



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Αναπληρωτής Καθηγητής **ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΔΑΠΟΝΤΕ**

Διδακτορική Διατριβή

**" ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΣΕ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ "**

ΕΛΕΝΗΣ Κ. ΚΑΤΣΙΑΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2016

© 2016 Ελένη Κατσιάνη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Τριμελής Επιτροπή

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** Δρ. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης
Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Δρ. Ασπασία Τσέζου
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Δρ. Αθανάσιος Καλλιτσάρης
Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επταμελής Επιτροπή:

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής συμπληρούμενα από τα παρακάτω μέλη ΔΕΠ:

4^{ος} Εξεταστής Δρ. Συρογιαννόπουλος Γεώργιος
Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής Δρ. Αλέξανδρος Δαπόντε
Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής Δρ. Κωνσταντίνος Νταφόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας\

7^{ος} Εξεταστής Δρ. Μεσσήνη Χριστίνα
Λέκτορας Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω κυρίως τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ιωάννη Μεσσήνη. Χάρη στη σωστή καθοδήγησή του, την εμπιστοσύνη και τη στήριξη που μου έδειξε κατέστη εφικτή η πραγματοποίηση του συγκεκριμένου ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Α. Τσέζου και τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Α. Καλλιτσάρη για τη συμμετοχή στη τριμελή επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Α. Γκαρά για τη συλλογή και παραχώρηση των δειγμάτων χοριακών λαχνών και για την αμέριστη υποστήριξή του στην εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής καθώς και την Ιατρό Δρ. κ. Χ. Σκέντου για την συλλογή και παραχώρηση των δειγμάτων χοριακών λαχνών. Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κ. Νταφόπουλο για τη βοήθεια του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, μέλη ΔΕΠ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας: κ. Συρογιανόπουλο, Καθηγητή Παιδιατρικής, κ. Α. Δαπόντε και Κ. Νταφόπουλο, αναπληρωτές Καθηγητές Μαιευτικής και Γυναικολογίας και τη κ. Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορα Μαιευτικής και Γυναικολογίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Π. Κόλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου του ΕΚΠΑ και τη Δρ. Πιπίνα Παπαγγελή για τη στήριξή τους και τη καθοδήγηση τους στο ξεκίνημα της διδακτορικής διατριβής αλλά και για τη διάθεσή να βοηθήσουν οποτεδήποτε χρειάστηκα τη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την αγάπη, την υπομονή τους και την αμέριστη υποστήριξή τους.

Ελένη Κατσιάνη

Στους αγαπημένους μου γονείς

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΣΠΟΥΔΕΣ-ΠΤΥΧΙΑ

Υποψήφια Διδάκτωρ (2008-2016)

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Μητέρας Παιδιού.

Θέμα Διατριβής: «Μελέτη Έκφρασης Γονιδίων Αρχέγονων Βλαστικών Κυττάρων Σε Τροφοβλαστικά Κύτταρα», *Επιβλέπων Καθηγητής:* Ι. Μεσσήνης

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (2006-2007)

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, Ιατρική Σχολή Λάρισας

Βαθμός : Άριστα 9,00

Διπλωματική εργασία: Καλλιέργεια Βλαστικών Κυττάρων από Τροφοβλάστη (Βαθμός: 10)

Πτυχίο Βιολογικών Επιστημών (1999-2005)

Φυσικομαθηματική Σχολή, Πανεπιστήμιο Μπολώνιας/Ιταλίας,

Βαθμός: Άριστα 8,98

Πτυχιακή Εργασία: Απομόνωση, Χαρακτηρισμός Και Εκμηχάνιση Των Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων Από Μυελό Των Οστών Εφήβων (Βαθμός 10/10)

Υποτροφίες: 2001 - 2005 από το ARSTUD (Azienda regionale per il diritto allo studio universitario)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- Υπεύθυνη Πωλήσεων B. Ελλάδος Life Science Chemilab (09/2014-Σήμερα)
- Επιστημονικός Συνεργάτης BIOHELLENIKA (10/2008-07/2014), Τμήμα Πωλήσεων-Επιστημονικής Ενημέρωσης,
- Επιστημονικός Συνεργάτης CRYOTECH (07/2007-09/2009), Τμήμα Πωλήσεων-Επιστημονικής Ενημέρωσης,
- Εκπαιδευτικός στο Ιδιωτικό ΙΕΚ & ΤΕΕ ΜΑΚΡΙΔΗ (2005-2007)
- Άδεια Ασκήσεως Επαγγέλματος (2005 - Βαθμός 112/150)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ:

- «Chorionic villi derived mesenchymal stem cells and expression of embryonic stem cells markers» *Cell Tissue Bank*. 2016 May 2. [Epub ahead of print]
- «Effect of Anti-Müllerian hormone (AMH) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) on steroidogenesis in primary-cultured human luteinizing granulosa cells through Smad5 signalling» *J Assist Reprod Genet*. 2015 Jul; 32(7):1079-88.
- «Chorionic villi derived mesenchymal stem cells and expression of embryonic stem cells markers» *28th Annual Meeting of ESHRE - Istanbul 2012*.
- «Κλινικές & Άλλες Εφαρμογές των Βλαστοκυττάρων Του Ανθρώπινου Σώματος» Μετεκπαιδευτικές Διαλέξεις Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής Παν. Νοσ. Λάρισας, 11/2012.
- «Κυτταροκαλλιέργειες (Μέτρηση & Βιωσιμότητα Κυττάρων), Διάλεξη/Εργαστήριο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Βιολογία της Αναπαραγωγής Ιατρική Σχολή Λάρισας, 03/2013 & 04/2014.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

- Άριστη γνώση ΙΤΑΛΙΚΩΝ
- ΑΓΓΛΙΚΑ Πτυχίο LOWER TOEIC

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ:

- Δίπλωμα ECDL

**" ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΣΕ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ "**

ΕΛΕΝΗ ΚΑΤΣΙΑΝΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης**, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**,
2. **Δρ. Αθανάσιος Καλλιτσάρης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Ασπασία Τσέζου**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	13
1.1 Τροφοβλάστη-Χοριακές Λάχνες, Γενικά Χαρακτηριστικά	14
1.2 Βλαστικά Αρχεγονα Κύτταρα	27
1.3 Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα	31
1.3.1 Γονίδια Μάρτυρες Πολυδυναμικότητας	32
1.4 Επαγόμενα Πολλαπλά Δυναμικά Κύτταρα (iPCs)	42
1.5 Ογκογονικότητα Πολυδύναμων Βλαστικών Κυττάρων	46
1.6 Ενήλικα Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα	49
1.7 Εξωεμβρυϊκά Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα	57
1.8 Σκοπός της Έρευνας	62
 Κεφάλαιο 2: Υλικά Και Μεθοδοι	 64
2.1 Κύτταρα	66
2.1.1 Διάσπαση Ιστού Χοριακών Λαχνών & Απομόνωση Κυττάρων	66
2.1.2 Καλλιέργεια Χοριακών Λαχνών -Προερχόμενων Κυττάρων	67
2.1.3 Μέτρηση Κυττάρων	68
2.1.4 Υπολογισμός Πληθυσμιακού-Κυτταρικού Διπλασιασμού	70
2.2 Καρυοτυπική Ανάλυση	70
2.3 Ανοσοφαινοτυπική Ανάλυση - Κυτταρομετρία Ροής	72
2.4 Στατιστική Ανάλυση	73
2.5 Αξιολόγηση Διαφοροποιητικής Ικανότητας	74
2.5.1 Λιπογενής Διαφοροποίηση	74
2.5.2 Οστεογενής Διαφοροποίηση	74
2.5.3 Χονδρογενής Διαφοροποίηση	75
2.5.4 Νευρογενής Διαφοροποίηση	75
2.6 Χρώση Κυττάρων	77
2.6.1 Crystal Violet	77
2.6.2 Oil Red O	77
2.6.3 Nitro Blue Tetrazolium & Alizarin Red S	77
2.6.4 Alcian Blue	78
2.6.5 Cresyl Violet (Nils Staining)	78

2.7 Μοριακές Τεχνικές	79
2.7.1 Απομόνωση RNA	79
2.7.2 Ποσοτικός και Ποιοτικός Έλεγχος RNA	81
2.7.3 Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA	81
2.7.4 Σχεδιασμός Εκκινητών Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	83
2.7.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	84
2.7.6 Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης	85
2.7.7 Φωτομετρικός Προσδιορισμός Νουκλεϊκών Οξέων	87
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα	88
3.1 Καλλιέργεια Κυττάρων	89
3.1.1 Μορφολογία	89
3.1.2 Κυτταρικό Πολλαπλασιασμός	91
3.2 Καρυότυπος	91
3.3 Ανοσοφαινότυπος	93
3.4 Διαφοροποιητική Ικανότητα	96
3.4.1 Λιπογενής Διαφοροποίηση	96
3.4.2 Οστεογενής Διαφοροποίηση	99
3.4.3 Χονδρογενής Διαφοροποίηση	102
3.4.4 Νευρογενής Διαφοροποίηση	105
3.5 Έκφραση Γονιδιακού Προφίλ	108
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση	110
4.1 Συζήτηση	110
4.2 Συμπεράσματα	117
Κεφάλαιο 5: Σύνοψη Διατριβής	120
5.1 Σύνοψη	121
5.2 Summary	124
Βιβλιογραφία	126

Πρόλογος

Η βιολογία των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων αποτελεί ένα από τα πιο γρήγορα εξελισσόμενα πεδία βιοϊατρικών ερευνών με αναζήτηση κυττάρων σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα διαχωρίζονται από τους άλλους τύπους κυττάρων εξαιτίας των δύο σημαντικών χαρακτηριστικών τους, της ικανότητας τους να αυτοανανεώνονται ως αδιαφοροποίητα κύτταρα αλλά και της ικανότητας τους υπό φυσιολογικές ή πειραματικές συνθήκες να διαφοροποιούνται σε ιστοειδικά κύτταρα.

Η χρήση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε κυτταρικές θεραπείες πραγματοποιείται εδώ και δεκαετίες. Απαραίτητη όμως προϋπόθεση για αυτό αποτελεί ο μεγάλος αριθμός κυττάρων. Η προέλευση πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων από ενήλικες ιστούς σίγουρα δεν αντιμετωπίζει ηθικές ενστάσεις και προβλήματα ογκογονικότητας όπως αντίστοιχα αντιμετωπίζουν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, αλλά υπάρχουν προβλήματα απομόνωσης, μείωσης του αριθμού τους και απώλεια της πολυδυναμικότητάς τους, συνδεδεμένα με την ηλικία του δότη. Οι λόγοι αυτοί έστρεψαν τους ερευνητές στην απομόνωση βλαστικών μεσεγχυματικών κυττάρων από εξωεμβρυϊκούς ιστούς, που αποτελούν πηγές αναπτυξιακά νεότερες, με κύτταρα που ίσως είναι εγγύτερα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Το γεγονός ότι πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο πλακούντας είναι όργανο εμβρυϊκής προέλευσης με πλούσια έκφραση μορίων-δεικτών των βλαστικών κυττάρων, μας ώθησε να απομονώσουμε κύτταρα από χοριακές λάχνες 1^{ου} τριμήνου.

Βασισμένη στην επιστημονική βιβλιογραφία σε ότι αφορά τα χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών αρχέγονων βλαστικών κυττάρων αναζητήσαμε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCS) σε χοριακές λάχνες 1ου τριμήνου, αναζητώντας παράλληλα και χαρακτηριστικά βλαστικότητας συνδεδεμένα με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, δηλαδή την έκφραση γονιδίων δεικτών των εμβρυϊκών βλαστικών. Η εργασία αυτή είναι μια προσπάθεια διερεύνησης τόσο των χαρακτηριστικών των κυττάρων που προέρχονται από λάχνες πρώτου τριμήνου αλλά και της δυνατότητας να διατηρήσουμε αυτά τα κύτταρα σε σχήματα παρατεταμένων καλλιιεργειών.

Ο σκοπός των παρατεταμένων καλλιιεργειών είναι αφενός να ελέγξουμε τη πολλαπλασιαστική ικανότητα αυτού του πληθυσμού κυττάρων που ίσως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κυτταρικές θεραπείες και αφετέρου να αναζητήσουμε τις πιθανές επιπτώσεις της παρατεταμένης χρονικά καλλιέργειας στα φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά των αυτών των κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

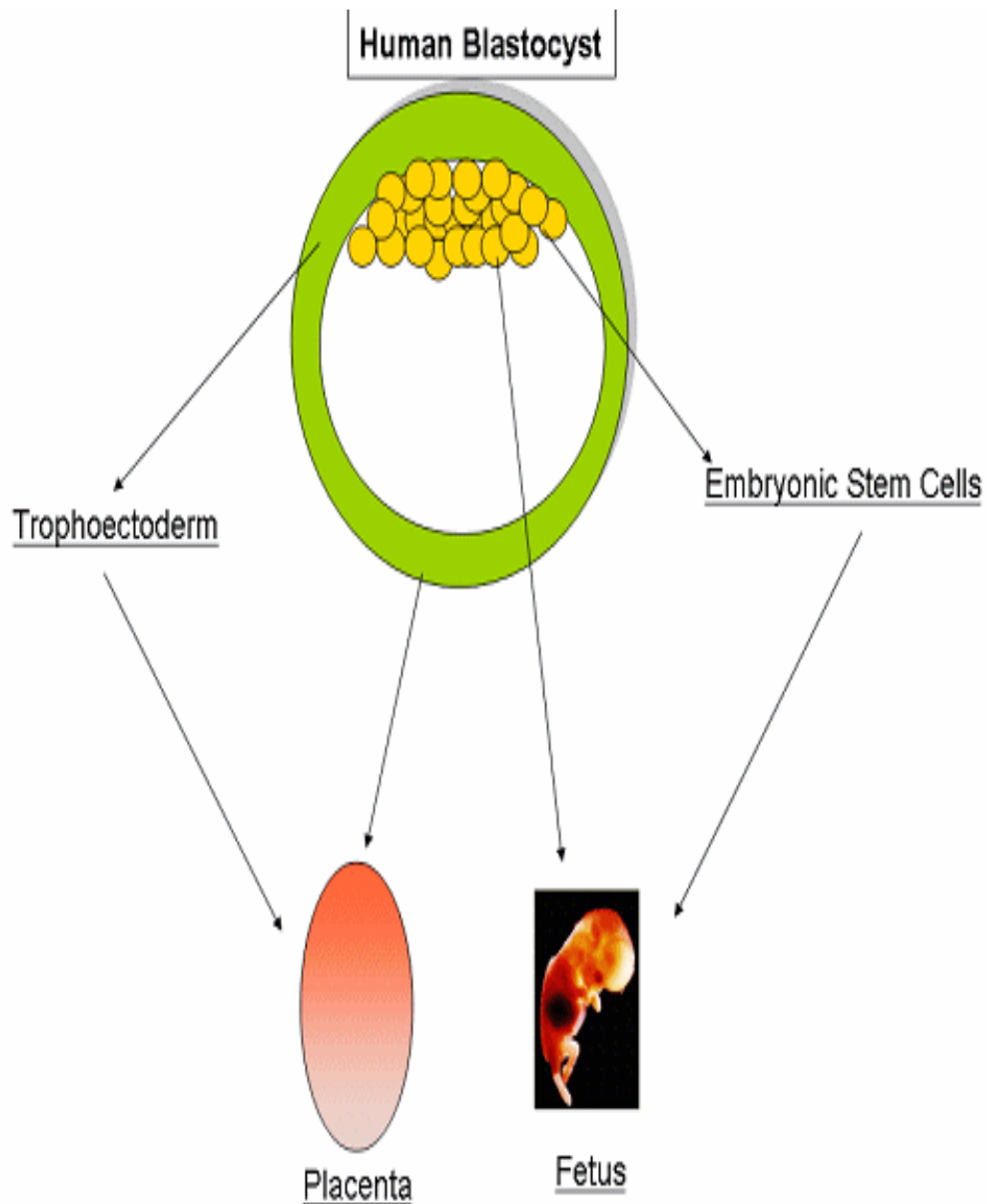
1.1 ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗ- ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΛΑΧΝΕΣ:

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο όρος τροφοβλάστη έχει εισαχθεί από τον A.A.W. Hubrecht στο τέλος του 19^{ου} αιώνα (1) ώστε να χαρακτηρίσει αυτά τα κύτταρα που προκύπτουν από τη βλαστοκύστη, τα οποία δεν θα αποτελέσουν μέρος του εμβρύου αλλά είναι απαραίτητα για τη διατροφή του. Το τροφοεκτόδερμα της βλαστοκύστης θα σχηματίσει τον πλακούντα, ενώ από την έσω κυτταρική μάζα θα προκύψει το έμβρυο (Εικόνα 1).

