειώνουν αποτελεσματικά το περιεχόμενο γλυκοζαμινογλυκανών όπως άλλωστε έχει αποδειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες για την αποκυτταροποίηση του χόνδρου (Stapleton et al., 2008; Elder et al., 2009). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η απώλεια των γλυκοζαμινογλυκανών οδηγεί σε κατακράτηση νερού από τον ιστό και περιορισμένη διάχυση των διαλυμάτων αποκυτταροποίησης (Stapleton et al., 2008). Αυτό μπορεί να συμβάλει στη χαμηλή αποτελεσματικότητα της αποκυτταροποίησης και επίσης στη διατήρηση των γλυκοζαμινογλυκανών στην κεντρική ζώνη του χόνδρου της τραχείας μετά τον πρώτο κύκλο αποκυτταροποίησης. Η εφαρμογή μεθόδου αποκυτταροποίησης που πραγματοποιήθηκε από τους Kajbafzadeh και συνεργάτες το 2014 με τη χρήση ενζυματικών διαλυμάτων, (Kajbafzadeh et al., 2014) ήταν αποτελεσματική για την αποκυτταροποίηση του

χόνδρου και του συνδετικού ιστού παρουσιάζοντας αποτελέσματα παρόμοια με της μελέτης μας. Επίσης, αξιολόγηση περιεχομένου της μήτρας από τους οι Baiguera και συνεργάτες το 2014, έδειξε ότι τα αποκυτταροποιημένα στοιχεία χαρακτηρίστηκαν από ίδια συγκέντρωση των συστατικών της ECM με αυτή που βρέθηκε στην εγγενή τραχεία, υποδηλώνοντας ότι η δυναμική διαδικασία χημικής-ενζυματικής μεθόδου ήταν σε θέση να διατηρήσει την ελαστίνη και τις γλυκοζαμινογλυκάνες, τα οποία έχουν σημαντική επίδραση στη συμπεριφορά των κυττάρων (Baiguera et al., 2014; Roberts et al., 1998; Kim et al., 2011). Οι παραπάνω μελέτες που αφορούν στην αξιολόγηση του περιεχομένου της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας των ιστών έπειτα από μια αποκυτταροποίηση και παρά το γεγονός ότι καθεμία χρησιμοποιεί διαφορετικά διαλύματα αποκυτταροποίησης, παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα με τη μελέτη μας που υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της αποκυτταροποίησης και τη διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, σε αντίθεση με άλλα πρωτόκολλα στα οποία ο ιστός του χόνδρου δεν ήταν πλήρως αποκυτταροποιημένος (Macchiarini et al., 2008; Jungebluth et al., 2009).

Ο τραχειακός χόνδρος έχει ένα σημαντικό ρόλο, δεδομένου ότι οι δακτύλιοι πρέπει να διατηρούν ανοιχτό τον αεραγωγό. Η μηχανική αντοχή που αντιστέκεται στις δυνάμεις συμπίεσης είναι το αποτέλεσμα λειτουργικής σύζευξης μεταξύ των γυκοζαμινογλυκανών (GAGs), παρέχοντας υψηλή οσμωτική πίεση, και του ινώδους δικτύου κολλαγόνου, παρέχοντας αντοχή σε εφελκυσμό. Επιπλέον, οι GAGs παρέχουν στην τραχεία σημαντικές θέσεις δέσμευσης για αυξητικούς παράγοντες (Roberts et al., 1998; Kim et al., 2011). Τροποποιώντας τα συστατικά της μήτρας θα μπορούσαν ακολούθως να μεταβληθούν οι λειτουργικές και δομικές ιδιότητες. Έπειτα από μια αποκυτταροποίηση, η μηχανική αντοχή της τραχείας θα πρέπει να διατηρείται τόσο στις εισπνευστικές όσο και στις εκπνευστικές πιέσεις. Η μείωση των γλυκοζαμινογλυκανών αιτιολογεί επίσης την πρόωρη μείωση της αντοχής το ιστού μετά την αποκυτταροποίηση. Στην παρούσα μελέτη, οι εμβιομηχανικές δοκιμές αποκάλυψαν ορισμένες διαφορές στις παραμέτρους αποτυχίας μεταξύ εγγενών και αποκυτταροποιημένων τραχειών, υποδηλώνοντας ότι οι τελευταίες ήταν σημαντικά ασθενέστερες και μαλακές αλλά πιο εκτάσιμες από τις πρώτες, αν και μόνο κατά μήκος. Τα τμήματα της τραχείας που προορίζονταν για το σκοπό αυτής της μελέτης περιελάμβαναν σχεδόν ολόκληρη την τραχεία και δοκιμάστηκαν δείγματα των οποίων η ανατομική θέση ήταν γνωστή, δικαιώνοντάς μας να συμπεράνουμε ότι οι διαπιστωθείσες διαφορές ήταν ανεξάρτητες από την ανατομική θέση του

εξεταζόμενου δείγματος. Παρ' όλα αυτά, ακόμη και η αντιμετώπιση του θέματος της ανατομικής εξάρτησης από τις εμβιομηχανικές ιδιότητες του ιστού έδειξε ότι οι παράμετροι αποτυχίας ήταν ανεξάρτητες από την περιοχή. Οι μονοαξονικές δοκιμές επιλέχθηκαν επειδή αντιπροσωπεύουν ένα απλό μέσο προσδιορισμού της ακαμψίας, της εκτασιμότητας και της αντοχής του βιολογικού ιστού, αλλά τα αποτελέσματά μας θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με γενικότερα πρωτόκολλα πολυαξονικών δοκιμών (έλεγχος φουσκώματος), όμως αυτά είναι τεχνικά απαιτητικά. Η μηχανική αντοχή της τραχείας μελετήθηκε επίσης και από τους Zang και συνεργάτες, οι οποίοι παρουσίασαν αντίστοιχα αποτελέσματα με τη μελέτη μας καθώς παρατηρήθηκε πως η αποκυτταροποιημένη τραχεία έδειξε μειωμένη δυσκαμψία και αντοχή σε εφελκυσμό σε σύγκριση με την εγγενή τραχεία, υποδεικνύοντας βλάβη κολλαγόνου κατά μήκος του διαμήκους άξονα ιστού της τραχείας, συμπεριλαμβανομένου του χόνδρινου δακτυλίου. Παρά την αποδυνάμωση του ιστού σε κάποιο βαθμό, ωστόσο, διατηρήθηκε επαρκής δύναμη συμπίεσης στην αποκυτταροποιημένη τραχεία, που ήταν σε θέση να διατηρήσει τη διαπερατότητα του αυλού. Σε μια προκλινική μελέτη στους χοίρους, αναφέρθηκε κατάρρευση, μικρότερη από 25%, 2 μήνες μετά την εμφύτευση της τραχείας, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις μηχανικές ιδιότητες (Go et al., 2010). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση της ικανότητας της μήτρας του ικριώματος να αντισταθεί στις φυσιολογικές δυνάμεις και την πίεση *in vivo* (Zang et al., 2012).