Στο στάδιο της μορούλας, η τροφοβλάστη αποτελεί την πρώτη κυτταρική σειρά που διαφοροποιείται κατά την εμβρυογένεση, εν συνέχεια η τροφοβλάστη διαφοροποιείται στο εξωτερικό στρώμα της βλαστοκύστης, που θα περιβάλλει το πρώιμο έμβρυο (2).

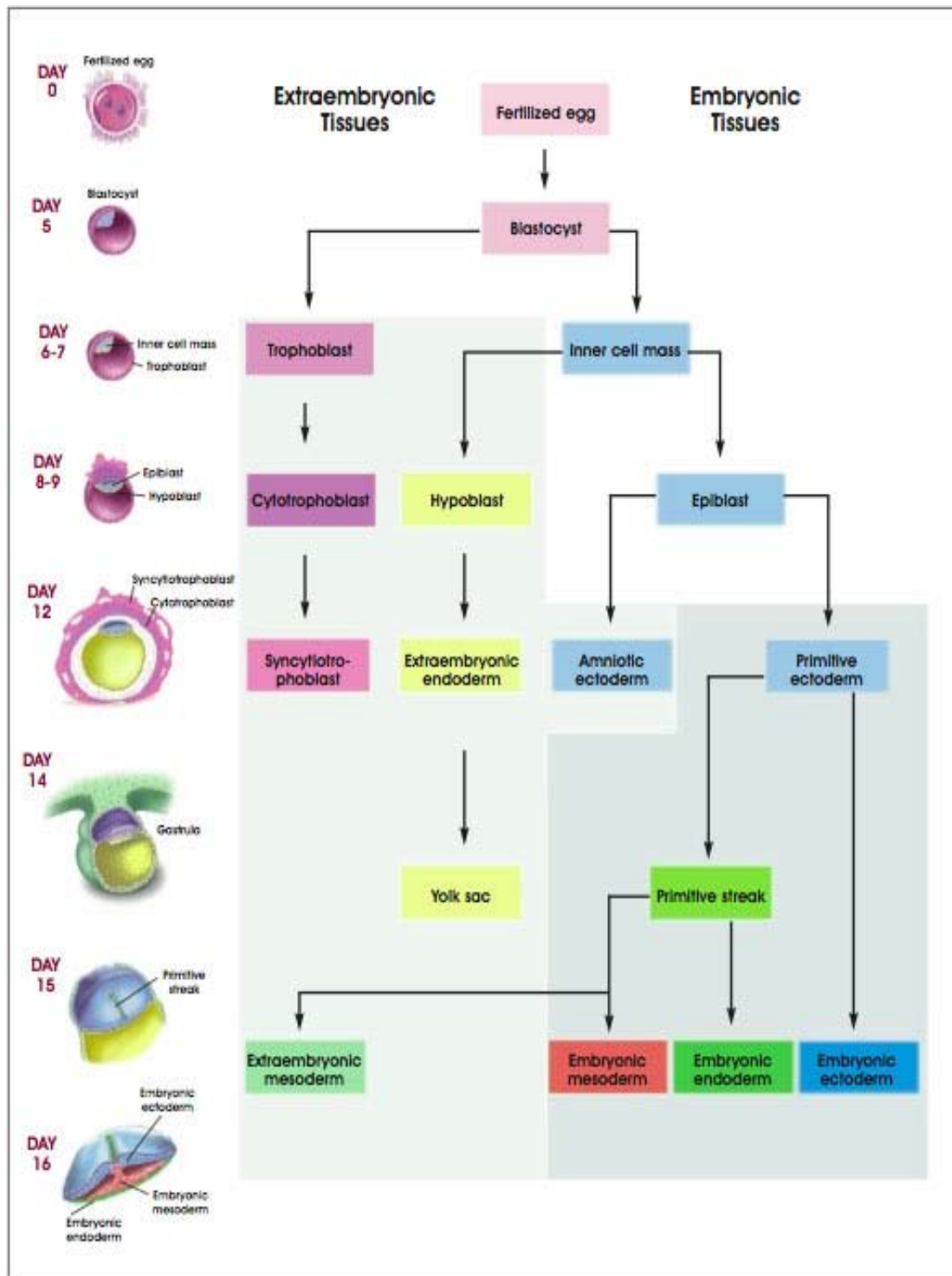
Ο πλακούντας, οι αμνιακές μεμβράνες και ο φθαρτός διαθέτουν διαφορετικούς υποτύπους κυττάρων με διαφορετικές λειτουργίες. Όλοι αυτοί οι κυτταρικοί τύποι διαφοροποιούνται από τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης (3).



Εικόνα 1: Δημιουργία πλακούντα και εμβρύου από το τροφοεκτόδερμα και την έσω κυτταρική μάζα (Roger Diaz, Et al 2004).

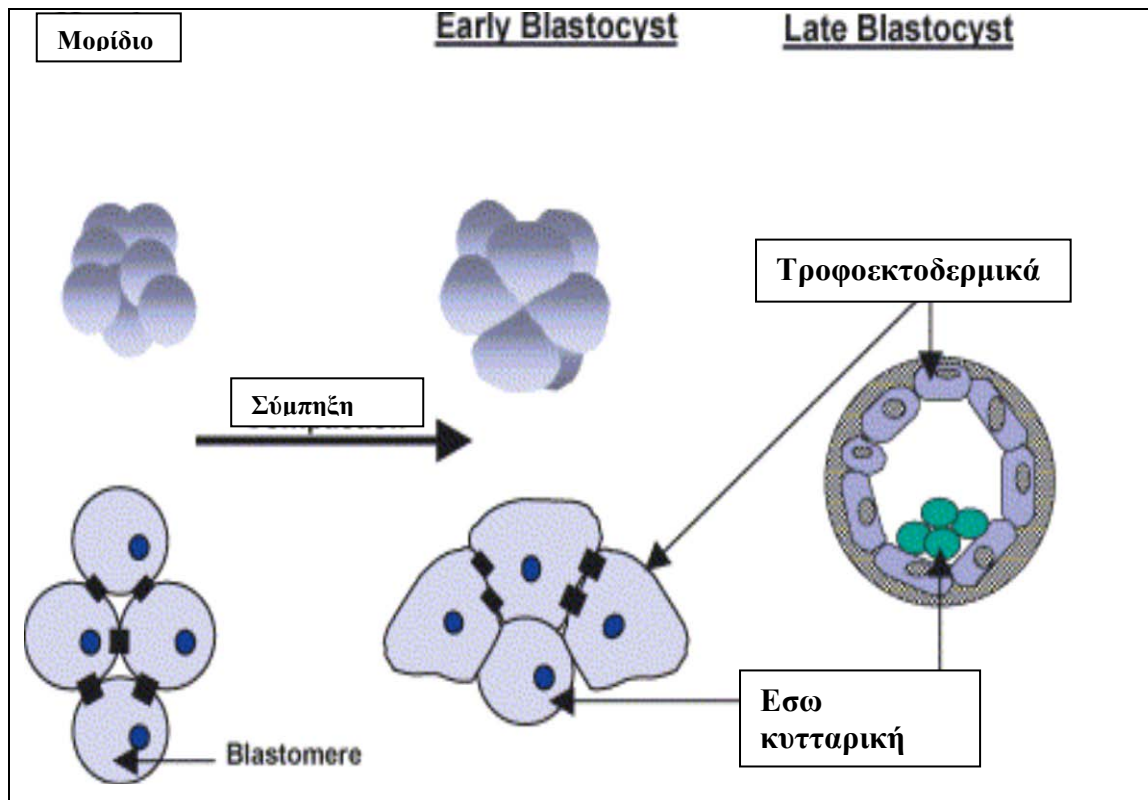
Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, οι μιτωτικές διαιρέσεις των βλαστομεριδίων δίνουν το μορίδιο αποτελούμενο περίπου από 16-32 κύτταρα και στη συνέχεια τη βλαστοκύστη (32-64 βλαστομερίδια). Μέχρι το στάδιο των τεσσάρων –οκτώ κυττάρων τα βλαστομερίδια είναι διαχωρισμένα, μπορούν εύκολα να μετρηθούν και το έμβρυο δεν παρουσιάζει πολικότητα (Εικόνα 3). Μετά το στάδιο των οκτώ κυττάρων, κάθε βλαστομερίδιο αλληλοεπιδρά με τα γειτονικά και αυτή η αλληλεπίδραση είναι γνωστή ως σύμπληξη. Αυτή η διαδικασία, μέχρι ενός συγκεκριμένου βαθμού, μπορεί να πραγματοποιηθεί *in vitro*. Ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα καλλιεργούμενα σε αιώρηση σχηματίζουν το εμβρυϊκό σώμα το οποίο διαφοροποιείται σε τροφοβλαστικά κύτταρα (4). Τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά επιθηλιακών κυττάρων, γίνονται επιμήκη και συγκατοούνται ενωμένα με σύμπλοκα χασματοσυνδέσμων. Όταν το έμβρυο φθάνει στο στάδιο περίπου των 32 κυττάρων το τροφοεκτοδερμικό στρώμα πιθανώς αντλεί νερό στον εξωκυττάριο χώρο και σχηματίζει το βλαστόκοιλο και η έσω κυτταρική μάζα διαχωρίζεται από το τροφοεκτόδερμα (5) (Εικόνα 2). Είναι το στάδιο αυτό στο οποίο το έμβρυο, που άρχισε να διαιρείται στις σάλπιγγες, φθάνει στη μήτρα περίπου τρεις-τέσσερις ημέρες μετά την ωορρηξία.

Η ανάπτυξη του πλακούντα αρχίζει αμέσως μόλις η βλαστοκύστη εμφυτεύεται στο μητρικό ενδομήτριο. Σ' αυτό το στάδιο, η βλαστοκύστη γίνεται επίπεδη κύστη στην οποία τα περισσότερα κύτταρα σχηματίζουν το εξωτερικό τοίχωμα (τροφοβλάστη) που περιβάλλει την κοιλότητα της βλαστοκύστης. Μια μικρή ομάδα μεγαλύτερων κυττάρων, η έσω κυτταρική μάζα, είναι εναποθετημένη στην έσω επιφάνεια της τροφοβλαστικής κοιλότητας, από την οποία προκύπτουν το έμβρυο, ο ομφάλιος λώρος και το αμνιακό επιθήλιο. Από τη τροφοβλάστη πιθανών προκύπτει το χόριο. (6).

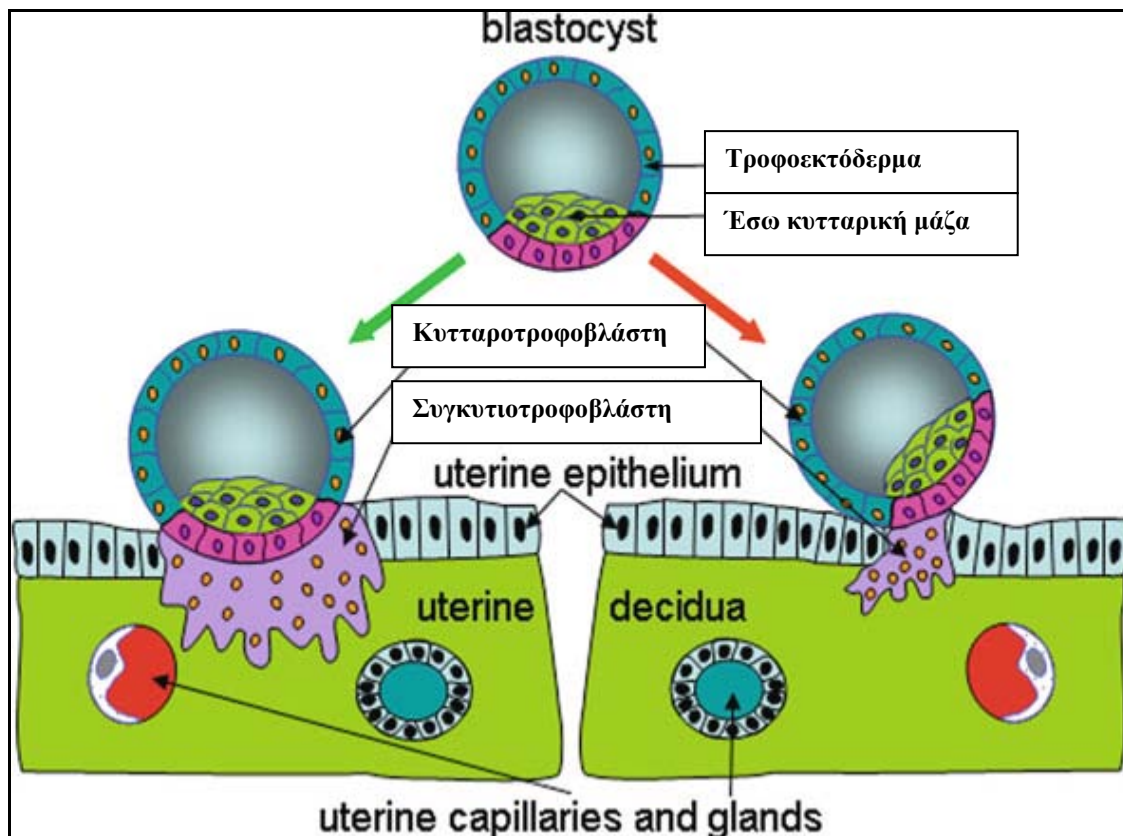


Εικόνα.2: Η βλαστοκύστη διαχωρίζεται σε τροφοβλάστη και έσω κυτταρική μάζα.

Καθώς η βλαστοκύστη προσκολλάται στο ενδομήτριο, η διεισδυόμενη τροφοβλάστη διαβρώνει το φθαρτό διευκολύνοντας την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Όταν η βλαστοκύστη έχει εμφυτευτεί στη μήτρα τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα αναφέρονται ως κυτταροτροφοβλαστικά (Εικόνα 4).



Εικόνα 3: Η διαδικασία συμπίεσης κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Paul Bischof 2005).



Εικόνα 4: Διεισδυόμενη τροφοβλάστη διαβρώνει το φθαρτό

Την 8^η-9^η μέρα μετά την γονιμοποίηση, τροφοβλαστικά κύτταρα στον πόλο εμφύτευσης της βλαστοκύστης πολλαπλασιάζονται έντονα, σχηματίζοντας μια διστρωματική τροφοβλάστη, αποτελούμενη από ένα πολυπύρηνιο εξωτερικό στρώμα συγκυτιοτροφοβλάστης, από την ένωση των γειτονικών τροφοβλαστικών κυττάρων και ένα εσωτερικό μονοπύρηνιο στρώμα κυτταροτροφοβλάστης. Από τον πολλαπλασιασμό της κυτταροτροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης προκύπτει ένα σύστημα δομών από τις οποίες θα προκύψουν οι πρωτοταγείς λάχνες που είναι διανεμημένες σε ολόκληρη την επιφάνεια της χοριακής μεμβράνης (7), (6).

Μετά την 8^η ημέρα, μικρά ενδοσυγκυτιάκα κενοτόπια εμφανίζονται στη συγκυτιοτροφοβλαστική μάζα στον πόλο εμφύτευσης. Αυτά τα κυτταρικά κενοτόπια αναπτύσσονται ταχύτατα και γίνονται συρρέοντα, σχηματίζοντας ένα σύστημα αιματικών κενών, διαχωρισμένα από δοκίδες συγκυτιοτροφοβλάστης. Πρωτογενείς λάχνες μπορούν να παρατηρηθούν μετά την διεΐσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στις δοκίδες, ενώ τα κενά σχηματίζουν τους διαλαχνικούς χώρους όπου ρέει το μητρικό αίμα (6). Η μοναδική αρχιτεκτονική του ανθρώπινου πλακούντα εγκαθίσταται ως

αποτέλεσμα της διαφοροποίησης της λαχνικής κυτταροτροφοβλάστης (vCTB). Εν συνεχεία, η τύχη της vCTB καθορίζει εάν οι χοριακές λάχνες, οι λειτουργικές μονάδες του πλακούντα, θα πλέουν μέσα στο μητρικό αίμα, ή θα προσαρτούν το κύημα στο μητρικό τοίχωμα (8).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορετικοί τύποι λαχνών με διαφορετικές λειτουργικές εξειδικεύσεις, όλες οι λάχνες παρουσιάζουν την ίδια βασική δομή, αποτελούμενες ένα εσωτερικό στρωματικό πυρήνα που περιλαμβάνει εμβρυϊκά αγγεία και συνδετικό ιστό, στον οποίο είναι διασκορπισμένα μεσεγγυματικά κύτταρα, ινοβλάστες, μυο-ινοβλάστες και εμβρυϊκού ιστού μακροφάγα (κύτταρα Hofbauer) (8). Μια βασική μεμβράνη διαχωρίζει τον στρωματικό πυρήνα από το αδιάλειπτο πολυπύρηνο εξωτερικό στρώμα της συγκυτιοτροφοβλάστης, με ελεύθερα η συσσωματωμένα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα ανάμεσα στη συγκυτιοτροφοβλάστη και τη βασική μεμβράνη. Οι διακλαδώσεις των λαχνικών δέντρων διαφέρουν σε διάμετρο, αγγειακή δομή, στρωματική σύσταση, μέσα στο ίδιο το λαχνικό δέντρο και μπορούν να διαχωριστούν σε βλαστικές λάχνες, οι οποίες μηχανικά στηρίζουν τη δομή του λαχνικού δέντρου, ενδιάμεσες ανώριμες λάχνες, οι οποίες δρουν ως ζώνες ανάπτυξης και παράγουν καινούργιους βλαστούς και ώριμες ενδιάμεσες και τελικές λάχνες οι οποίες αποτελούν την κύρια περιοχή ανταλλαγής στον πλακούντα τρίτου τριμήνου (6), (9).

Στη πρώιμη εγκυμοσύνη, ολόκληρη η χοριακή μεμβράνη καλύπτεται από λάχνες, οι οποίες έχουν σχεδόν ομοιόμορφο μέγεθος, αλλά σύντομα ξεκινούν να αναπτύσσονται ανόμοια. Στον μη εμφυτεύσιμο πόλο, με αποδόμηση λαχνών και με ινοβλαστοειδή εναπόθεση στο διαλαχνικό χώρο θα προκύψει ένα λείο χόριο, ενώ στο πόλο εμφύτευσης, ο πολλαπλασιασμός λαχνών σχηματίζει ένα φυλλώδες χόριο (6).

Η ανθρώπινη βλαστοκύστη με την παράθεση και τη προσκόλληση στο επιθήλιο της μήτρας εισχωρεί ταχύτατα στο ενδομητρικό στρώμα, όπου ο σχηματίζει πολυπύρηνο συγκύτιο και η πολλαπλασιαζόμενη κυτταροτροφοβλάστη προωθεί εμβρυϊκό ανασχηματισμό της επιφάνειας του ενδομητρίου ώστε να περικυκλωθεί από μητρικό ιστό (10). Καθώς ο πλακούντας συνεχίζει να αναπτύσσεται η κυτταροτροφοβλάστη είναι η κύρια πολλαπλασιαζόμενη τροφοβλάστη από την οποία θα προκύψουν οι κυτταροτροφοβλαστικές στήλες. Η κυτταροτροφοβλάστη συγχωνεύεται για να σχηματίσει την συγκυτιοτροφοβλάστη που καλύπτει τις προεκβολές τύπου-διακλαδώσεις, λάχνες, που ξεπροβάλλουν από τις κυτταρικές στήλες. Επίσης από τη κυτταροτροφοβλάστη στον ανθρώπινο πλακούντα προκύπτει η

εξωλαχνική κυτταροτροφοβλάστη οι οποία αφήνει τις κυτταρικές στήλες και μεταναστεύει στο μητρικό φθαρτό (11).

Κατά τα αρχικά στάδια της πλακουντιακής ανάπτυξης, παρουσιάζεται μια βαθιά μέσα σε διάκενο εμφύτευση και η ανάπτυξη ενός αιμοχοριακού πλακούντα όπου η τροφοβλάστη βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα (12),(11). Ένας λαχνικός πλακούντας σχηματίζεται, στον οποίο η τροφοβλάστη αναπτύσσει λάχνες που εξαπλώνονται και καταλήγουν σε διακλαδώσεις με λιγοστές αλληλοσυνδέσεις (13) . Μέσα σ' αυτές τις λάχνες, η εμβρυϊκή αγγείωση αναπτύσσεται, και καθώς οι λάχνες έχουν μια τροφοβλαστική επιφάνεια και παρουσιάζουν εκτεταμένες διακλαδώσεις, δημιουργείται μια μεγάλη επιφάνεια για την ανταλλαγή αερίων και θρεπτικών συστατικών μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας (11). Η vCTB σχηματίζει ένα πολικό επιθήλιο που είναι προσκολλημένο στη βασική μεμβράνη και περιβάλλει το στρωματικό μεσεγγυματικό πυρήνα των χοριακών λαχνών. Σε μία οδό, vCTB αποκολλάται από τη βασική μεμβράνη και συγχωνεύεται για να σχηματίσει τη πολυπύρηνη συγκυτιοτροφοβλάστη (STBs), οι οποία μεταφέρει θρεπτικά από το μητρικό αίμα που εγχύεται στο διαλαχνικό χώρο με τον οποίο είναι σε άμεση επαφή (14). Στην οδό που οδηγεί στην εμφύτευση, vCTB επίσης εγκαταλείπει τη βασική μεμβράνη, αλλά σχηματίζει στήλες μη πολωμένων κυττάρων τα οποία προσκολλώνται και στη συνέχεια διεισδύουν στο μητρικό τοίχωμα. Τα άκρα των στηλών καταλήγουν μέσα στο επιφανειακό ενδομήτριο, όπου και προκύπτει η διεισδυτική εξωλαχνική τροφοβλάστη (8) (15).

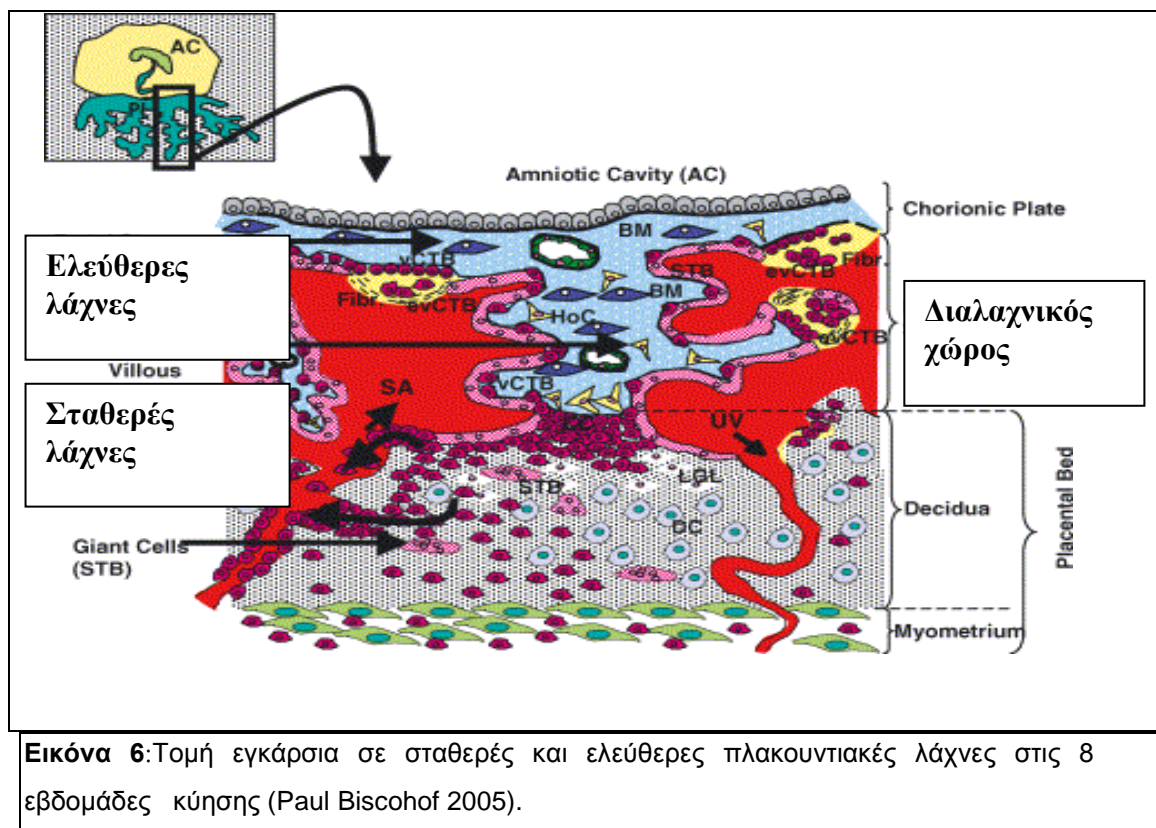
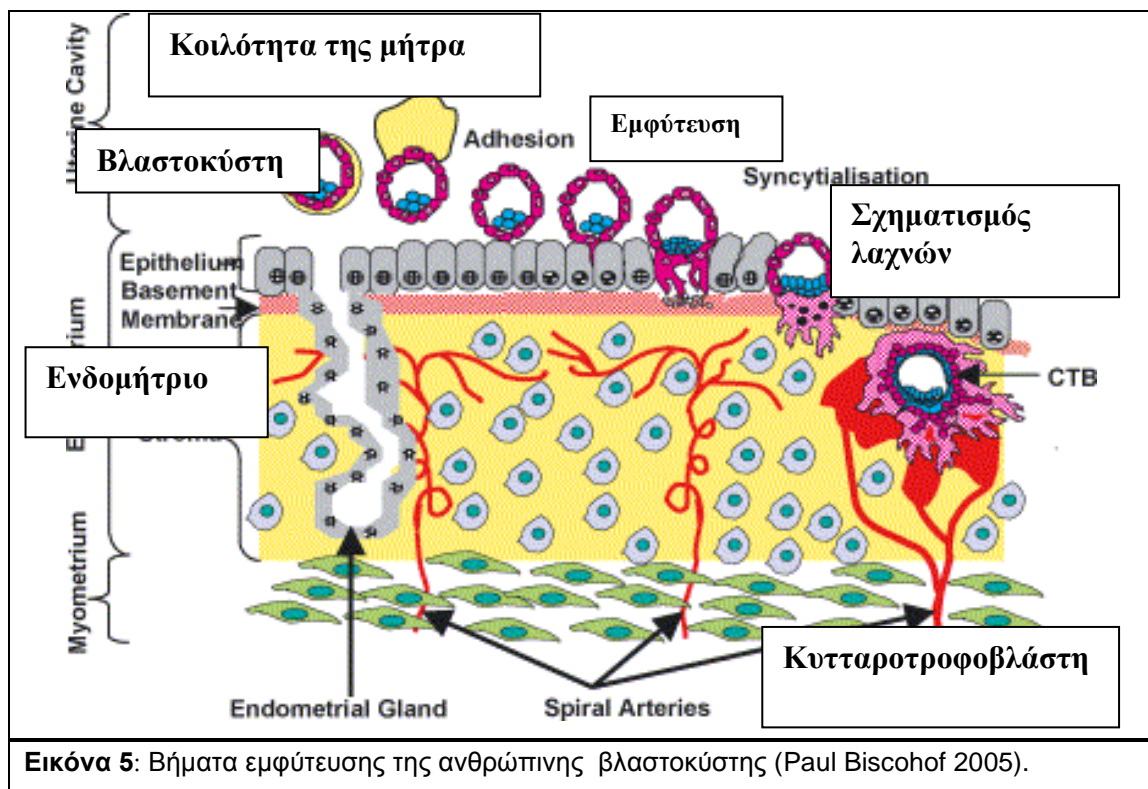
Περίπου 14 ημέρες μετά την εμφύτευση, κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα περνούν δια μέσου του στρώματος της κυτταροτροφοβλάστης σχηματίζοντας τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα, τα οποία αρχίζουν να εισβάλουν στο στρώμα της μήτρας ως στήλες τροφοβλαστικών κυττάρων (16). Στον άνθρωπο, η εξωλαχνική τροφοβλάστη που εντοπίζεται στις τροφοβλαστικές κυτταρικές στήλες και υποβάλλονται σε επιθηλιακή- μεσεγγυματική μετάπτωση, ενώ μεταναστεύουν, εισχωρούν και αναδομούν τις μητρικές σπειροειδής αρτηρίες. Ειδικότερα, η διάμεσος εξωλαχνική τροφοβλάστη θα μεταναστεύσει στο στρώμα του μητρικού φθαρτού σε στενή επαφή με τα ανοσοκύτταρα που βοηθούν στη φλεβική αναδόμηση (11). Από την κορυφή των στηλών, ένας υποπληθυσμός από αυτά τα κινούμενα και διεισδυτικά κύτταρα κινούνται πλευρικά, να σχηματίσουν το τροφοβλαστικό κέλυφος, και κινούμενα κατά μήκος διεισδύουν βαθύτερα στο φθαρτό και στο μυομήτριο, και προκαλούν βαθιές ανταλλαγές με τις μητρικές φλέβες (17).