Η κατάρρευση του ιστού-μηχανικού μοσχεύματος τραχείας σε αρκετούς ασθενείς λόγω χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (Baiguera et al., 2011; Curcio et al., 2010) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η εφαρμογή μεθόδων αποκυτταροποίησης με ενζυματική δράση κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μπορεί να διαδραματίσει κρίσιμο ρόλο στη σύνθεση και τις μηχανικές ιδιότητες του ικριώματος. Σε μια πρόσφατη μελέτη, παρατηρήθηκε μικρή αλλαγή στις μηχανικές τιμές μετά τον 10ο κύκλο αποκυτταροποίησης με χημική-ενζυματική δράση (Haag et al., 2011). Σύμφωνα με την έρευνα των Baiguera και συνεργατών, οι ιστοί που αποκυτταροποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη δυναμική προσέγγιση χαρακτηρίστηκαν από μειωμένη αντοχή και παραμόρφωση κατά τη διάρρηξη. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να υποδηλώνει ότι η δυναμική διαδικασία που χρησιμοποιείται για την αποκυτταροποίηση της τραχείας επηρέασε τη μηχανική απόδοση, ιδιαίτερα κατά το τελικό στάδιο πριν από τη διάρρηξη (Baiguera et al., 2014; Haag et al., 2012). Μείωση της μηχανικής απόδοσης μετά από αποκυτταροποίηση χρησιμοποιώντας

πρωτόκολλα διάχυσης είχε αξιολογηθεί σε προηγούμενες μελέτες διερευνώντας διαφορετικά όργανα. Σε σκυβάτι προβάτου παρατηρήθηκαν χαμηλότερες μηχανικές ιδιότητες, ανάλογα και με τα διαφορετικά πρωτόκολλα αποκυτταροποίησης που αξιολογήθηκαν (Kajbafzadeh et al., 2013). Όλες οι παραπάνω μελέτες παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα με της παρούσας μελέτης καθώς δείχνουν πως η αποκυτταροποίηση επηρεάζει τη μηχανική αντοχή των ιστών σε μικρό βαθμό διατηρώντας όμως τις μηχανικές ιδιότητες των αποκυτταροποιημένων ιστών.

Στη μελέτη μας, παρά τη μερική απώλεια των γλυκοζαμινογλυκανών, η ιστοαρχιτεκτονική του χόνδρου φάνηκε καλά διατηρημένη. Επίσης, αν και η έκθεση στα υλικά αποκυτταροποίησης επαναλήφθηκε για 3 συνεχόμενους κύκλους, η βασική μεμβράνη και το υποβλεννογόνο της τραχείας παρέμειναν άθικτα και δεν παρουσίασαν κάποια βλάβη κατά την αποκυτταροποίηση. Η ανάλυση των εικόνων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης έδειξε πως η δομή των αποκυτταροποιημένων ιστών έχει παραμείνει ανέπαφη έπειτα από 3 κύκλους αποκυτταροποίησης. Συγκεκριμένα, οι ίνες κολλαγόνου φάνηκαν να έχουν διατηρηθεί στους αποκυτταροποιημένους ιστούς, επιβεβαιώνοντας τη διατήρηση της δομής του κολλαγόνου. Η εσωτερική και η εξωτερική επιφάνεια παρέμειναν αναλλοίωτες τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις αποκυτταροποιημένες τραχείες. Η εξωτερική επιφάνεια της αποκυτταροποιημένης τραχείας έδειξε ετερογενή παρουσία ινώδους δικτύου, και φάνηκε υποστηρικτική η δομή της για προσκόλληση και ανάπτυξη χονδρογόνων βλαστικών κυττάρων. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες όπου πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποκυτταροποίησης (Zang et al., 2012). Προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν πρωτόκολλα βασισμένα σε χημική-ενζυματική δράση έδειξαν πως η μέθοδος ήταν μη λειτουργική για την απομόνωση της βασικής μεμβράνης, επειδή η βασική μεμβράνη ήταν αδιάλυτη σε δεοξυχολικό νάτριο (Meezan et al. 1975). Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι 9 κύκλοι αποκυτταροποίησης με χημική-ενζυματική δράση σε αρουραίο, είναι δυνατόν να δημιουργούν αποκυτταροποιημένες τραχειακές μήτρες που είναι δομικά και μηχανικά παρόμοιες με την εγγενή τραχεία, και οι οποίες έχουν προ-αγγειογόνες ιδιότητες (Haag et al., 2012). Τα αποτελέσματα από τη μελέτη των Baiguera και συνεργατών (Baiguera et al., 2014) παρουσίασαν ομοιότητα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας αποδεικνύοντας ότι η δυναμική προσέγγιση δεν άλλαξε σημαντικά τη μορφολογία και την ιστοαρχιτεκτονική της τραχείας αφού δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην δομή του

χόνδρου, η δομή του κολλαγόνου ήταν εμφανής μετά την αποκυτταροποίηση και η τρισδιάστατη δομή της τραχειακής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ήταν καλά διατηρημένη. Σε άλλη μελέτη τους όμως το 2012, οι Baiguera και συνεργάτες που αξιολόγησαν την ανθεκτικότητα ανθρώπινων αποκυτταροποιημένων τραχειών σε κατάλληλο περιβάλλον *in vitro* (PBS, αντιβιοτικά και αντιμυκητιασικά) κατέδειξαν δομική αλλοίωση της ECM και μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων μετά από 1 έτος (Baiguera et al., 2012).

Εν συνεχεία, αξιολογήθηκαν τα χημικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται σε μια διαδικασία αποκυτταροποίησης καθώς ενδεχομένως είναι βλαπτικά για τα κύτταρα. Επομένως, ικρίωματα με υψηλές συγκεντρώσεις υπολειμμάτων από τα διαλύματα/υλικά της αποκυτταροποίησης είναι πιθανό να είναι τοξικά για τα κύτταρα (Gilbert et al., 2006). Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε απαραίτητο να προσδιοριστεί η κυτταροτοξικότητα του ικρίωματος πριν χρησιμοποιηθεί για εμφύτευση, μεταμόσχευση ή επανακυτταροποίηση. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε πως τα διαλύματα της αποκυτταροποίησης δεν επηρέασαν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των κυττάρων γεγονός που αποδεικνύει πως τα διαλύματα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης δε μπορούν να θεωρηθούν τοξικά. Όπως συζητήθηκε και παραπάνω, τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα ομφαλίου λώρου (WJ MSCs), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό και αποκυτταροποιημένη τραχεία αναπτύχθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν φυσιολογικά συγκρινόμενα με τα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί μόνο με την προσθήκη καλλιεργητικού υλικού. Επίσης, κατά τη δεύτερη δοκιμή για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας, παρατηρήθηκε πως τα κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν με καλλιεργητικό υλικό το οποίο περιείχε και την αποκυτταροποιημένη τραχεία, μεταβόλιζαν ATP σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό απ'ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο με την προσθήκη καλλιεργητικού υλικού.