Κοιτάζοντας σε τομή τη θέση εμφύτευσης του εμβρύου στις 10-12 εβδομάδες κύησης αναγνωρίζονται τα διαλαχνικά τμήματα, που περιέχουν μητρικό αίμα και περιβάλλουν δυο τύπους πλακουντιακών λαχνών (Εικόνα 4 & 5), τις ελεύθερες λάχνες και τις σταθερές προσαρτημένες λάχνες.

Ο σχηματισμός των ελεύθερων και προσαρτημένων λαχνών αρχίζει αμέσως μετά την εμφύτευση. Κατά την ανάπτυξη των λαχνών αναγνωρίζονται τρεις φάσεις, πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς λάχνες, εκ των οποίων οι τελευταίες χαρακτηρίζονται από εκ νέου σχηματισμό τριχοειδών από τους μεσεγγυματικούς προδρόμους και είναι ειδικευμένα στις έμβρυο-μητρικές ανταλλαγές. Το λαχνικό δένδρο εξαπλώνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τα μεσεγγυματικά κύτταρα των λαχνών και του χορίου συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται έως το τέλος της κύησης (18).

Η διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη και εξωλαχνική τροφοβλάστη καθορίζεται από διαφορετικούς παράγοντες, όπως μεταγραφικοί παράγοντες, γονίδια, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και τα επίπεδα οξυγόνου (19), (20).

Η διείσδυση της εξωλαχνικής τροφοβλάστης στο ενδομήτριο είναι βασικό μέρος της εμφύτευσης του εμβρύου. Η διείσδυση της τροφοβλάστης είναι ακριβώς καθορισμένη σε συγκεκριμένες περιοχές της μήτρας και χρονικά περιορισμένη στην αρχή της εγκυμοσύνης.



Τη 8^η-9^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση, μορφολογικές αλλαγές συμβαίνουν στην έσω κυτταρική μάζα, η οποία διαφοροποιείται σε δυο στρώματα, τον επιβλαστό και τον υποβλαστό, που μαζί σχηματίζουν το διστρωματικό εμβρυϊκό δίσκο. Από τον επιβλαστό, κάποια μικρά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια θα αποτελέσουν το αμνιακό επιθήλιο, εμφανίζονται μεταξύ της τροφοβλάστης και του εμβρυϊκού δίσκου και περικλείουν το χώρο ο οποίος θα αποτελέσει την αμνιακή κοιλότητα. Τα τρία γενετικά στρώματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εκτόδερμα) του εμβρύου θα προκύψουν από τον επιβλαστό(6). Όλα αυτά τα γεγονότα συμβαίνουν πριν τη γαστριδίωση (3^η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση), τη διαδικασία κατά την οποία ο διστρωματικός δίσκος διαφοροποιείται στα τρία γεννητικά στρώματα και μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι οι ίδιοι οι πλακουντιακοί ιστοί μπορεί να φιλοξενούν κύτταρα που επιδεικνύουν τη δυναμική να διαφοροποιηθούν προς διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

Ο ανθρώπινος πλακούντας, συντελεί στην ανάπτυξη, θρέψη και ανοχή του εμβρύου, αποτελεί πηγή αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (6) και μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύει μια πηγή πρόδρομων βλαστικών κυττάρων, περιλαμβανομένων και των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (8). Ο πλακούντας, ένα σύνθετο όργανο, διαθέτει πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους που είναι είτε εκτοδερμικής (πλακουντιάκα-ειδικά τροφοβλαστικά κύτταρα) ή μεσοδερμικής προέλευσης (πυρήνας των λαχνών) (8).

Από το 2002, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία πρόδρομων κυττάρων από διάφορες περιοχές του πλακούντα. Διάφορες τεχνικές έχουν αναφερθεί για την απομόνωση κυττάρων με χαρακτηριστικά πρόδρομων κυττάρων από τον πλακούντα, από τις μεσοδερμικές περιοχές της αμνιακής και χοριακής μεμβράνης και το αμνιακό επιθήλιο. Μελέτες, αναζητώντας το διαφοροποιητικό δυναμικό αυτών των κυττάρων, απέφεραν αποτελέσματα πολλά υποσχόμενα, υποδεικνύοντας την πλαστικότητα και την ικανότητα αυτών των κυττάρων για *in vitro* διαφοροποίηση σε κυτταρικές σειρές και των τριών γενετικών σειρών (7), (6). Γι' αυτούς τους λόγους είναι δυνατόν να απομονωθούν διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων όπως αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα, αμνιακά μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, χοριακά μεσεγχυματικά κύτταρα (7).

Τα κύτταρα από κάθε στρώμα επιδεικνύουν ποικίλη πλαστικότητα. Εξαιτίας της πλαστικότητας τους, ο όρος βλαστικά κύτταρα έχει χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία για να περιγράψει έναν αριθμό κυττάρων απομονωμένα από τον πλακούντα. Η αυτοανανέωση και η ιεραρχία, οι οποίες θεωρούνται σήμα κατατεθέν

των βλαστικών κυττάρων, δεν έχει ξεκάθαρα αποδειχτεί στους διάφορους κυτταρικούς τύπους προερχόμενους από τον πλακούντα και για αυτό ο όρος βλαστικά κύτταρα δεν είναι πάντα κατάλληλος. Υπάρχουν αναφορές που προτείνουν μια εναλλακτική έννοια (ορισμό) για τα βλαστικά κύτταρα στο οποίο η πλαστικότητα είναι βασική για να ορίσεις τα κύτταρα ως βλαστικά κύτταρα και η αυτοανανέωση και η ιεραρχία προαιρετικά (21), (22).

Τα πλακουντιακά βλαστικά κύτταρα είναι εξωεμβρυϊκής προέλευσης και κατατάσσονται στα σωματικά βλαστικά κύτταρα, αντίστοιχα των πολυδύναμων σειρών που απομονώνονται από ιστούς και όργανα του σώματος, ικανά να διαφοροποιηθούν σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους αλλά όχι σε όλους όπως δύνανται να κάνουν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (8).

Πολλές είναι οι αναφορές που κάνουν λόγω ότι ο πλακούντας είναι μια σημαντική πηγή μεσεγχυματικού τύπου βλαστικών/πρόδρομων κυττάρων (7), (23), (24), (25). Ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν απομονωθεί και από πρώτου και από τρίτου τριμήνου χόριο μετά από ενζυματική αποβολή του τροφοβλαστικού στρώματος και ενζυματική διάσπαση του μεσοδερμικού χοριακού ιστού (26), (27). Επίσης απομόνωση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων έχει πραγματοποιηθεί και από χοριακές εμβρυϊκές λάχνες μέσω καλλιιεργειών (28), (27). Τα βλαστοκύτταρα απομονωμένα από πλακούντα πρώτου τριμήνου παρουσιάζουν υψηλότερη πολλαπλασιαστική ικανότητα συγκρινόμενα με εκείνα προερχόμενα από τελειόμηνο πλακούντα (26).

Τα ανθρώπινα χοριακά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν μια απλούστερη κυτταρική δομή είναι προγενέστερα και μεταβολικά αδρανή. Τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών ομοιάζουν με αυτά των πρόδρομων αιμοποιητικών και σε κύτταρα καρκινικού τύπου, γεγονός που υποδηλώνει τη θέση τους σε υψηλότερο επίπεδο της ιεραρχίας των βλαστικών κυττάρων (29).

Κλωνικοί πληθυσμοί πλακουντιακών στρωματικών κυττάρων έχουν χαρακτηριστεί χάρις στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, το επιφανειακό αντιγονικό προφίλ τους, το γονιδιακό προφίλ τους και την ικανότητα διαφοροποίησης. Ειδικότερα τα ελάχιστα κριτήρια για τη ταυτοποίηση ανθρώπινων αμνιακών και χοριακών μεσεγχυματικών κυττάρων περιλαμβάνουν: την επικόλληση σε πλαστική επιφάνεια καλλιέργειας, σχηματισμό αποικιών τύπου ινοβλαστικών μονάδων, ένα ειδικό πρότυπο έκφρασης αντιγόνων επιφανείας σύμφωνα με την οποία μεσεγχυματικοί δείκτες (*CD90*, *CD73*, *CD105*) εκφράζονται σε υψηλό ποσοστό, ενώ

αιμοποιητικοί δείκτες (*CD45*, *CD34*, *CD14*, *HLA-DR*) δεν εκφράζονται (<2%), εμβρυϊκή προέλευση των κυττάρων και διαφοροποίηση σε μία ή περισσότερες μεσεγχυματικές σειρές (οστεογενή, λιπογενή, χονδρογενή και αγγειακή/ενδοθηλιακή) (7),(6).

Για την υποστήριξη της υπόθεσης ότι τα αμνιο-χοριακά μεσεγχυματικά κύτταρα παρουσιάζουν κάποιου βαθμού πολυδυναμικότητας, η γονιδιακή έκφραση του *Oct4*, *Sox2*, *Rex1* και *Nanog*, δεικτών πολυδυναμικότητας συνδεδεμένων των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, έχει αναφερθεί για αυτά τα κύτταρα (30), (31), (32), (24), (25), (8). Σε ότι αφορά τη θετικότητα για τα σταδίου-ειδικά εμβρυϊκά αντιγόνα *SSEA3* ή *SSEA4* στα αμνιο-χοριακά μεσεγχυματικά κύτταρα είναι αμφιλεγόμενη (7),(33). Σε αντίθεση με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, αυτά τα κύτταρα δεν διαφοροποιούνται σε τροφοβλαστικά κύτταρα (34), (35), (8).

Κατά την 6^η έως την 8^η εβδομάδα κύησης, δείγματα από τον πλακούντα και το χόριο, κυρίως λαχνική κυτταροτροφοβλάστη, αντιδρούν ισχυρά με το *Oct4* αντίσωμα φθάνοντας στις εννέα εβδομάδες ο αριθμός των *Oct4*-θετικών κυττάρων σταδιακά μειώνεται. Στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης η έκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα περιορίζεται στα κύτταρα του λαχνικού πυρήνα και το χοριακό μεσέγχυμα. Οι άλλοι δείκτες πολυδυναμικότητας όπως το *Nanog* και *SSEA4*, ανιχνεύτηκαν μόνο σε πρώιμο πρώτου τριμήνου δείγματα πλακούντα. Στους ιστούς δευτέρου τριμήνου, *SSEA4*-θετικά κύτταρα που συνεκφράζουν *Oct4* βρίσκονται στο λαχνικό πυρήνα και στο χοριακό μεσέγχυμα (8).

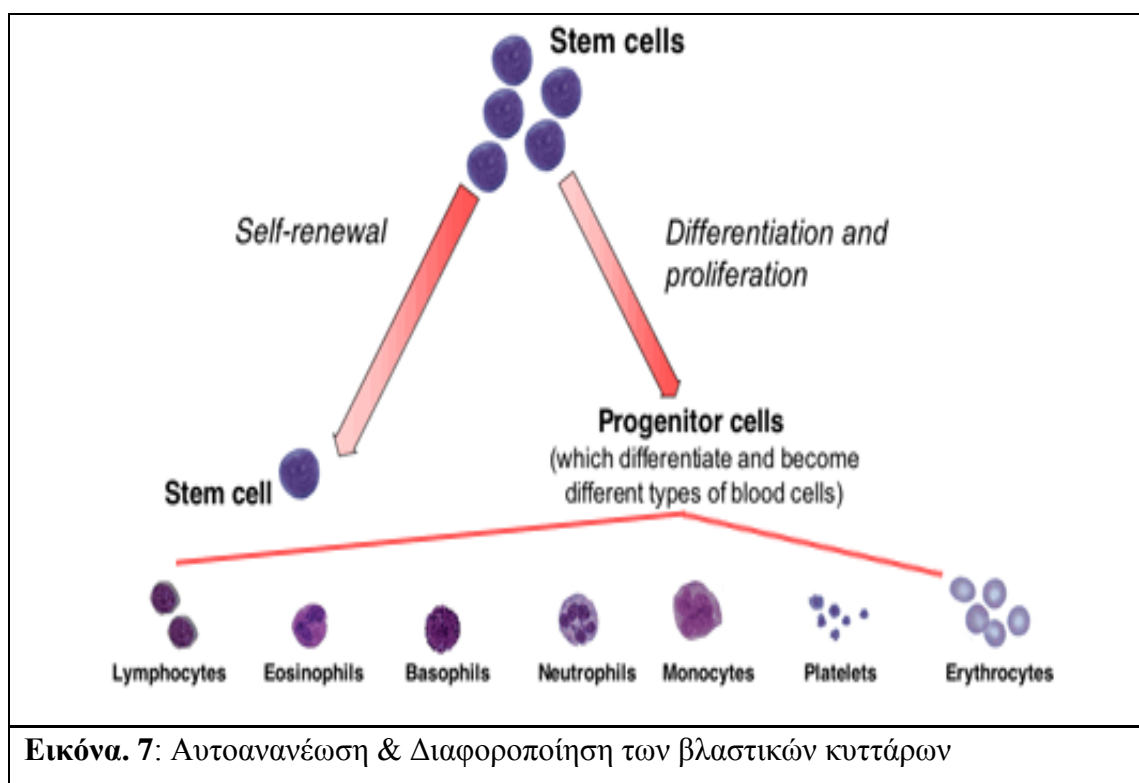
Οι πιθανότητες για το μέλλον των πλακουντιακών προερχόμενων κυττάρων σε κλινικές εφαρμογές, είναι εμφανείς και αυτά τα κύτταρα αποτελούν μια μεγάλη υπόσχεση. Η παρουσία διαφορετικών πηγών βλαστικών κυττάρων στο πλακούντα, από τα αμνιακά εκτοδερμικά προερχόμενα κύτταρα στα μεσεγχυματικά και αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, καθώς επίσης και η πλαστικότητα αυτών των κυττάρων αλλά και ευοίωνες ανοσολογικές ιδιότητες τους οδηγούν στην υπόθεση ότι τα πλακουντιακά προερχόμενα κύτταρα, ή τουλάχιστον κάποιοι υποπληθυσμοί μπορούν να έχουν εφαρμογή για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών θεραπειών.

1.2 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα-ανειδίκευτα κύτταρα που διαθέτουν συγκεκριμένες ιδιότητες: την ικανότητα να διαφοροποιούνται-εξελίσσονται σε εξειδικευμένα κύτταρα που συνθέτουν τους διαφορετικούς τύπους ιστού στο ανθρώπινο σώμα αλλά την ικανότητα να αυτό-ανανεώνονται. Κατά τη διαίρεση τους, τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα είτε να παραμένουν βλαστικά είτε να διαφοροποιούνται σε κύτταρα με συγκεκριμένη λειτουργία και να ανασυστήσουν τον ξενιστή *in vivo* (36). Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη, τη συντήρηση και αναγέννηση ιστών και οργάνων του σώματος.

Βλαστικά κύτταρα διαχωρίζονται από τους άλλους κυτταρικούς τύπους εξαιτίας των δυο αυτών σημαντικών χαρακτηριστικών τους:

- της ικανότητας τους να αυτοανανεώνονται ως αδιαφοροποίητα ανειδίκευτα κύτταρα μέσω κυτταρικής διαίρεσης, μερικές φορές και μετά από μακρές περιόδους αδράνειας,
- και της ικανότητας τους, κάτω από συγκεκριμένες φυσιολογικές ή πειραματικές συνθήκες, να μπορούν να επαχθούν σε ιστό ή όργανο-ειδικά κύτταρα (Εικόνα. 7). (37).