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μελέτες όπου ιστοί αποκυτταροποιήθηκαν με διαλύματα που είχαν χημική-ενζυματική δράση και εξετάστηκε η τοξικότητα των αποκυτταροποιημένων ικριωμάτων με έγχυση κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι Zang και συνεργάτες παρουσίασαν ίδια αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη, καθώς παρατήρησαν στις καλλιέργειες τους έντονο πολλαπλασιασμό κυττάρων και καμιά τοξικότητα (Zang et al., 2012). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, για να προσδιοριστεί η ακεραιότητα και η συμβατότητα των τραχειακών ικριωμάτων, MSCs αρουαίου καλλιεργήθηκαν για 3 και 7 ημέρες μαζί

με αποκυτταροποιημένους ιστούς (Baiguera et al., 2014). Οι τραχειακές μήτρες δεν έδειξαν τοξικότητα στα κύτταρα αφού παρατηρήθηκε πως τα κύτταρα συγκολλούνται, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται εκτεταμένα και στις δύο πλευρές τραχειακών πλεγμάτων. Επιπλέον, η παρουσία MSCs στο εσωτερικό μέρος των εμβολιασμένων τραχειακών πλεγμάτων, μετά από *in vitro* καλλιέργεια, έδειξε ότι η δυναμική προσέγγιση με χημική-ενζυματική δράση δεν απομάκρυνε και δεν έβλαψε τις θέσεις σύνδεσης του ιστού και τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την επανακυτταροποίηση της τραχείας (Baiguera et al., 2014). Έχει αποδειχθεί ότι διάφοροι συντελεστές ανάπτυξης, όπως ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (b-FGF), μπορούν να επιβιώσουν κατά τη διαδικασία αποκυτταροποίησης κάτι το οποίο αποτελεί μια πιθανή εξήγηση αυτής της παρατήρησης (Conconi et al., 2005). Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ασκούν τη βιολογική τους δράση, καθώς διαχωρίζονται από τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες και ενεργοποιούνται (Badylak et al., 2007). Είναι πιθανό αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες να οδηγούν σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και αυτός είναι ένας τομέας που βρίσκεται σε ερευνητική διαδικασία (Zang et al., 2012).

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να αξιολογηθούν οι *in vivo* αποκρίσεις της αποκυτταροποιημένης τραχείας. Ένα από τα χαρακτηριστικά της παραπάνω μελέτης είναι ότι η χειρουργική επέμβαση πραγματοποιήθηκε στη ράχη των αρουραίων. Παρατηρήθηκε έντονη παρουσία των CD3, CD4 και CD11b κυττάρων στις εμφυτευμένες εγγενείς τραχείες γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία μεγάλου αριθμού T βοηθητικών κυττάρων και μακροφάγων και κατά συνέπεια έντονη ανοσολογική απάντηση. Αντίθετα, στις αποκυτταροποιημένες τραχείες που εμφυτεύτηκαν σε αρουραίο, δε φάνηκε καθόλου έκφραση των CD4 κυττάρων ενώ πολύ μικρή ήταν η παρουσία των CD3 και CD11b κυττάρων. Επομένως, οι αποκυτταροποιημένες τραχείες που εμφυτεύθηκαν παρουσίασαν μικρή ανοσολογική απάντηση γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης και εοσίνης (H&E) όπου παρατηρήθηκε η παρουσία κυττάρων τα οποία όμως προσομοιάζουν ινοβλάστες, χαρακτηριστικό αναγέννησης και επανακυτταροποίησης του ιστού. Επίσης, το αντίσωμα anti-S100 εκφράστηκε τόσο στις εγγενείς τραχείες όπως ήταν αναμενόμενο όσο και στο αποκυτταροποιημένο δείγμα τραχείας που εμφυτεύθηκε στη ράχη αρουραίου. Αυτό το αποτέλεσμα έδειξε

ότι ο χόνδρινος ιστός παρουσίασε στοιχεία ανάπλασης και αναγέννησης υποδεικνύοντας πως ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαντιδραστήρας για να αποκατασταθεί η δομή και η λειτουργία του ιστού. Το δείγμα της τραχείας που εμφυτεύθηκε ήταν παρόμοιο με τον φυσιολογικό-εγγενή ιστό, δηλαδή με την παρουσία χόνδρου, ενώ δε φάνηκε να παρουσιάζει ομοιότητα με τον πλήρως αποκυτταροποιημένο ιστό όπου ο χόνδρος δεν ήταν εμφανής. Επίσης, σε παρόμοια μελέτη, (Kajbafzadeh et al., 2014) πραγματοποιήθηκε χειρουργική επέμβαση κοντά στην σπονδυλική στήλη σε ποντίκια χωρίς ανοσοποιητικό, τα οποία είναι εύκολα προσβάσιμα. Αυτή η τεχνική είναι πιθανώς ασφαλής και μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε ασθενείς κατά τη διάρκεια κλινικών δοκιμών. Συνοπτικά, έδειξαν ότι ο περιορισμός της μόλυνσης και η βελτίωση της ποιότητας του ικριώματος μπορεί να επιτευχθεί με την αποφυγή της χρήσης τοξικών ενζύμων για το αναγέννηση της τραχείας (Kajbafzadeh et al., 2014; Walles et al., 2003). Οι Kajbafzadeh και συνεργάτες (Kajbafzadeh et al., 2014) έπειτα από 1ετή παρακολούθηση, έδειξαν πως η αποκυτταροποιημένη τραχεία είχε αξιόπιστη ιστολογική εικόνα με δυνατότητα επανακυτταροποίησης. Όπως αποδεικνύεται από την ανοσοϊστοχημία, οι ιστοί ανέκτησαν τα τυπικά ιστολογικά χαρακτηριστικά της εγγενούς τραχείας σε διάστημα από 1 έως 12 μήνες μετεγχειρητικά.

Οι τρέχουσες προσεγγίσεις της ιστομηχανικής συχνά απαιτούν προηγμένες τεχνικές με πολλαπλά βήματα, τα οποία αυξάνουν τον προπαρασκευαστικό χρόνο και το κόστος (Ott et al., 2011). Μεγάλα πρωτόκολλα κατασκευής είναι δύσκολο να εφαρμοστούν σε ασθενείς με καρκίνο λόγω του επείγοντος χαρακτήρα της θεραπείας της νόσου. Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί και τα αποκυτταροποιημένα και τα συνθετικά ικριώματα προηγουμένως για τη μηχανική ιστών τραχείας, (Jungebluth et al., 2011; Elliott et al., 2012) μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν μελέτες που να συγκρίνουν άμεσα τις δύο προσεγγίσεις. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί προσεγγίσεις μηχανικής ιστών *in vitro*, (Macchiarini et al., 2008) *in vivo*, (Elliott et al., 2012) και *in situ* (Jungebluth et al., 2012), όμως δεν είναι σαφές ποια είναι η καλύτερη προσέγγιση για την ιστομηχανική των αεραγωγών. Επιπλέον, απαιτείται μελλοντική εργασία για να καθοριστεί αν αυτά τα κυτταρικά ικριώματα μπορούν να ευνοήσουν την ανάπτυξη ώστε να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία σε παιδιατρική περίπτωση (Lange et al., 2011; Ott et al., 2012). Το μέλλον της μηχανικής ιστών της τραχείας μπορεί να βρίσκεται στις τεχνολογίες βιοεκτύπωσης για την παραγωγή

τριδιάστατων ικριωμάτων που περιέχουν βλαστικά κύτταρα και αυξητικούς παράγοντες (Xu et al., 2008).