Στα εργαστήρια οι ερευνητές προσπαθούν να κατανοήσουν τις ιδιότητες αυτών των κυττάρων, να τα κατευθύνουν σε μονοπάτια διαφοροποίησης και να δημιουργήσουν τις συνθήκες κάτω από τις οποίες τα βλαστικά κύτταρα αυτοανανεώνονται για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα. Εάν τα μοναδικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων γίνουν κατανοητά και αξιοποιηθούν, τα βλαστικά κύτταρα θα αποτελέσουν τόσο εργαλεία για την ιατρική έρευνα όσο και θεραπευτικούς παράγοντες (38).

Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διακριθούν σε τρεις συγκεκριμένες μεγάλες κατηγορίες, τα εμβρυϊκά - τα ενήλικα ή σωματικά - τα επαγόμενα πολυδύναμα.

Η πλαστικότητα ή δυναμική αυτών των κυττάρων είναι ιεραρχική που κυμαίνεται από:

α) ολοδύναμα (διαφοροποιούνται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του οργανισμού περιλαμβανομένου και του πλακούντα)

β) πολυδύναμα (*pluripotent*), που διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των τριών εμβρυϊκών στρωμάτων, εκτόδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα, αλλά όχι σε τροφοβλαστικά κύτταρα).

γ) πολυδύναμα (*multipotent*), που διαφοροποιούνται σε κύτταρα πέραν του ενός τύπου, αλλά όχι απαραίτητα σε όλα τα κύτταρα ενός εμβρυϊκού στρώματος)

δ) μονοδύναμα (διαφοροποιούνται σε ένα μόνο κυτταρικό τύπο, π.χ. μυς ή νευρώνας) (36)

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες:

Τα ολοδύναμα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, καθώς και τα πολυδύναμα κύτταρα, και οι δυο αυτοί πληθυσμοί κυττάρων μπορούν να προέρθουν από προεμφυτευμένα έμβρυα μέσω εξωσωματικής γονιμοποίησης (39). Τα μεν πρώτα ολοδύναμα κύτταρα προκύπτουν μέσω της απομάκρυνσης ενός βλαστομεριδίου χρησιμοποιώντας διαδικασίες όμοιες με αυτές της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης (40). Τα δε πολυδύναμα κύτταρα απομονώνονται από την έσω κυτταρική μάζα του εμβρύου μέσω καταστροφής της βλαστοκύστης (41).

Επίσης εμβρυϊκά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από τη δεξαμενή εμβρυϊκών αρχέγονων γαμετικών κυττάρων (εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα και εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα) μετά από καταστροφή πρώιμου εμβρύου (42).

Ωστόσο η καταστροφή, είτε της βλαστοκύστης είτε του εμβρύου σε πρώιμο στάδιο, εγείρει ηθικές ενστάσεις (43) καθώς επίσης και ανησυχίες σε ότι αφορά την

ασφάλεια εξαιτίας της ογκογένεσης που μπορεί να προκύψει από τη χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων(44).

Τα μη εμβρυϊκά σωματικά ή ενήλικα βλαστικά κύτταρα, μπορούν να είναι πολυδύναμα και μονοδύναμα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε διάφορους ειδικούς τύπους κυττάρων, που καθορίζονται από τον τύπο του ιστού στον οποίο βρίσκονται. Ο όρος ενήλικα χρησιμοποιείται για να δείξει ότι αυτά τα βλαστικά κύτταρα έχουν είδη προχωρήσει στο μονοπάτι της διαφοροποίησης σε σχέση με τα εμβρυϊκά. Ενήλικα βλαστικά κύτταρα εντοπίζονται σε ιστούς στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης του ανθρώπινου οργανισμού, στην εμβρυϊκή, παιδική ηλικία καθώς και στους ενήλικες (45), (46), (47).

Τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα (iPCS) έχουν προκύψει την τελευταία δεκαετία και έχουν καταρρίψει τη θεωρία ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων δεν μπορεί να ανατραπεί. Η υπόθεση της κυτταρικής πλαστικότητας θεωρεί πως όπως ένα πολυδύναμο κύτταρο όπως κατευθύνεται και διαφοροποιείται σε σωματικό κύτταρο, μπορεί επίσης να μετατραπεί ξανά σε βλαστικό κύτταρο. Αν και η κατεύθυνση διαφοροποίησης δεν μπορεί να αλλάξει φυσιολογικά *in vivo* κατά την ανάπτυξη, έχουν προκύψει τεχνολογίες που είναι σε θέση να προκαλέσουν τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων των θηλαστικών σε ολοδυναμικά και πολυδύναμα κύτταρα *in vitro* (48).

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιτυχία στην απομόνωση και καλλιέργεια ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων έχει δημιουργήσει νέες ευκαιρίες για την μελέτη της βιολογικής ρύθμισης αυτών των κυττάρων αλλά και για την αξιολόγηση της πιθανής χρήσης αυτών για την κυτταρική θεραπεία (41).

Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι βλαστικών κυττάρων, καθένας από τους οποίους έχει μοναδικές ιδιότητες και πλεονεκτήματα. Συγκρίσεις μεταξύ αυτών των βλαστικών κυττάρων, τα οποία διαφέρουν σε αναγεννητική ικανότητα και πλαστικότητα, παρέχουν πληροφορίες για τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες. Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί για να οριστούν τα βασικά χαρακτηριστικά της βλαστικότητας. Τέτοιες ιδιότητες πρέπει να είναι κοινές στα βλαστικά κύτταρα και αναφέρονται στις παρακάτω λειτουργικές πτυχές:

- Έκφραση δεικτών πολυδυναμικότητας
- Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μεταγραφικών μονοπατιών τα οποία συντηρούν τη βλαστικότητα

- Μια χαρακτηριστική κατάσταση πολλαπλασιασμού
- Πως τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα συμπεριφέρονται *in vitro*
- Και πως συμπεριφέρονται μετά από έγχυση σε *in vivo* συνθήκες (49).

Στις παρακάτω ενότητες αναλύονται οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των διαφόρων κατηγοριών βλαστικών κυττάρων.

1.3 ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) αρχικά απομονώθηκαν από την έσω κυτταρική μάζα βλαστοκύστης ποντικών. Οι επιστήμονες ανακάλυψαν τρόπους για να αντλήσουν ESCs από πρώιμα έμβρυα ποντικών σχεδόν 35 χρόνια πριν, το 1881 (50). Η λεπτομερής μελέτη της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων ποντικού οδήγησε στην ανακάλυψη, το 1998, μιας μεθόδου για την εξαγωγή βλαστικών κυττάρων από τα ανθρώπινα έμβρυα και την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων στο εργαστήριο (41). Αυτά τα κύτταρα έχουν ονομαστεί ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (hESCs). Τα έμβρυα που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτές τις μελέτες είχαν δημιουργηθεί για αναπαραγωγικούς σκοπούς, μέσω διαδικασιών *in vitro* γονιμοποίησης. Όταν δεν ήταν πλέον αναγκαία για αυτό το σκοπό, γινόταν δωρεά για την έρευνα με τη συναίνεση του δότη.

In vivo, αυστηρά καθορισμένα ESCs υφίστανται μόνο σε μια σύντομη περίοδο κατά την ανάπτυξη του προ-εμφυτευμένου εμβρύου, καθώς παράλληλα με τις μιτωτικές διαιρέσεις τα κύτταρα χάνουν την πολυδυναμικότητά τους (49).

Κυτταρικές σειρές εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων προκύπτουν από ενζυματική αποδιάταξη της έσω κυτταρικής μάζας και καλλιέργειας υπό κατάλληλες συνθήκες. Τα προερχόμενα ESCs διαθέτουν την ικανότητα όχι μόνο της απεριόριστης αυτό-ανανέωσης αλλά σταθερά διατηρούν συγκεκριμένες ιδιότητες σύμφυτες στη βλαστικότητα. Τα ESCs διαθέτουν την αξιοσημείωτη ιδιότητα της πολυδυναμικότητας, δημιουργώντας όλα τα κύτταρα του οργανισμού δίνοντας μεγάλη υπόσχεση για αναγεννητική ιατρική (51).

Η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών που επιτρέπουν το πολλαπλασιασμό τους διατηρώντας τη πολλαπλάδυναμική τους κατάσταση είναι απαραίτητη ώστε να μπορούμε να εκμεταλλευτούμε το θεραπευτικό τους δυναμικό. Η κατανόηση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο διατηρείται η δυναμικότητα των hESCs είναι σημαντική για την ανάπτυξη βελτιωμένων μεθόδων καλλιέργειας αυτών των κυττάρων. Από το 2000 και μετά, αξιοσημείωτη πρόοδος έχει γίνει στη κατανόηση του μεταγραφικού μηχανισμού που ελέγχει τη βιολογία των βλαστικών κυττάρων. Εξαιτίας αυτής της πολλαπλά-δυναμικής φύσης τους, τα ESCs είναι πολύτιμο εργαλείο για να κατανοήσουμε την ανθρώπινη εξέλιξη και να προάγουμε το πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής. Ωστόσο, για να αξιοποιήσουμε τη θεραπευτική δράση των

hESCs για βιοϊατρικές εφαρμογές προέχει ο καθορισμός του τρόπου με τον οποίο αυτά τα κύτταρα διατηρούν την πολυδυναμικότητα τους και την αδιαφοροποίητη κατάσταση τους.

Μελέτες σε ποντίκια έχουν ταυτοποιήσει έναν αριθμό γονιδίων που έχουν κριτικό ρόλο στη πρώιμη ανάπτυξη και το σχηματισμό της έσω κυτταρικής μάζας, από την οποία προέρχονται τα ESCs. Κάποια από αυτά τα γονίδια έχει επίσης φανεί ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αυτοανανέωσης και της πολλαπλής-δυναμικότητας των εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων ποντικού. *In vitro*, ο λευχαιμικός ανασταλτικός παράγοντας (*LIF*) υποστηρίζει την αδιαφοροποίητη κατάσταση των εμβρυϊκών κυττάρων ποντικού και η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 4 (*BMP4*) την αυτοανανέωση αυτών (52), (53). Σε ότι αφορά τον άνθρωπο, ο *LIF* δεν είναι επαρκής για τη συντήρηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες προκαλούν γρήγορη διαφοροποίηση (54), (55).

Τα γονίδια και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την αυτοανανέωση και τη τύχη των κυττάρων αποτελούν μια μοριακή σφραγίδα ονομαζόμενη βλαστικότητα. Λειτουργικά, μια εξωτερική σηματοδότηση οδηγεί τελικά σε διαφορετική ρύθμιση των γονιδίων που έχουν σαν αποτέλεσμα την πολυδύναμη κατάσταση (56) (57). Η αυτοανανέωση και η πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων είναι σύνθετες διαδικασίες που απαιτούν το συντονισμό πολλαπλών μονοπατιών που συμμετέχουν στο πολλαπλασιασμό και στη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης (57), (58), (59).

1.3.1 Γονίδια Μάρτυρες Πολυδυναμικότητας

Το πλέον χαρακτηρισμένο γονίδιο μάρτυρας πολυδυναμικότητας είναι το *Oct4*, το οποίο συντελεί στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας *in vivo* και *in vitro* (60). Η απώλεια πολυδυναμικότητας στα ESCs συνήθως συνοδεύεται και από μείωση του *Oct4*. Έμβρυα ποντικών με *Oct4* βλάβη, αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν πέραν του σταδίου της βλαστοκύστης λόγω έλλειψης πολυδύναμης έσω κυτταρικής μάζας (61) καταδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του *Oct4* στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας *in vivo*. Όμως, το *Oct4* δεν αποτελεί το μόνο κύριο γονίδιο που ελέγχει τη πολυδυναμικότητα και επιπλέον παράγοντες είναι απαραίτητοι.

Τη προηγούμενη δεκαετία ανακαλύφθηκε ένα ακόμη κύριο γονίδιο για τη πολυδυναμικότητα, το *Nanog* (62). Συγκεκριμένα, οι μεταγραφικοί παράγοντες *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* έχει αποδειχθεί ότι είναι ρυθμιστές κλειδιά για τη διατήρηση της ταυτότητας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (63), (64), (59).

Κατά την πρώιμη ανάπτυξη των ποντικών, η εξειδίκευση της πολυδύναμης ταυτότητας των κυττάρων απαιτεί το εμβρυϊκό γονιδίωμα να εκφράζει *Oct4* (61) και *Nanog* (65) αλλά όχι *Sox2* (66), πιθανών λόγω της παρουσίας της μακρόβιας μητρικής πρωτεΐνης *Sox2* (66), (53), (67).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες *Oct4* και *Nanog* έχουν επίσης ταυτοποιηθεί ως βασικοί ρυθμιστές της μοίρας των βλαστοκυττάρων και από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Λειτουργικές μελέτες με τη χρήση hESCs έχουν δείξει ότι το *Oct4* και *Nanog*, κατέχουν ρόλους κλειδί στην αυτοανανέωση και πολυδυναμικότητα και ότι μείωση των επιπέδων τους, οδηγεί στην απώλεια έκφρασης των δεικτών των βλαστικών κυττάρων και στη διαφοροποίηση σε τροφοεκτοδερμικές και πρώιμες ενδοδερμικές κυτταρικές σειρές (68), (69), (70).

Μεγάλη προσπάθεια έχει γίνει με στόχο την ταυτοποίηση γονιδίων που συμβάλουν στην βλαστικότητα. Μια βασική ομάδα τεσσάρων, πρώτου επιπέδου, μεταγραφικών παραγόντων έχει οριστεί. Αυτοί οι τέσσερις παράγοντες *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* και *KLF4*, συντονίζουν την έκφραση των παρακάτω ομάδων: δευτέρου επιπέδου, μεταγραφικούς παράγοντες (*DPP3* ή *STELLA*, *REX1* ή *ZFP42* και *GBX2*), κυτταρικούς επιφανειακούς μάρτυρες *SSEA4*, *ABC* transporters (*ABCG2*), και συγκεκριμένα ένζυμα (αλκαλική φωσφατάση και τελομεράση *TETR*) (71).

Μέσω RNA sequencing ενός μοναδικού κυττάρου, ταυτοποιήθηκε μια ομάδα γονιδίων, κοινή στον επιβλαστό του προεμφυτευμένου εμβρύου και σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα υπό συνθήκες καλλιέργειας. Αυτή η ομάδα των πολυδύναμων γονιδίων είναι διαφορετική από την ομάδα γονιδίων της έσω κυτταρικής μάζας του μεταεμφυτευμένου εμβρύου που καθορίζει την εξελικτική πορεία και των *in vitro* ESCs που έχουν επαχθεί σε διαφοροποίηση. Αυτή η κατάσταση ορίζεται ως απώλεια της πολυδυναμικότητας ή επαγωγή διαφοροποίησης (72).

Καθώς η σημασία της ισορροπίας της έκφρασης του πυρήνα των μεταγραφικών παραγόντων έχει αναγνωριστεί, προκύπτει μια διαπίστωση για την οποία πλέον πληθαίνουν οι ενδείξεις. Αυτές οι ρυθμιστικές περιοχές, των εκφραζόμενων γονιδίων από τα ESCs, διαθέτουν κοντινές θέσεις δέσμευσης των τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίες στο σύνολό τους συντονίζουν τη

γονιδιακή έκφραση (53). Όταν η ισορροπία μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων του πυρήνα μεταβάλλεται, τα ESCs αρχίζουν τη διαδικασία διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, στα ESCs, η υπερέκφραση του *Oct4* και/ή η καταστολή του *Nanog* επάγει διαφοροποίηση σε ενδόδερμα και μεσόδερμα με απώλεια της δυνατότητας σχηματισμού εκτοδέρματος. Η υπερέκφραση του *SOX2* επάγει νευροεκτοδερμική διαφοροποίηση.

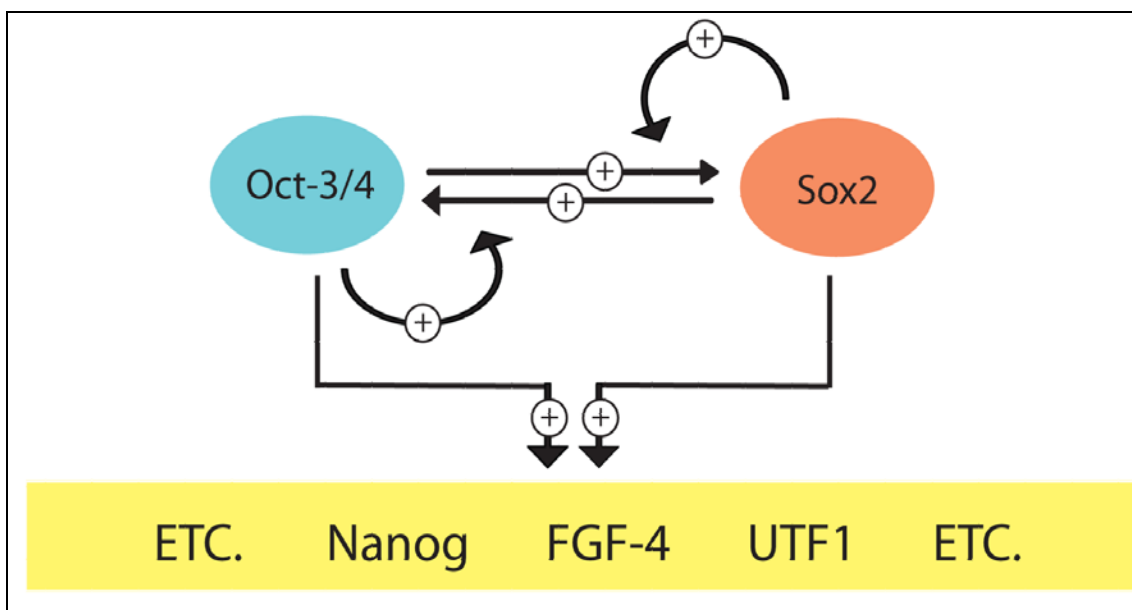
Στα ESCs, λειτουργεί ένα ευφύες δίκτυο στο οποίο κάθε μεταγραφικός παράγοντας του πυρήνα καταστέλλει την ίδια του την έκφραση μέσω αρνητικής ανάδρασης, ενώ την ίδια ώρα ο ίδιος μεταγραφικός παράγοντας επίσης επάγει την έκφραση άλλων μέσω θετικής ανάδρασης, διατηρώντας συνέκφραση-αλληλεπίδραση γονιδίων (49).

Ένα πολύπλοκο αμοιβαίο ρυθμιστικό κύκλωμα το οποίο περιλαμβάνει τους *Oct4*, *Nanog*, και *Sox2* μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμικότητας, πολυκομβικά κατασταλτικά σύμπλοκα και microRNAs (73) ρυθμίζει τη πολυδυναμικότητα και τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Αυτοί οι παράγοντες συνεργάζονται στη μεταγραφική και στην επιγενετική ρύθμιση βασικών γονιδίων των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (74), (75), (76).

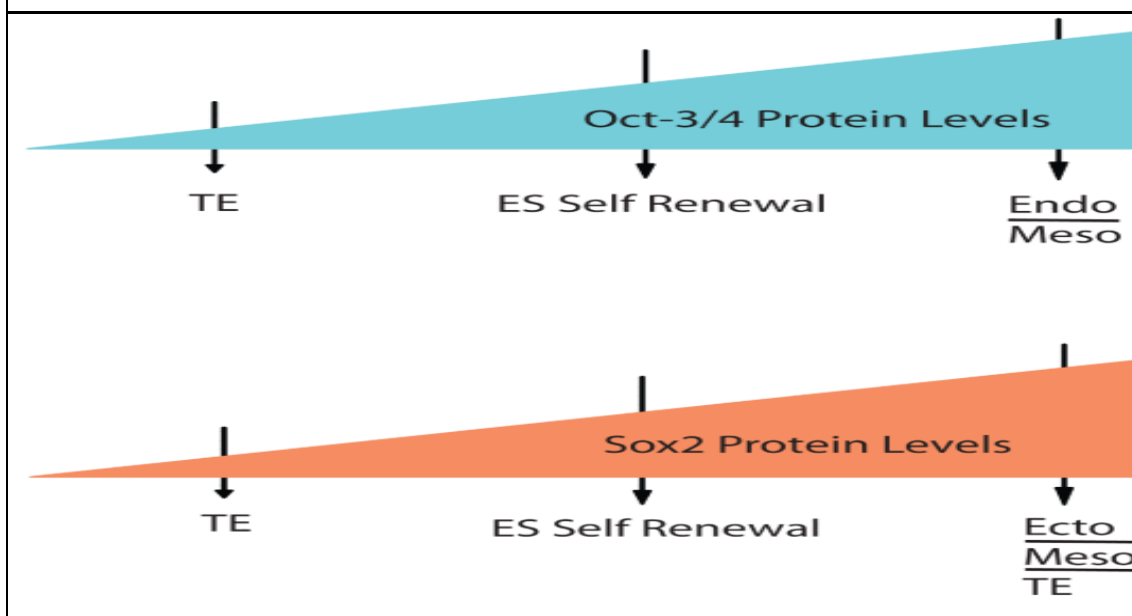
Η μεθυλίωση του DNA είναι μια επιγενετική τροποποίηση συνδεδεμένη με την αδρανοποίηση των γονιδίων, με σημαίνοντα ρόλο στις διαδικασίες της μεταγραφικής καταστολής (77). Η μεθυλίωση του DNA είναι συνδεδεμένη με τη πλειονότητα (87%) των κατεσταλμένων γονιδίων των ESCs όταν αυτά υπόκεινται σε διαδικασίες διαφοροποίησης (78). Μεθυλίωση των *Oct4* και *Nanog* υποκινητών έχει παρατηρηθεί κατά τη διαφοροποίηση των ESCs (79). Σύμφωνα με αυτό, η έκφραση διαφόρων γονιδίων συνδεδεμένων με τη πολυδυναμικότητα, περιλαμβανομένου του *Nanog* και *Zfp42/Rex-1*, χαρακτηρίζονται από απομεθυλωμένους εκκινητές στα ESCs ενώ τα γονίδια είναι αδρανή και μεθυλωμένα σε διαφοροποιημένους ινοβλάστες ποντικών (78). Σίγαση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω DNA μεθυλίωσης είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των ESCs. Η υπερμεθυλίωση των *Oct4*-υποκινητών/ενισχυτών περιοχών στα διαφοροποιημένα κύτταρα συσχετίζεται με τη αδρανοποίηση του γονιδίου ενώ η υπομεθυλίωση στα ESCs επιτρέπει να διατηρούν υψηλά επίπεδα έκφρασης του *Oct4*, το οποίο τα διατηρεί σε πολυδύναμη κατάσταση (80). Στο φαινόμενο του επαναπρογραμματισμού, το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί μετά από συγχώνευση σωματικών κυττάρων με ESCs ή σε καλλιέργειες που

περιέχουν εκχυλίσματα εμβρυϊκών κυττάρων, παρατηρείται DNA απομεθυλίωση του *Oct4* (81),(80).

Oct4, *Nanog*, και *Sox2* συνεργάζονται για να διατηρήσουν την πολυδυναμικότητα και την αυτοανανέωση των hESCs (82), (83), (84).



Εικόνα 8: Sox2 and Oct-3/4 συνεργάζονται για να ρυθμίσουν τη μεταγραφή τους αλλά και τη μεταγραφή μια μεγάλης ομάδας γονιδίων στόχων(Rizzino A 2009).



Εικόνα 9:. Αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα των Sox2 ή Oct-3/4 στα ESC επάγουν τη διαφοροποίησή τους. TE: trophoblast ectoderm, Endo: Endoderm, Meso: Mesoderm, Ecto: Ectoderm. (Rizzino A 2009)

Η μείωση της *Oct4* πρωτεΐνης οδηγεί στην απώλεια διατήρησης της πολυδυναμικότητας όπως συμβαίνει στα διαφοροποιημένα κύτταρα (65), (84). Η υπερέκφραση του *Oct4* επίσης οδηγεί σε διαφοροποίηση, το οποίο καταδεικνύει ότι τα επίπεδα του *Oct4* πρέπει να είναι ακριβή και σταθερά για τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας (83). Η απώλεια του *Oct4* προκαλεί ακατάλληλη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων σε τροφοεκτόδερμα (85), ενώ η υπερέκφραση οδηγεί σε διαφοροποίηση σε πρωτογενές (πρωτοταγές) ενδόδερμα και μεσόδερμα (86). Το *Oct4* μπορεί να λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο, είτε ως καταστολέας είτε ως ενεργοποιητής των γονιδίων στόχων, έχει τη δυνατότητα να ασκεί τη δράση του μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και να δρα εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων δρώντας ως συνκαταστολέας ειδικών μεταγραφικών παραγόντων διαφοροποίησης (87), (88).

Ένα ποιο πρόσφατα χαρακτηρισμένο γονίδιο, το *Nanog*, παίζει σημαντικό ρόλο στο καθορισμό της κυτταρικής τύχης της πολυδύναμης έσω κυτταρικής μάζας κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, διατηρώντας τον πολυδύναμο επιβλαστό και εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση σε πρωτοταγές ενδόδερμα (84), (88).

Το mRNA του *Nanog* που αρχικά ανιχνεύτηκε στα εσωτερικά κύτταρα της συμπαγούς μορούλας κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη των ποντικών, έπειτα περιορίζεται στην έσω κυτταρική μάζα και χάνεται στο τροφοεκτόδερμα στο στάδιο της βλαστοκύστης. Στην όψιμη βλαστοκύστη η έκφραση του *Nanog* περιορίζεται περαιτέρω στον επιβλαστό και αποκλείεται από το πρωτοταγές ενδόδερμα (62). Μετά την εμφύτευση, η έκφραση του *Nanog* μειώνεται, αλλά μπορεί να ανιχνευτεί στα γαμετικά κύτταρα των γεννητικών ακρολοφιών των ποντικών. *In vitro*, *Nanog* mRNA πλεονάζει στις πολυδύναμες κυτταρικές σειρές όπως εμβρυϊκά, γαμετικά και καρκινικά βλαστικά κύτταρα, αλλά όχι στους ενήλικους ιστούς (84). Κατά τη διαφοροποίηση αυτών των πολυδύναμων κυττάρων η έκφραση του *Nanog* μειώνεται. Έμβρυα ποντικού με έλλειψη *Nanog* αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν πέρα του σταδίου της βλαστοκύστης εξαιτίας της απουσίας επιβλαστού (65).

Το *Nanog* δεν αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για τη καθιέρωση της πολυδυναμικότητας στα ESCs, αλλά έχει ρόλο στη διατήρηση της αυτό-ανανεωτικής ικανότητας αυτών των κυττάρων και η έκφραση του μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση (89), (63), (90). Η υπερέκφραση επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων εν απουσία υποστρώματος, παρόλα αυτά η αυτοανανεωτική τους ικανότητα είναι μειωμένη (91) (84),(63), αντίθετα η απώλεια

του *Nanog* οδηγεί στη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων σε ενδοδερμικές κυτταρικές σειρές (92). Η υπερέκφραση του *Nanog*, στα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα επίσης ενισχύει τα χαρακτηριστικά του πρωτοταγούς εκτοδέρματος αυτών των κυττάρων προκαλώντας σημαντική μείωση των γονιδίων *Rex1* και *GBX2* και αυξάνοντας το *FGF5* (93) (88).

Η έκφραση του *Nanog* περιορίζεται στα πολυδύναμα κύτταρα και μειώνεται με τη διαφοροποίηση, αλλά τα δεδομένα για τη ρύθμιση της έκφρασης του *Nanog* είναι λίγα. *Oct-4* και *Sox-2* πράγματι προσδένονται στον υποκινητή του *Nanog* και *in vitro* και *in vivo* όπως φάνηκε μέσω δοκιμών ηλεκτροφορητικής αλλαγής κινητικότητας (94). *Oct4/Sox2* μοτίβο απαιτείται για τη δραστηριότητα του *Nanog* υποκινητή στα πολυδύναμα κύτταρα. Όμως, υψηλά επίπεδα του *Nanog* ευνοούν την αυτοανανέωση, αλλά υπερέκφραση του *Oct4* επάγει διαφοροποίηση (84).

Βασιζόμενοι σε διαφορές στην έκφραση μεταξύ άγριου τύπου και *Nanog* μηδενισμένα κύτταρα, έχει προταθεί ότι το *Nanog* ρυθμίζει τη πολυδυναμικότητα κυρίως ως μεταγραφικός καταστολέας των μεταγενέστερων γονιδίων στόχων (84), (65). Όμως μπορεί να ενεργοποιήσει και γονίδια απαραίτητα για την αυτοανανέωση όπως το *Rex1* (95), (96). Το *Rex1* αποτελεί γονίδιο στόχο του *Oct4/Sox2* σύμπλοκου, καθώς ρυθμίζεται και απευθείας από το *Nanog*, το οποίο ίσως είναι ένδειξη ότι παρεμβάλλεται μεταξύ του *Nanog* και του *Oct4/Sox2* (95). Το *Nanog* μπορεί επίσης να ενεργοποιεί τους *Oct4* υποκινητές (97). Επιπλέον οι υποκινητές του *Nanog* αποτελούν άμεσο στόχο του σύμπλοκου *Oct4/Sox2* (94), (98), (82), (99).

Το *Nanog* επάγει την αυτοανανέωση των ESCs και όμοια με τα *Oct4* μπορεί να λειτουργεί ως ρυθμιστής κλειδί για τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας με τρόπο δοσοεξαρτώμενο. Αποτελεί μέρος ενός δικτύου πρωτεϊνών που λειτουργεί ως κυτταρικό σύστημα αφιερωμένο στη πολυδυναμικότητα (100).

Ο Chamber και οι συνεργάτες του το 2007 πρότειναν ότι το *Nanog* σταθεροποιεί τα ESCs μέσω συγκράτησης ή αντιστροφής εναλλακτικής κατάστασης γονιδίων. Ωστόσο δεν είναι βασικό για τη σωματική πολυδυναμικότητα, δεν εξαφανίζεται στα ενήλικα κύτταρα αλλά παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Αντιθέτως είναι βασικό για την ανάπτυξη της έσω κυτταρικής μάζας και των γαμετικών κυττάρων (63).