Παρά τις πολυάριθμες επιπλοκές που συνδέονται με προσθετικά υλικά και αυλωτά στεντ (Schultz et al., 2007; Martinod et al., 2003), αυτά είναι απαραίτητα προκειμένου να διατηρηθεί η βατότητα των περιφερικών επισκευών. Εκτός από την επιλογή αδρανών υλικών για την ελαχιστοποίηση της αντίδρασης ξένου σώματος, η διαπερατότητα των συνθετικών ικριωμάτων είναι σημαντική για να επιτρέψει την ανάπτυξη των ιστών ξενιστή για γρήγορη επαναγγείωση και μείωση της προσθετικής έκθεσης στο εξωτερικό περιβάλλον (Grillo et al., 2002). Παρόλα αυτά, θεωρείται ιδανική η αποφυγή των συνθετικών υλικών μακροπρόθεσμα (Martinod et al., 2005). Άλλα θέματα που πρέπει να εξεταστούν περιλαμβάνουν την περιορισμένη προσφορά δοτών, μεθόδους διατήρησης αλλομοσχεύματος και αποθήκευση, μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα του μοσχεύματος και ανάγκη για μακροχρόνια ανοσοκαταστολή. Καλύτερη κατανόηση της ανοσοβιολογίας των αεραγωγών μπορεί να επιτρέψει μια μη τοξική κατάσταση δοτών με ειδική ανοσολογική ανοχή που πρέπει να επιτευχθεί στο μέλλον.

Πολλά εμπόδια στον τομέα της υλικοτεχνικής υποστήριξης εμπόδισαν τη χρήση μεγάλων ζωικών μοντέλων στην τραχειακή έρευνα. Το πιο σημαντικό ζήτημα είναι το αυξημένο κόστος της συντήρησης των ζώων, η εκτροφή και τα διαδικαστικά έξοδα, τα οποία περιορίζουν τη διάρκεια και την παρακολούθηση των αποτελεσμάτων. Υπάρχει επίσης σχετική έλλειψη ειδικών αντιδραστηρίων, σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστοκυττάρων και γενετικά χειραγωγημένων ζώων. Με την επίτευξη της μοριακής και την αλληλούχηση γονιδιώματος βασικών μεγάλων ζωικών ειδών, οι μέθοδοι μεταμόσχευσης, η μηχανική ιστών και η εφαρμογή βλαστικών κυττάρων στα θηλαστικά αυτά θα συνεχίσει να βελτιώνεται (Polejaeva et al., 2016). Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για να συμπεράνουμε ποιο ζωικό μοντέλο προσεγγίζει καλύτερα την ανθρώπινη τραχειακή νόσο αν και μερικές μελέτες δείχνουν ότι τα πρόβατα μπορεί να είναι το προτιμητέο μεγάλο ζωικό μοντέλο για τη μελέτη των αεραγωγών και της φυσιολογίας της τραχείας (Behrend et al., 2002). Η δημιουργία πρότυπου μεγάλου ζωικού μοντέλου για την επισκευή της τραχείας θα διευκολύνει αυτές τις εξελίξεις και τις μελλοντικά προκλινικές μελέτες. Αυτό θα συμπληρώσει τη χρήση μοντέλων τρωκτικών, οδηγώντας σε πιο ολοκληρωμένες μελέτες που μπορεί στη συνέχεια να μεταφραστούν σε κλινικό περιβάλλον.

Η εύρεση ενός ιδανικού υποκατάστατου αεραγωγού παραμένει ένας φευγαλέος στόχος. Ένα βιώσιμο μόσχευμα αεραγωγού που να λειτουργεί ως αγωγός για αναπνοή, και να παρέχει εκκαθάριση από βλεννογόνες εκκρίσεις δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί. Βασισμένοι στη βιβλιογραφία, συμπεραίνουμε σταθερά ότι η παραγωγή ενός κλινικά έγκυρου υποκατάστατου αεραγωγού απαιτεί περαιτέρω εργαστηριακή δουλειά και μεγάλα ζωικά μοντέλα για την αντιμετώπιση πολλών ανεπίλυτων θεμάτων.

Η μηχανική ιστών των σωληνωτών οργάνων είναι το επόμενο βήμα προς την κατασκευή πλήρως *in-vivo* κατασκευασμάτων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντικατάσταση των κατεστραμμένων ή χειρουργικά αφαιρούμενων οργάνων. Καινοτόμες και γρήγορες τεχνικές φαινοτύπησης και 3D εκτύπωσης αποτελούν σημαντικές μέθοδους παραγωγής καλά σχεδιασμένων και κατάλληλων κριωμάτων για ασθενείς. Η ιστομηχανική πιο περίπλοκων οργάνων πρέπει να αντιμετωπίσει πολλά από τα παραπάνω ζητήματα με όλη την πολυπλοκότητά τους και τις συνδέσεις μεταξύ διαφορετικών θεμάτων. Το μελλοντικό ενδιαφέρον θα έγκειται προς την κατεύθυνση της ενσωμάτωσης αυτών των συστατικών σε ένα σύστημα με κατάλληλη πηγή κυττάρων, βιοδιασπώμενων και μηχανικά κατάλληλων κριωμάτων συνδυάζοντας αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες μέσα στους βιοαντιδραστήρες για ελάχιστο χρονικό διάστημα (Aleksander et al., 2016).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε και αξιολογήθηκε ένα πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης με το οποίο δημιουργήσαμε ένα κριώμα τραχείας, κατάλληλο για μεταμόσχευση. Η δημιουργία του τραχειακού εμφυτεύματος φάνηκε ικανοποιητική ώστε να μπορεί να αποκαταστήσει τη δομή και τη λειτουργία του ιστού που αντικαθίσταται. Με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, δημιουργήθηκε ένας κυτταρικός, ιστομηχανικός αεραγωγός ο οποίος διατήρησε τις δομικές, βιοχημικές και μηχανικές ιδιότητές του και δεν παρουσίασε σημαντικό κίνδυνο ανοσολογικής απόκρισης. Επίσης, αυτή η έρευνα παρέχει νέα στοιχεία στις μεταμοσχεύσεις οργάνων και δείχνει πως ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαντιδραστήρας για να αποκατασταθεί η δομή και η λειτουργία του ιστού ώστε στο μέλλον να υπάρχουν επιτυχείς λειτουργικές λύσεις για σοβαρές κλινικές διαταραχές της αναπνευστικής οδού. Τελικά, η ανθρώπινη εφαρμογή αυτής της τεχνικής πρέπει να διερευνηθεί για να διαπιστωθεί κλινικά η αποτελεσματικότητά της

αποκυτταροποίησης και να αξιολογηθεί αν ο αεραγωγός μπορεί να λειτουργήσει φυσιολογικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. 2013;502(7471): 340–345.
2. Aleksander Góra, Damian Pliszka, Shayanti Mukherjee, and Seeram Ramakrishna.
3. Tubular Tissues and Organs of Human Body-Challenges in Regenerative Medicine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2016. Vol. 16, 19–39.
4. Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100–104.
5. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367(9518):1241–1246.
6. Atala A, Kasper FK, Mikos AG. Engineering complex tissues. *Sci Transl Med*. 2012;4(160):160rv12.
7. Atala A., Irvine D.J., Moses M., Shaunak S. Wound healing versus regeneration: Role of the tissue environment in regenerative medicine, *MRS Bulletin* 35. 2010;597-606.
8. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, et al. Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;14:279–84.
9. Bader A., Macchiarini P. Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach, *J Cell Mol Med* 14. 2010; 1877- 1889.
10. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function, *Acta Biomater* 5 (2009) 1-13.
11. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):109–116.
12. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res* 1989;47:74–80.
13. Badylak SF, Tullius R, Kokini K, Shelbourne KD, Klootwyk T, Voytik SL, et al. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res* 1995;29:977–85.
14. Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*. 2012;379(9819):943–952

1. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 2007;28:3587–3593.
2. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunol* 2004;12:367–77.
3. Baiguera S, Del Gaudio C, Jaus MO, Polizzi L, Gonfiotti A, Comin CE et al. Long-term changes to *in vitro* preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. *Biomaterials*. 2012;33(14):3662–72.
4. Baiguera S, Gonfiotti A, Jaus M, Comin CE, Paglierani M, Del Gaudio C et al. Development of bioengineered human larynx. *Biomaterials*. 2011;32(19):4433–42.
5. Baiguera S, Gonfiotti A, Jaus M, et al. Development of bioengineered human larynx. *Biomaterials*. 2011;32(19):4433–4442.
6. Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, et al. Tissue engineered human tracheas for *in vivo* implantation. *Biomaterials*. 2010;31(34):8931–8938.
7. Baiguera S., Macchiarini P. Regenerative Therapies-Trachea. (2013) *Regenerative Medicine*: Springer. pp. 843-859.
8. Baiguera Silvia, Del Gaudio Costantino, Kuevda Elena, Gonfiotti Alessandro, Bianco Alessandra, Macchiarini Paolo. Dynamic decellularization and cross-linking of rat tracheal matrix. *Biomaterials* 35 2014; 6344e635.
9. Beattie AJ, Gilbert TW, Guyot JP, Yates AJ, Badylak SF. Chemoattraction of progenitor cells by remodeling extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(5):1119–1125.
10. Behrend M, Otto K, Klempnauer J. The sheep as an experimental animal for tracheal surgery. *J Otolaryngol*. 2002;31:157e162.
11. Belsey R. Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea. *Br J Surg*. 1950;38:200e205.
12. Berg M., Ejnell H., Kovács A., Nayakawde N., Patil P.B. et al. Replacement of a tracheal stenosis with a tissue-engineered human trachea using autologous stem cells: a case report. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20:389-397
13. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint Report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the Investigators of the Participating Laboratories. In Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF (eds.). *Leucocyte typing: human leucocyte differentiation antigens detected by*

1. monoclonal antibodies: specification, classification, nomenclature. Berlin: Springer. 1984. pp. 45–48
2. Bernard MP, Chu ML, Myers JC, Ramirez F, Eikenberry EF, Prockop DJ. Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved due to evolution. *Biochemistry* 1983;22:5213–23.
3. Bernard MP, Myers JC, Chu ML, Ramirez F, Eikenberry EF, Prockop DJ. Structure of a cDNA for the pro alpha 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro alpha 2(I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene. *Biochemistry* 1983;22:1139–45.
4. Bonvillain RW, Danchuk S, Sullivan DE, et al. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial *in vitro* recellularization with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(23–24):2437–2452.
5. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis* 2002;11:457–62.
6. Borschel GH, Dennis RG, Kuzon Jr WM. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:595–602 .
7. Brand-Saber Beate E.M. , Schäfer Thorsten. Trachea: Anatomy and Physiology. *Thorac Surg Clin*. 2014; 24:1–5.
8. Butler CR, Speggorin S, Rijnberg FM, et al. Outcomes of slide tracheoplasty in 101 children: a 17-year single-center experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147:1783e1789.
9. Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res* 2000;49:134–40.
10. Cedervall J, Ahrlund-Richter L, Svensson B, et al. Injection of embryonic stem cells into scarred rabbit vocal folds enhances healing and improves viscoelasticity: short term results. *Laryngoscope*. 2007;117(11):2075–2081.
11. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology* 1999;54:407–10.
12. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials* 2004;25:2679–86.

- Cibantos-Filho JS, de Mello-Filho FV, Campos AD, Ellinguer F. Viability of a 12-ring complete tracheal segment transferred in the form of a compound flap: an experimental study in dogs. *Laryngoscope*. 2004;114:1949e1952.
- Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int*. 2005;18:727–734.
- Conese M, Carbone A, Castellani S, Di Gioia S. Paracrine effects and heterogeneity of marrow derived stem/progenitor cells: relevance for the treatment of respiratory diseases. *Cells Tissues Organs* 2013; 197: 445-73.
- Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS, Chen C. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys* 2002;24:173–83.
- Constantinou CD, Jimenez SA. Structure of cDNAs encoding the triple-helical domain of murine alpha 2 (VI) collagen chain and comparison to human and chick homologues. Use of polymerase chain reaction and partially degenerate oligonucleotide for generation of novel cDNA clones. *Matrix* 1991;11:1–9.
- Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res* 1994;28:655–66.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243.
- Crowley Claire, Birchall Martin and Seifalian Alexander M.. 2014; Trachea transplantation: from laboratory to patient. *J Tissue Eng Regen Med*
- Curcio E, Macchiarini P, De Bartolo L. Oxygen mass transfer in a human tissue-engineered trachea. *Biomaterials*. 2010;31(19):5131–6.
- Cutz E, Yeager H, Pan J. Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric lung disease-recent advances. *Pediatr Dev Pathol* 2007;10(6):419–35.
- D’Agostino B, Sullo N, Siniscalco D, De Angelis A, Rossi F. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 681-7.
- Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant* 2003;12:659–66.

- De Coppi P, Delo D, Farrugia L, et al. Angiogenic gene-modified muscle cells for enhancement of tissue formation. *Tissue Eng.* 2005;11(7–8):1034–1044.
- De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol* 2002;168:1789–92.
- Dellgren G, Eriksson M, Brodin LA, Radegran K. The extended Biocor stentless aortic bioprosthesis. Early clinical experience. *Scand Cardiovasc J* 1999;33:259–64.
- Deslauriers J, Ginsberg R, Nelems J, Pearson F. Innominate artery rupture: a major complication of tracheal surgery. *Ann Thorac Surg.* 1975;20(6):671–7. 1
- Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Pruss A, Konertz W. Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. *Ann Thorac Surg.* 2011; 92(4):1308–1314.
- Domicini M., Blanc L. K., Muller I., Cortenbach S., Marini FC., Krause DS., Deans RJ. Keating A., Prockop DJ., Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8: 315-317.
- Dougenis D. Trauma of the tracheobronchial tree. Department of Cardiothoracic Surgery, University of Patras, School of Medicine, Patras, Greece *Archives of Hellenic Medicine* 2002, 19(3):258–269
- Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* 2009;30:3749–3756.
- Elliott MJ, De Coppi P, Speggin S. et al Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet.* 2012;380(9846):994-1000.
- Epstein SK. Anatomy and physiology of tracheostomy. *Respir Care* 2005;50:476–82.
- Exposito JY, D’Alessio M, Solursh M, Ramirez F. Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen. *J Biol Chem* 1992;267:15559–62.
- Fairchild PJ. The challenge of immunogenicity in the quest for induced pluripotency. *Nature Rev Immunol.* 2010;10(12):868–875.

- Falke G, Yoo JJ, Kwon TG, Moreland R, Atala A. Formation of corporal tissue architecture in vivo using human cavernosal muscle and endothelial cells seeded on collagen matrices. *Tissue Eng* 2003;9:871–9.
- Finkbeiner WE. Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respir Physiol* 1999;118:77–83.
- Fishman JM, Ansari T, Sibbons P, De Coppi P, Birchall MA. Decellularized rabbit cricoarytenoid dorsalis muscle for laryngeal regeneration. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012;121(2):129–138.
- Fishman JM, De Coppi P, Elliott MJ, et al. Airway tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11(12):1623–1635.
- Fishman JM, Lowdell MW, Urbani L, et al. Immunomodulatory effect of a decellularized skeletal muscle scaffold in a discordant xenotransplantation model. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2013;110(35):14360-14365.
- Fishman JM, Mark Lowdell, Martin A. Birchall; Stem cell-based replacements- Airway and lung tissue engineering. *Seminars in Pediatric Surgery* 23: 2014;119-126.
- Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 2004;25:2353–61.
- Gallo G, Zwaveling S, Groen H, Van der Zee D, Hulscher J. Long-gap esophageal atresia: a meta-analysis of jejunal interposition, colon interposition, and gastric pull-up. *Eur J Pediatr Surg*. 2012;22(6):420–425.
- Gamba PG, Conconi MT, Lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int* 2002;18:327–31.
- Ghaedi M, Calle EA, Mendez JJ, et al. Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *J Clin Invest*. 2013;123(11): 4950–4962.
- Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res*. 2009;152:135–139.
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675–3683.
- Gilbert TW, Stolz DB, Biancaniello F, Simmons-Byrd A, Badylak SF. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005;26:1431–5.

- Go T, Jungebluth P, Baiguero S, et al. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139:437e443.
- Goh CS, Joethy JV, Tan BK, Wong M J Surg Res. Large animal models for segment tracheal reconstruction: a systematic review. *Journal of Surgical Research* 2018; 231:140-153.
- Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. Preparation and characterization of collagen–elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs* 2000; 24:217–23.
- Gonfiotti A, Jaus MO, Barale D, Baiguera S, Comin C, Lavorini F, Fontana G, Sibila O, Rom-bolà G, Jungebluth P, Macchiarini P. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet* 2014; 383: 238-44.
- Gonfiotti A, Jaus MO, Barale D, et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet*. 2014; 383(9913):238–244.
- Gotts JE, Matthay MA. Cell therapy for lung disease: a step forward. *Chest* 2013; 143: 1525-1527.
- Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:566–71.
- Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:2003–10.
- Grillo H, Dignan E, Miura T. Experimental reconstruction of cervical trachea after circumferential resection. *Plast Reconstr Surg*. 1966; 38(3):272.
- Grillo HC, Dignan EF, Miura T. Experimental reconstruction of cervical trachea after circumferential resection. *Surg Gynecol Obstet*. 1966; 122:733–8.
- Grillo HC. Reconstruction of the trachea. Experience in 100 consecutive cases. *Thorax*. 1973; 28:667e679.
- Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg* 2002; 73:1995-2004.
- Gulati AK. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg*. 1988; 68:117–23.

- Haag J, Baiguera S, Jungebluth P, Barale D, Del Gaudio C, Castiglione F, et al. Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue. *Biomaterials*. 2012; 33:780e9.
- Haag J, Baiguera S, Jungebluth P, Barale D, Del Gaudio C, Castiglione F et al. Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue. *Biomaterials*. 2011.
- Hamilton N., Kanani M., Roebuck D., Hewitt R., Cetto R. et al., Tissue-engineered tracheal replacement in a child: A 4-year follow-up study, *Am J Transplant* 2015.
- Harper C. Permacol: clinical experience with a new biomaterial. *Hosp Med* 2001; 62:90–5.
- Hawkins JA, Breinholt JP, Lambert LM, et al. Class I and class II anti-HLA antibodies after implantation of cryopreserved allograft material in pediatric patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 119(2):324–330
- Herrera P, Caldarone C, Forte V, et al. The current state of congenital tracheal stenosis. *Pediatr Surg Int*. 2007; 23:1033e1044.
- Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, et al. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 139(2):431–436.
- Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013; 341(6146):651–654.
- Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Enginee an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng* 2004; 10:1346–58.
- Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng* 2004; 10:1641–51.
- Inamdar AC, Inamdar AA. Mesenchymal stem cell therapy in lung disorders: pathogenesis of lung diseases and mechanism of action of mesenchymal stem cell. *Exp Lung Res* 2013; 39: 315-27.
- Jackson DW, Grood ES, Arnoczky SP, Butler DL, Simon TM. Cruciate reconstruction using freeze dried anterior cruciate ligament allograft and a ligament augmentation device (LAD). An experimental study in a goat model. *Am J Sports Med* 1987; 15:528–38.

- Jackson DW, Grood ES, Arnoczky SP, Butler DL, Simon TM. Freeze dried anterior cruciate ligament allografts. Preliminary studies in a goat model. *Am J Sports Med* 1987; 15:295–303.
- Jackson DW, Grood ES, Cohn BT, Arnoczky SP, Simon TM, Cummings JF. The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats. *J Bone Joint Surg Am.* 1991; 73:201–13.
- Jackson DW, Grood ES, Wilcox P, Butler DL, Simon TM, Holden JP. The effects of processing techniques on the mechanical properties of bone–anterior cruciate ligament–bone allografts. An experimental study in goats. *Am J Sports Med.* 1988; 16:101–5.
- Jackson DW, Simon TM. Donor cell survival and repopulation after intraarticular transplantation of tendon and ligament allografts. *Microsc Res Tech* 2002; 58:25–33.
- Jackson DW, Windler GE, Simon TM. Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone–patella tendon–bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* 1990; 18:1–10.
- Jacobs JP, Quintessenza JA, Andrews T, et al. Tracheal allograft reconstruction: the total North American and worldwide pediatric experiences. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68(3):1043–1051.
- Johannes C. Haag, Philipp Jungebluth, Pablo Macchiarini. Tracheal replacement for primary tracheal cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013; 21:171–177.
- Johnson BQ, Fox R, Chen X, Thibeault S. Tissue regeneration of the vocal fold using bone marrow mesenchymal stem cells and synthetic extracellular matrix injections in rats. *Laryngoscope.* 2010; 120(3):537–545.
- Jungebluth P, Alici E, Baiguera S, et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. *Lancet.* 2011; 378(9808):1997–2004
- Jungebluth P, Bader A, Baiguera S, et al. The concept of *in vivo* airway tissue engineered. *Biomaterials.* 2012; 33(17):4319–4326.

- Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, et al. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009; 138(3):586–593.
- Jungebluth P, Moll G, Baiguera S, Macchiarini P. Tissue-engineered airway: a regenerative solution. *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 91(1):81–93.
- Jungebluth P., Alici E., Baiguera S., Le Blanc K., Blomberg P. et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study, *Lancet.* 2011; 378: 1997-2004.
- Kajbafzadeh A.M, Sabetkish S., Sabetkish N., Muhammadnejad S., Akbarzadeh A., Tavangar S.M., Mohseni M.J., Amanpour S. In-Vivo trachea regeneration: fabrication of a tissue-engineered trachea in nude mice using the body as a natural bioreactor. *Surg Today.* 2014.
- Kajbafzadeh AM, Javan-Farazmand N, Monajemzadeh M, Baghayee A. Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue. *Tissue Eng Part C Methods* 2013; 19:642e51.
- Kakkar R, Grover SR. Theoretical study of molecular recognition by Hoechst 33258 derivatives. *J Biomol Struct Dynam.* 2005; 23:37–47.
- Kandjov IM. Heat and water rate transfer processes in the human respiratory tract at various altitudes. *J Theor Biol.* 2001; 208:287–93.
- Kanemaru S, Kitani Y, Ohno S, et al. Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells. *Laryngoscope.* 2013; 123(11):2728–2734.
- Kapuscinski J, Skoczylas B. Fluorescent complexes of DNA with DAPI 40,6-diamidine-2-phenyl indole.2HCl or DCI 40,6-dicarboxamide- 2-phenyl indole. *Nucleic Acids Res.* 1978; 5:3775–99.
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs.* 2003; 26:421–7.
- Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfenbarger Jr L, et al. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg* 2005;79:888–96.
- Kim BS, Yoo JJ, Atala A. Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 68:201–9.