Ο *Sox2* μεταγραφικός παράγοντας αποτελεί μέλος της οικογένειας των *SRY*-συνδεόμενων μεταγραφικών παραγόντων (64), (66). Το *Sox2* εκφράζεται στα πολυδυναμικά και στα πολλαπλά δυναμικά κύτταρα εμβρυϊκά και εξωεμβρυϊκά

κύτταρα αλλά παραμένει λιγότερο καλά χαρακτηρισμένο σε σχέση με το *Oct4* και το *Nanog*. Το *Sox2* έχει υψηλό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής τύχης και μαζί με το *Oct4* είναι βασικοί παράγοντες για τη δημιουργία επαγόμενων βλαστικών κυττάρων. Απαλοιφή του *Sox2* στα εμβρυϊκά κύτταρα προκαλεί τροφοεκτοδερμική διαφοροποίηση φαινοτυπικά όμοια με αυτή που ακολουθεί την εξάλειψη του *Oct4* (64), (53), (87). Η έκφραση πολλών γονιδίων στόχων του *Oct4/Sox2* δεν επηρεάζεται σημαντικά από την απώλεια του *Sox2*. Η βασική διαφοροποιός συνεισφορά του *Sox2* φαίνεται να είναι η διατήρηση της έκφρασής του *Oct4*, αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι η ενισχυμένη έκφραση του *Oct4* μπορεί να διασώσει τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα από διαφοροποίηση προκαλούμενη από την απώλεια του *Sox2* (64) (53).

Το *Oct4* και το *Nanog*, έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες της αυτοανανέωσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (96), (97), (100). Είναι σαφές ότι το *Oct4* και το *Nanog* σχηματίζουν αμοιβαία αλληλοεξαρτώμενα μεταγραφικά δίκτυα με το *Sox2*. *Oct4* και *Sox2* δρουν συνεργατικά στη ρύθμιση της μεταγραφής τους (101) καθώς επίσης και την έκφραση άλλων γονιδίων-κλειδιά των βλαστικών κυττάρων περιλαμβανομένου του *Nanog* και του *Zfp42/Rex1* (94) (95).

Το γονίδιο *Rex1* έχει θεωρηθεί ως μάρτυρας των βλαστικών κυττάρων, διότι παρουσιάζεται στους ιστούς του προεμφυτευμένου εμβρύου οι οποίοι περιλαμβάνουν το τροφοεκτόδερμα και την έσω κυτταρική μάζα (102), στο εμβρυϊκό καρκίνωμα και στα ESCs. Το *Rex1* είναι μάρτυρας για ένα υποπληθυσμό αδιαφοροποίητων ESCs. Τα *Rex1* θετικά κύτταρα πρωτίστως διαφοροποιούνται σε πρωτοταγές εκτόδερμα και υποστηρίζουν τη δημιουργία χίμαιρας ενώ τα *Rex1* αρνητικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε σωματικές σειρές και σπάνια σχηματίζουν χίμαιρα (103). Ο Masui το 2008 ανέφερε ότι το *Rex1* δεν είναι απαραίτητο για την πολυδυναμικότητα των ESCs ποντικών, προκύπτει ως σημαντικό γονίδιο στα γαμετικά κύτταρα και στις αδιαφοροποίητες γαμετικές σειρές (στα σπερματοκύτταρα και πρωτοταγή ωοκύτταρα) κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού και ίσως παίζει ρόλο στη μείωση (104).

Όπως προαναφέρθηκε τα επίπεδα του *Oct4* πρέπει να είναι σταθερά (83). Επιπλέον έχει φανεί ότι το *Oct4* καταστέλλει την ίδια του την έκφραση, η οποία δημιουργεί μια αρνητική ανάδραση για την αντιμετώπιση των δράσεων του *Sox2* και του *Nanog* ώστε να εξομαλύνει τις διακυμάνσεις των επιπέδων του *Oct4* στα αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα (97).

Μια λειτουργική συνέπεια των μεταβαλλόμενων επιπέδων του *Oct4* αντανακλάται στην έκφραση του *Nanog*. Το *Oct4* ενεργά ρυθμίζει το *Nanog* με ένα διφασικό τρόπο, χαμηλά επίπεδα του *Oct4* αυξάνουν το *Nanog* ενώ υψηλότερα επίπεδα προκαλούν μείωση της έκφρασης του *Nanog* (105).

Oct4, *Sox2* και *Nanog* μπορεί να αποτελούν τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες στη ρύθμιση της πολυδυναμικότητας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, σχηματίζουν ένα σφιχτό μεταγραφικό ρυθμιστικό κύκλωμα και συνεργατικά ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση (82), (106), (107).

Γονίδια των οποίων οι υποκινητές προσδένονται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες τείνουν να είναι ενεργοποιημένα στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, περιλαμβανομένων και των βλαστικών δεικτών, *Nanog* και *Rex1*. Σε αντίθεση, γονίδια που λαμβάνουν μέρος στη διαφοροποίηση, κατεσταλμένα στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, έχουν υποκινητές που τείνουν να προσδένονται από ένα μόνο παράγοντα (108), (109), (110).

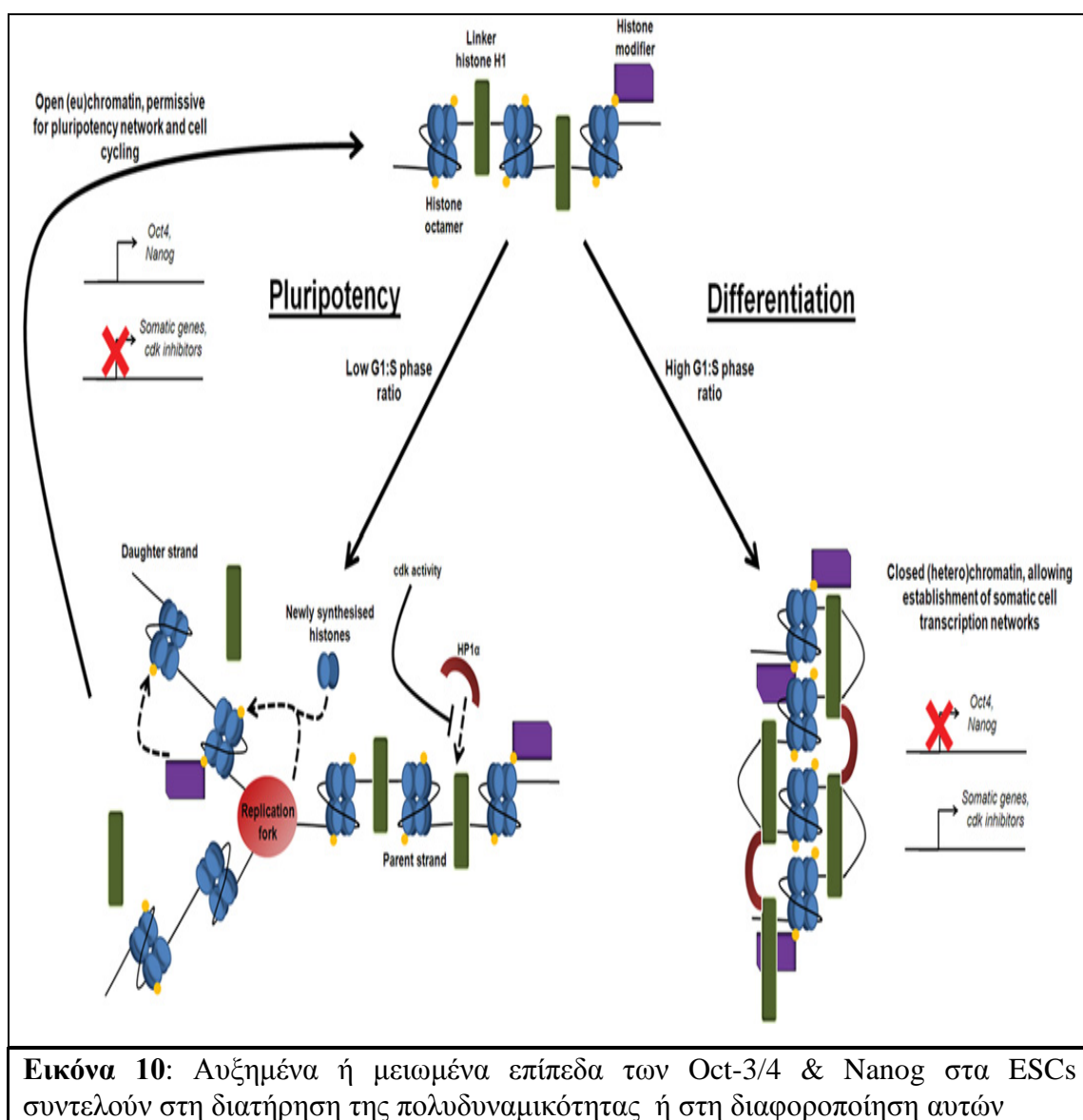
Εν κατακλείδι, *Oct4*, *Nanog* και *Sox2* και μια σειρά συνδεδεμένων μεταγραφικών παραγόντων πρωτεϊνών ενεργούν και διατηρούν την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αυτοανανέωση, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλουν γονίδια που μεσολαβούν στη διαφοροποίηση (108), (109). Οι τρεις αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν ένα αυτό-τροφοδοτούμενο και περίπλοκα συνδεδεμένο δίκτυο το οποίο συντηρεί το χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (74), (111).

Η παρουσία της έκφρασης μόνο του *Oct4* μπορεί να είναι παραπλανητική καθώς αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας απαιτεί κάποιο χρονικό διάστημα για να σταματήσει τη RNA μεταγραφή σε διαφοροποιημένα hESCs και επίσης έχει ανευρεθεί και σε άλλους πολυδύναμους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα καθώς και σε ενήλικα και νεογνικά πολυδύναμα κύτταρα (112).

Τα ESCs διαιρούνται ταχύτατα με μικρό χρόνο ανανέωσης κατά προσέγγιση 8-10 ώρες στα ποντίκια (113) και 8-16 ώρες τα ανθρώπινα ESCs (114). ESCs υφίστανται διαδοχικές συμμετρικές κυτταρικές διαιρέσεις και δημιουργούν θυγατρικά κύτταρα δομικά και λειτουργικά όμοια με τα μητρικά κύτταρα (115). Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των ESCs ελέγχεται από ένα μηχανισμό που διασφαλίζει το ταχύ διπλασιασμό και την ακριβή μεταφορά του γενετικού υλικού στο θυγατρικό κύτταρο. Το *Oct4*, βρέθηκε ότι ρυθμίζει γονίδια συνδεδεμένα με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (116). Αναστολή του *Oct4*, οδηγεί στη μείωση γονιδίων που ενέχονται στο

πολλαπλασιασμό των ESCs και αύξηση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου *p21* και έκφραση του *p63* το οποίο είναι συνδεδεμένο με τη διαφοροποίηση (117), (118).

Οι πολυδύναμοι παράγοντες *Oct4*, *Nanog* και *Sox2*, ελέγχουν την έκφραση βασικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου όπως *Cdk1*, κυκλίνη *D1*, *Cdk6*, *Cdc25a* και *Cdc7* (Εικόνα 10) (119), (120), (121).



Εικόνα 10: Αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα των Oct-3/4 & Nanog στα ESCs συντελούν στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας ή στη διαφοροποίηση αυτών

Ο συνδυασμός τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* τεχνικών έχουν χρησιμοποιηθεί για να αποδείξουν την πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων. *In vitro*, οι σειρές ESCs αναπτύσσονται ως κυκλικές αποικίες πολύ μικρών κυττάρων, εκφράζοντας πολυδύναμους δείκτες (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2* και *Klf4*) και παρουσιάζοντας δραστηριότητα δυο ενζύμων, της τελομεράσης και της αλκαλικής φωσφατάσης. Το μέγεθος και η στρογγυλότητα των αποικιών είναι δυο χαρακτηριστικά καθορισμού της πολυδυναμικότητας. Η επιπεδότητα των αποικιών φαίνεται να αποτελεί το πρώτο στάδιο προς τη δέσμευση και τη διαφοροποίηση (49).

Καθώς τα ESCs πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη μεγαλύτερη πηγή βλαστικών κυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς. Όμως μια χαμηλή ικανότητα διαφοροποίησης θα μείωνε το ποσοστό της επιτυχίας με πιθανότητα αύξησης ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων από τη χρήση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. Κρίσιμο εμπόδιο στη κλινική εφαρμογή αυτών των κυττάρων αποτελεί η δημιουργία τερατωμάτων και η ογκογονικότητα που παρουσιάζουν αυτά τα κύτταρα (122).

1.4 ΕΠΑΓΩΜΕΝΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑ-ΔΥΝΑΜΙΚΑ

ΚΥΤΤΑΡΑ (iPCs)

Η υπόθεση της κυτταρικής πλαστικότητας θεωρεί πως όπως ένα πολυδύναμο κύτταρο κατευθύνεται και διαφοροποιείται σε σωματικό κύτταρο, μπορεί επίσης να μετατραπεί ξανά σε βλαστικό κύτταρο. Αν και η κατεύθυνση διαφοροποίησης δεν μπορεί να αλλάξει φυσιολογικά *in vivo* κατά την ανάπτυξη, έχουν προκύψει τεχνολογίες που είναι σε θέση να προκαλέσουν τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων των θηλαστικών σε ολοδυναμικά και πολυδυναμικά *in vitro* (123).

Οι Takahasi και συν. κατέρριψαν το δόγμα της αναπτυξιακής βιολογίας, ότι τα στα θηλαστικά η διαφοροποίηση των σωματικών κυττάρων είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία (124), (125). Μέσω επιμόλυνσης, σε ανθρώπινα σωματικά κύτταρα, των τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (*Nanog*, *Sox2*, *c-Myc* και *Klf4*), ήταν ικανοί να αναστρέψουν τα διαφοροποιημένα κύτταρα σε μια εμβρυϊκά-όμοια κατάσταση. Αυτά τα νεοδημιουργηθέντα κύτταρα, παρουσιάζουν τη μορφολογία, τη πολυδυναμικότητα και την ικανότητα να σχηματίζουν τερατώματα όπως τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, αυτά τα κύτταρα ονομάστηκαν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) (126), (59). Αυτό, είναι ένα επαναστατικό βήμα και παρέχει στην επιστημονική κοινότητα ένα δεύτερο εργαλείο για τη κυτταρική θεραπεία.

Μεταμόσχευση πυρήνα, συγχώνευση κυττάρων και κυτταρική καλλιέργεια είναι οι στρατηγικές που εφαρμόζονται για την επαγωγή της μετατροπής διαφοροποιημένων κυττάρων σε εμβρυϊκή κατάσταση (124). Ωστόσο, ξεκινώντας από την απλή υπόθεση ότι οι παράγοντες που παίζουν ρόλο κλειδί στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των ESCs μπορούν να δουλέψουν ως παράγοντες επαναπρογραμματισμού, Takahasi και συν., ήταν σε θέση να επαναπρογραμματίσουν σωματικά κύτταρα σε πολυδύναμα ESCs (124). Αρχικά ταυτοποίησαν τα γονίδια που εκφράζονται στα εμβρυϊκά κύτταρα αλλά όχι στα σωματικά και τα διαίρεσαν σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε γονίδια υπεύθυνα για τη πολυδύναμη κατάσταση *Nanog*, *Sox2* και *Oct4*. Η δεύτερη περιλαμβάνει *cMyc*, *Stat3* και *TCf1*, όγκο-συνδεδεμένα γονίδια. Στη τρίτη ομάδα υπήρχαν γονίδια τα οποία είχαν εξειδικευμένους ρόλους στα ESCs όπως *Klf4*, *ECAT1* και *Esg1*. Διαφορετικοί

συνδυασμοί γονιδίων στις τρεις ομάδες εμβολιάστηκαν σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού και προέκυψε το αποτέλεσμα ότι ο συνδυασμός μόνο τεσσάρων παραγόντων *Oct3/4 Sox2 Klf4* και *cMyc* ήταν επαρκής για να επαναπρογραμματίσουν σωματικά κύτταρα σε iPSCs (124). Ενώ *Oct4* και *Sox2* απαιτούνται για τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, ένας συνδυασμός άλλων παραγόντων όπως *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* και *Lin28*, είναι επίσης ικανά να επαναπρογραμματίσουν σωματικά κύτταρα (127), (59).