- Kim J, Suh SW, Shin JY, Kim JH, Choi YS, Kim H. Replacement of a tracheal defect with a tissue-engineered prosthesis: early results from animal experiments. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 128:124e129.
- Kim J.H., Kong W.H., Kim J.G., Kim H.J., Seo S.W. Possibility of skin epithelial cell transdifferentiation in tracheal reconstruction, *Artif Organs.* 2011; 35: 122- 130.
- Kim S-H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011; 209:139e51.
- Klebe RJ. Cell attachment to collagen: the requirement for energy. *J Cell Physiol.* 1975; 86:231–6.
- Klebe RJ. Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature.* 1974; 250:248–51.
- Kolker AR, Brown DJ, Redstone JS, Scarpinato VM, Wallack MK. Multilayer reconstruction of abdominal wall defects with acellular dermal allograft (AlloDerm) and component separation. *Ann Plast Surg.* 2005; 55:36–41.
- Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2002; 11:463–71.
- Kral T, Widerak K, Langner M, Hof M. Propidium iodide and PicoGreen as dyes for the DNA fluorescence correlation spectroscopy measurements. *J Fluoresc.* 2005; 15:179–83.
- Krasteva G, Kummer W. “Tasting” the airway lining fluid. *Histochem Cell Biol.* 2012; 138:365–83.
- Kropp BP, Eppley BL, Prevel CD, Rippey MK, Harruff RC, Badylak SF, et al. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology.* 1995; 46:396–400.
- Kummer W, Lips KS, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130(2):219–34.
- Kunisaki S.M., Freedman D.A., Fauza D.O., Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes, *J Pediatr Surg.* 2006; 41:675-682.

- Lange P, Fishman JM, Elliott MJ, De Coppi P, Birchall MA. What can regenerative medicine offer for infants with laryngotracheal agenesis? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011; 145(4):544–550
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260(5110):920–926.
- Latt SA, Wohlleb JC. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma.* 1975; 52:297–316.
- Lecht S, Stabler CT, Rylander AL, et al. Enhanced reseeded of decellularized rodent lungs with mouse embryonic stem cells. *Biomaterials.* 2014; 35(10): 3252–3262.
- Lee MS. Graft Jacket augmentation of chronic Achilles tendon ruptures. *Orthopedics.* 2004; 27:s151–3.
- Lin C.-H., Hsu S.-h., Huang C.-E., Cheng W.-T., Su J.-M. A scaffold-bioreactor system for a tissue-engineered trachea, *Biomaterials.* 2009; 30:4117-4126.
- Lin C.-H., JSu.-M., Hsu S.-H. Evaluation of type II collagen scaffolds reinforced by poly (epsilon-caprolactone) as tissue-engineered trachea. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14:69-77.
- Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng.* 2004; 10:1046–53.
- Liqiong Gui, Akihito Muto, Stephen A. Chan, Christopher K. Breuer and Laura E. Niklason. Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(9):2665-76.
- Ma R, Li M, Luo J, et al. Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. *Biomaterials.* 2013; 34(7):1790–1798.
- Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008; 372(9655):2023–2030.
- Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Holland-er AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008; 372: 2023-30.
- Macchiarini P, Lenot B, de Montpreville V, et al. Heterotopic pig model for direct revascularization and venous drainage of tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 108:1066e1075.

- Macchiarini P. Bioartificial tracheobronchial transplantation. Interview with Paolo Macchiarini. *Regen Med.* 2011; 6 Spl: 14-5.
- Macchiarini P. Primary tracheal tumours. *Lancet Oncol.* 2006; 7:83-91.
- Macchiarini scandal is a valuable lesson for the Karolinska Institute. *Nature.* 2016; 537:137.
- Maghsoudlou P, Georgiades F, Tyraskis A, et al. Preservation of microarchitecture and angiogenic potential in a pulmonary acellular matrix obtained using intermittent intra-tracheal flow of detergent enzymatic treatment. *Biomaterials.* 2013.
- Martinod E, Seguin A, Holder-Espinasse M, et al. Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta. *Ann Thorac Surg.* 2005; 79:942e948.
- Martinod E, Seguin A, Pfeuty K, et al. Long-term evaluation of the replacement of the trachea with an autologous aortic graft. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75:1572e1578.
- Martins-Green M, Bissel MF. Cell–extracellular matrix interactions in development. *Semin Dev Biol.* 1995; 6:149–59.
- McFetridge PS, Daniel JW, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 70:224–34.
- Meezan E, Hjelle JT, Brendel K, et al. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci.* 1975; 17:1721–1732.
- Merigo F, Benati D, Tizziano M, et al. a-Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell Tissue Res.* 2005; 319(2):211–9.
- Mertsching H, Schanz J, Steger V, et al. Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation.* 2009; 88(2):203–210.
- Metcalf MH, Savoie FH, Kellum B. Surgical technique for xenograft (SIS) augmentation of rotator-cuff repairs. *Oper Tech Orthop.* 2002; 12:204–8.
- Nakanishi R, Shirakusa T, Mitsudomi T. Maximum length of mtracheal autografts in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 106:1081e1087.
- Nichols JE, Niles J, Riddle M, et al. Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19(17–18):2045–2062.

- Nomoto Y, Okano W, Imaizumi M, et al. Bioengineered prosthesis with allogenic heterotopic fibroblasts for cricoid regeneration. *Laryngoscope*. 2012; 122(4):805–809.
- Nouraei SA, Ma E, Patel A, Howard DJ, Sandhu GS. Estimating the population incidence of adult post-intubation laryngotracheal stenosis. *Clin Otolaryngol*. 2007; 32:411e412.
- Olausson M, Patil PB, Kuna VK, et al. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *Lancet*. 2012; 380(9838):230–237.
- Orlando G, Wood KJ, Soker S, Stratta RJ. How regenerative medicine may contribute to the achievement of an immunosuppression-free state. *Trans-plantation*. 2011; 92(8):e36–e38
- Orlando G, Wood KJ, Stratta RJ, et al. Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation*. 2011; 91(12): 1310–1317.
- Orlando G. Immunosuppression-free transplantation reconsidered from a regenerative medicine perspective. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012; 8(2): 179–187.
- Oseni A, Crowley C, Lowdell Met al; Advancing nasal reconstructive surgery: the application of tissue engineering technology. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; 757–768.
- Ott HC. Engineering tissues for children: building grafts that grow. *Lancet*. 2012; 380(9846): 957–958.
- Ott LM, Weatherly RA, Detamore MS. Overview of tracheal tissue engineering: clinical need drives the laboratory approach. *Ann Biomed Eng*. 2011; 39:2091e2113.
- Partington L, Mordan NJ, Mason C, et al. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. *Acta Biomater*. 2013; 9(2):5251–5261.
- Paul W. Furlow, Douglas J. Mathisen. Surgical anatomy of the trachea. *Ann Cardiothorac Surg*. 2018; 7(2):255-260.
- Petersen, T.H., E.A. Calle, L. Zhao, E.J. Lee, L. Gui, M.B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z.W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog, L.E. Niklason. Tissue engineered lungs for in-vivo implantation. 2010; *Science* 329: 538–541.

- Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three metaanalyses of dated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Metaanalysis of chemotherapy on head and neck cancer. *Lancet*. 2000; 355(9208): 949–955
- Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. *Technol HealthCare*. 2011; 19(1):55–69.
- Polejaeva IA, Rutigliano HM, Wells KD. Livestock in biomedical research: history, current status and future prospective. *Reprod Fertil Dev*. 2016; 28:112e124.
- Probst M, Dahiya R, Carrier S, Tanagho EA. Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. *Br J Urol*. 1997; 79:505–15.
- Puchelle E., Peault B. Human airway xenograft models of epithelial cell regeneration, *Respir Res*. 2000; 1:125.
- Quintana JR, Lipanov AA, Dickerson RE. Low-temperature crystallographic analyses of the binding of Hoechst 33258 to the doublehelical DNA dodecamer C–G–C–G–A–A–T–T–C–G–C–G. *Biochemistry* 1991; 30:10294–306.
- Raghunath J, Rollo J, Sales KM et al; Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem*. 2007; 46(2): 73–84.
- Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, et al. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*. 2011; 377(9772):1175–1182.
- Remlinger NT, Czajka CA, Juhas ME, et al. Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. *Biomaterials*. 2010; 31(13):3520–3526.
- Remlinger NT, Czajka CA, Juhas ME, Vorp DA, Stolz DB, Badylak SF, et al. Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. *Biomaterials*. 2010; 31(13):3520–6.
- Rich JT, Gullane PJ. Current concepts in tracheal reconstruction. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 20:246e253.
- Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 127:399–405.

- Roberts CR, Rains JK, Pare PD, et al. Ultrastructure and tensile properties of human tracheal cartilage. *J Biomech.* 1998; 31:81–86.
- Roberts TS, Drez Jr D, McCarthy W, Paine R. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med* 1991; 19:35–41.
- Roomans GM. Tissue engineering and the use of stem/progenitor cells for airway epithelium repair. *Eur Cell Mater.* 2010; 19: 284–299.
- Satir P., Christensen S.T. Overview of structure and function of mammalian cilia, *Annu. Rev. Physiol.* 2007; 69:377-400.
- Scheerlinck JP, Snibson KJ, Bowles VM, Sutton P. Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. *Trends Biotechnol.* 2008; 26:259e266.
- Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, Konig K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol.* 2003; 143:201–8.
- Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials.* 2000; 21:2215–31.
- Schoch KG, Lori A, Burns KA, et al. A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L631–42.
- Schultz P, Vautier D, Charpiot A, Lavallo P, Debry C. Development of tracheal prostheses made of porous titanium: a study on sheep. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007; 264:433e438.
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1666:105–117.
- Sokolis DP, Zarbis N, Dosios T, Papalouka V, Papadimitriou L, Boudoulas H, Karayannacos PE. Post-vagotomy mechanical characteristics and structure of the thoracic aortic wall. *Ann Biomed Eng* 2005; 33:1504-16.
- Sokolis DP. A passive strain-energy function for elastic and muscular arteries: correlation of material parameters with histological data. *Med Biol Eng Comput* 2010; 48:507-518.
- Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Jasso-Victoria R, et al. Cryopreserved tracheal grafts: a review of the literature. *J Invest Surg.* 2006; 19(2):125–135.

- Stannard W., O'Callaghan C. Ciliary function and the role of cilia in clearance, *J Aerosol Med.* 2006; 19:110-115.
- Stapleton TW, Ingram J, Katta J, et al. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2008; 14:505–518.
- Sueblinvong V, Weiss DJ. Stem cells and cell therapy approaches in lung biology and diseases. *Transl Res.* 2010; 156: 188-205.
- Svensson B, Nagubothu SR, Cedervall J, et al. Injection of human mesenchymal stem cells improves healing of vocal folds after scar excision-a xenograft analysis. *Laryngoscope.* 2011; 121(10):2185–2190.
- Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb Jr FJ, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol.* 2012; 49:344e356.
- Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell.* 2013; 153(6):1228–1238.
- Takahashi K, Yamanaka S. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell.* 2006; 4: 663-76.
- Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissueengineeringof vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19:381–6.
- Ten Hallers EJ, Rakhorst G, Marres HA, et al. Animal models for tracheal research. *Biomaterials.* 2004; 25:1533e1543.
- The Macchiarini Case - Investigation of the synthetic trachea transplantations at Karolinska University Hospital; 2016.
- Totonelli G, Maghsoudlou P, Fishman JM, et al. Esophageal tissue engineer: a new approach for esophageal replacement. *World J Gastroenterol.* 2012; 18:6900–6907.
- Totonelli G, Maghsoudlou P, Garriboli M, et al. A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials.* 2012; 33:3401–3410.
- Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, Hara M, Matsuda H, et al. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res. A* 2003; 67:834–7.
- Urdaneta AI, James BY, Wilson LD. Population based cancer registry analysis of primary tracheal carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2011; 34:32e37.

- Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999; 354:SI32–4.
- Vacanti J. Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *Journal of Pediatric Surgery*. 2010; 45:291-294.
- Vogel G. Trachea transplants test the limits, *Science*. 2013; 340:266-268.
- Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, Baskin JZ, Schoen FJ, Bianco R, et al. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms. *Circulation*. 1997; 95:479–88.
- Wagner DE, Bonenfant NR, Parsons CS, et al. Comparative decellularization and recellularization of normal versus emphysematous human lungs. *Bio-materials*. 2014; 35(10):3281–3297.
- Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*. 1995; 21:243–8.
- Walles T, Herden T, Haverich A, Mertsching H. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials*. 2003; 24:1233–9.
- Weiss DJ. Concise review: current status of stem cells and regenerative medicine in lung biology and diseases. *Stem Cells*. 2014; 32: 16-25.
- Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials*. 2005; 26:7339–49.
- Wu W., Cheng X., Zhao Y., Chen F., Feng X. et al. Tissue engineering of trachea like cartilage grafts by using chondrocyte macro aggregate: experimental study in rabbits, *Artif Organs*. 2007; 31:826-834.
- Wu W., Feng X., Mao T., Feng X., Ouyang H.-W., et al. Engineering of human tracheal tissue with collagen-enforced poly-lactic-glycolic acid non-woven mesh: a preliminary study in nude mice, *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 45:272-278.
- Xu T, Olson J, Zhao W, Atala A, Zhu JM, Yoo JJ. Characterization of cell constructs generated with inkjet printing technology using in vivo magnetic resonance imaging. *J Manuf Sci Eng*. 2008; 130:021-013.
- Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology*. 1998; 51:221–5.

- Zang Mengqing, Zhang Qixu, Chang Edward I., Mathur Anshu B., Yu Peirong. Decellularized Tracheal Matrix Scaffold for Tissue Engineering. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012.
- Zani B.G., Kojima K., Vacanti C.A., Edelman E.R. Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair, *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105:7046-7051.
- Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 474:212–215.
- Μπαλταγιάννης Ν., Αναγνωστόπουλος . Τραύματα της τραχείας. *Επιστημονικά Χρονικά*. 2017; 22: 118-149.