Πειράματα με συγχωνεύεις εμβρυϊκών κυττάρων ποντικών με σωματικά κύτταρα δείχνανε την υπερίσχυση του φαινοτύπου των εμβρυϊκών κυττάρων έναντι των σωματικών, σημαίνοντας ότι πρωτεΐνες στο πυρήνα των εμβρυϊκών κυττάρων είναι ικανές να επαναπρογραμματίσουν διαφοροποιημένα κύτταρα σε εμβρυϊκά-ομοιάζουσες καταστάσεις (128). Σε συγχώνευση εμβρυϊκών και νευρικών βλαστικών κυττάρων η συχνότητα επαναπρογραμματισμού ήταν σημαντικά ενισχυμένη από μέτρια αυξανόμενα επίπεδα έκφρασης του *Nanog* στα εμβρυϊκά κύτταρα, το οποίο ενισχύει την άποψη ότι το *Nanog* είναι ένας σημαντικός παράγοντας πολυδυναμικότητας (107), (129). Η επαγωγή έκφρασης εμβρυϊκών-συνδεδεμένα γονιδίων και ιδιαίτερα μεταγραφικών παραγόντων, *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*, σε σωματικά κύτταρα θα μπορούσε να προκαλέσει την απόκτηση ενός εμβρυϊκού χαρακτήρα (124). Απροσδόκητα το *Nanog* ήταν περιττό και μπορεί να λειτουργεί ως μεταγραφικός οργανωτής για την ιεραρχία της έκφρασης των πολυδύναμων γονιδίων μετά την εξάλειψη του διαφοροποιημένου επιγονιδιώματος από άλλους παράγοντες (124). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν τα σωματικά κύτταρα σε επαναπρογραμματισμό, πάντα μέσω τροποποιήσεων της χρωματίνης (130).

Η τεχνολογία σχηματισμού επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων (iPSCs) δημιουργεί πολυδύναμα ομοιάζοντα τα εμβρυϊκά κύτταρα με την εισαγωγή περισσότερων από τέσσερις μεταγραφικών παραγόντων, περιλαμβανομένου του *Oct4*, σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Ανάμεσα στους διάφορους συνδυασμούς μεταγραφικών παραγόντων που χρειάζονται για το σχηματισμό iPSCs, *Oct4* είναι ο μοναδικός που απαιτείται πάντα να εισάγεται εξωγενώς. Στη πλειονότητα των iPSCs πρωτοκόλλων δεν απαιτείται εξωγενές *Nanog*, το οποίο ενεργοποιείται από το *Oct4* εισαγόμενους παράγοντες (80). Εξωγενές *Sox2* μπορεί να παραληφθεί αν τα κύτταρα στόχοι, όπως νευρικά, εκφράζουν ήδη τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (131), (132).

Φαινοτυπικά τα iPSCs είναι όμοια με τα ESCs σε πολλές πτυχές, περιλαμβανομένου μορφολογία, επιφανειακούς δείκτες, έκφραση γονιδίων, *in vitro*

διαφοροποίηση και σχηματισμό τερατωμάτων όταν εγχύονται σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (132).

Ενώ η ικανότητα να αναπτύξουμε iPSCs από διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα είναι συναρπαστική, το σύστημα έχει δύο μεγάλα μειονεκτήματα. Αρχικά, η αποτελεσματικότητα επαναπρογραμματισμού είναι πολύ χαμηλή, υποδηλώνοντας την πιθανή ύπαρξη ενός εσωτερικού μηχανισμού που εμποδίζει αυτή τη διαδικασία. Δευτερεύοντος, υπάρχει ένα ογκογενές δυναμικό των iPSCs όπως αντανακλάται από την ικανότητα να δημιουργούν τερατώματα στα ποντίκια. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τη χαμηλή αποτελεσματικότητα των σωματικών κυττάρων (133) και η αποτελεσματικότητα επαναπρογραμματισμού είναι υψηλότερη σε *p53* μηδενικό πεδίο (126), (134), (135) .

Τα iPSCs έχουν παρουσιάσει μεταλλάξεις οι οποίες μπορεί να κληρονομούνται από το σωματικό κύτταρο είτε προκύπτουν εκ νέου, όπως επίσης κάποιες χρωμοσωμικές ανευπλοϊδίες ή μεταβολές σε γονίδια, μεταβολές αριθμού αντιγράφων, περιλαμβανομένου αύξηση αντιγράφων ογκογονιδίων και διαγραφές σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (136). Επίσης στα iPSCs προκύπτουν εκ νέου επιγενετικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επαναπρογραμματισμού οι οποίες είναι χαρακτηριστικές των καρκινικών κυττάρων (137). Εξαιτίας της απενεργοποίησης του ογκοκατασταλτικού *p53* και/ή των κατάντη παραγόντων του μονοπατιού του, το οποίο φαίνεται να είναι κρίσιμο για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων, εγείρονται ανησυχίες για την καρκινογένεση των iPSCs (138). Επιπλέον, έκχυση iPSCs σε βλαστοκύστη οδηγεί σε μια επίπτωση (περίπου 20%) όγκων στα προκύπτοντα χιμαιρικά ποντίκια, που αναλογεί σε απενεργοποίηση του *cMyc* διαγονιδίου (139), (59).

Προβλήματα με την επιγενετική μνήμη φαίνεται να είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό του επαναπρογραμματισμού. Η μειωμένη επιγενετική μνήμη μέσω μείωσης της συνολικής μεθυλίωσης του DNA, εμποδίζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα επαναπρογραμματισμού μετά από μεταφορά πυρήνα (140) (48).

Oct4 είναι περισσότερο από κύριος ρυθμιστής της πολυδυναμικότητας, είναι και κύριος ρυθμιστής όλων σε ταχύ επαναπρογραμματισμό. *Oct4* είναι επαρκές για τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων (124). Το *Oct4*, όμως εκφράζεται και σε κύτταρα δεσμευμένα και των τριών γενετικών σειρών κατά το στάδιο της γαστριδίωσης (141) . Αυτό υποδεικνύει ότι *Oct4*, παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων σε σωματικές σειρές και πράγματι η

υπερέκφραση του οδηγεί σε γρήγορη διαφοροποίηση και απώλεια της πολυδυναμικότητας (83), (48).

Πρόσφατες αναφορές κάνουν λόγο για το αν δύο παράγοντες είναι επαρκείς για να επαναπρογραμματίσουν κύτταρα που ήδη διαθέτουν μεγαλύτερη πλαστικότητα. Πρωτοταγείς άνθρωποι ινοβλάστες μπορούν να επαναπρογραμματιστούν με το συνδυασμό δύο παραγόντων, *Oct4* και *Sox2* και βαλπροϊκού οξέος (αναστολέα της ιστόνης δεακετυλάσης) (142). Αυτή η μελέτη είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη γιατί υποστηρίζει τη δυνατότητα επαναπρογραμματισμού με μόνο χημικά συστατικά ή μικρά μόρια (143).

Όμως τα επαναπρογραμματισμένα γονίδια έχουν συνδεθεί με καρκίνους (144). Η μεγαλύτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει αυτή η τεχνολογία είναι να ξεπεράσει την αναγκαιότητα χρήσης ογκογονιδίων και ιϊκών φορέων ,οι οποίοι μπορεί να γίνουν ογκογενής στη προσπάθεια να επαναπρογραμματίσουν κύτταρα. Το κρίσιμο εμπόδιο στη κλινική εφαρμογή αυτών των κυττάρων είναι το ρίσκο της δημιουργίας τερατωμάτων (122).

1.5 ΟΓΚΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ

ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Δυο μεγάλες κατηγορίες πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων που έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο, τα ESCs και τα iPSCs δεν υπάρχουν φυσιολογικά *in vivo* και αυξανόμενες είναι οι ενδείξεις ότι είναι επιρρεπείς σε γενετική και επιγενετική αστάθεια. Δεν έχει ακόμα γίνει κατανοητό πως προκύπτουν αυτές οι ανωμαλίες και σε ποιο μέτρο παρεμποδίζουν τη κλινική εφαρμογή και την αξιοπιστία αυτών των κυττάρων ως ερευνητικά μοντέλα (145).

Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) και επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) έχουν την ικανότητα να διπλασιάζονται απεριόριστα ενώ διατηρούν τη πολυδυναμικότητα και διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των τριών γενετικών σειρών. Αυτές οι δυο ιδιότητες των ESCs και iPSCs τα καθιστούν δυναμικά κατάλληλα για την αναγέννηση ιστών και για θεραπείες κυτταρικής αποκατάστασης. Παρόλα αυτά, εμπόδιο στη κλινική εφαρμογή αυτών των κυττάρων παραμένει η ογκογονικότητα αυτών των κυττάρων (122).

Η πολυδύναμη κατάσταση των ESCs και iPSCs υποδεικνύονται από διάφορα κυτταρικά χαρακτηριστικά περιλαμβανομένων τα εξής: έκφραση μεταγραφικών παραγόντων (*Oct4*, *Nanog* και *Sox2*) και μορίων κυτταρικής επιφάνειας (*SSEA3*, *SSEA4*, *Tra-1-60* και *Tra-1-81*), υψηλή δραστηριότητα των ενζύμων της αλκαλικής φωσφατάσης και τελομεράσης και τυπική κυτταρική μορφολογία (μικρά κύτταρα με υψηλή αναλογία πυρήνα κυτταροπλάσματος) (125).

Ο χρυσός κανόνας για τη πολυδυναμικότητα μιας κυτταρικής σειράς είναι η ικανότητα να σχηματίζει αυτόματα τερατώματα (όγκο πολλαπλών κυτταρικών σειρών περιλαμβάνοντας ιστούς προερχόμενους και από τα τρία γενετικά στρώματα) (139) όταν εγχύονται σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (146), (122), (147). Τα ανθρώπινα πολυδύναμα κύτταρα είναι ογκογονικά και διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό από τα σωματικά κύτταρα και από άποψη ογκογονικού δυναμικού (148). Υπολείμματα πολυδύναμων κυττάρων σε ανθρώπινα iPSCs-προερχόμενα προϊόντα έχουν την ικανότητα να ξεκινήσουν τη δημιουργία έκτοπου ιστού, ανάπτυξη όγκου ή/και κακοήγη μετατροπή (147).

Όταν για πρώτη φορά απομονώθηκαν ESCs το 1998, ομοιότητες παρατηρήθηκαν μεταξύ αυτών και των εμβρυϊκών καρκινικών κυττάρων (ECSs). Τα ECSs παρουσιάζουν υψηλή επιλογή για μεταλλάξεις που αυξάνουν τις αυτοανανεωτικές ικανότητες και περιορίζουν τη διαφοροποίηση. Όμοιες μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί σε μακρόχρονες καλλιέργειες ECSs (149).

Φαινοτυπικά τα προεμφυτευμένα ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα ομοιάζουν στα καρκινικά κύτταρα από πολλές απόψεις, ειδικά στην ιδιότητα τους να αναπτύσσονται απεριόριστα. Και οι δυο τύποι κυττάρων αποπρογραμματίζονται σε κατάσταση πολλαπλασιασμού και γίνονται αθάνατα αυτοανανεούμενα και εμφυτευτικά. Αυτές οι ομοιότητες δείχνουν ότι κάποια εμβρυϊκά γονίδια μπορεί να επανεκφράζονται ή να επανενεργοποιούνται στα καρκινικά κύτταρα. *Oct4* και τρία άλλα καινοφανή εμβρυϊκά γονίδια εκφράζονται σε ανθρώπινους καρκίνους αλλά όχι σε φυσιολογικούς σωματικούς ιστούς. Πρωτεΐνες ειδικές των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, περιλαμβανομένων του *Oct4*, *Nanog* και *Zfp42/Rex-1* εμπλέκονται και σε κάποιους καρκίνους (150), (151). Η υπερέκφραση του *Sox2* μπορεί να προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου. Θετικός είναι ο ρόλος του *Sox2* στη καρκινογένεση, είτε η υπερέκφραση μπορεί να προκαλέσει πολλαπλασιασμό πρόδρομων πληθυσμών, είτε μετά από συνεργασία με τη ενεργοποιημένη από το μικροπεριβάλλον *Stat3* πρωτεΐνη (152).

Η εξέταση γονιδιακής έκφρασης σε διάφορους ανθρώπινους όγκους έδειξε ότι οι πολυδύναμοι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων είναι άμεσα ογκογονικοί ή ενέχονται σε διαδικασίες καρκινογένεσης. Ογκογονικότητα ορίζεται η ικανότητα ενός κυτταρικού πληθυσμού εμβόλιμου σε ένα πειραματόζωο να δημιουργεί ένα όγκο με πολλαπλασιασμό στο σημείο εμβολής και/ή σε απομακρυσμένο σημείο μετά από μετάσταση (153), (154).

Τα iPSCs συχνά αποκτούν ανευπλοϊδίες, μεγάλες χρωμοσωμικές προσθήκες και απώλειες καθώς και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (155). Τα ανθρώπινα iPSC παρουσιάζουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε όλα τα χρωμοσώματα αλλά η πιο συχνές καρυοτυπικές ανωμαλίες είναι οι προσθήκες στα χρωμοσώματα 12 και 17. Τα iPSCs επίσης αποκτούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες κατά τη διάρκεια παρατεταμένων καλλιεργειών και η προσθήκη στο χρωμόσωμα 12 είναι η επικρατέστερη (156), (157). Το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *Nanog* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12p13, μια περιοχή συχνά διπλασιασμένη σε όγκους γενετικής προέλευσης και σε

καλλιιεργημένα ανθρώπινα ESCs (158) . Ανθρώπινα ESCs με γονιδιωματικές αλλαγές τείνουν να σχηματίζουν ανώριμα τερατώματα (145).

Το *Nanog* και *Oct4* βρέθηκαν να είναι αυξημένα στο τετραπλάσιο σε καρκινώματα *in situ*. Φαίνεται ότι η αποτυχία της μείωσης ή της επανασταθεροποίησης του *Nanog* και άλλων γονιδίων των βλαστικών κυττάρων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ογκογένεση (158). Αναφορές κάνουν λόγο για την έκφραση του *Oct4* σε καρκινώματα *in situ*, εμβρυικά καρκινώματα, ημίνομα και μεταστάσεις με διαφοροποιημένα συστατικά τα οποία υποστηρίζουν την πολυδυναμικότητα αυτών των κυττάρων (158).

Η πιθανή ογκογονικότητα των ESCs αλλά και των iPSCs αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στη χρήση αυτών των κυττάρων σε κυτταρικές θεραπείες και αναγεννητική ιατρική.

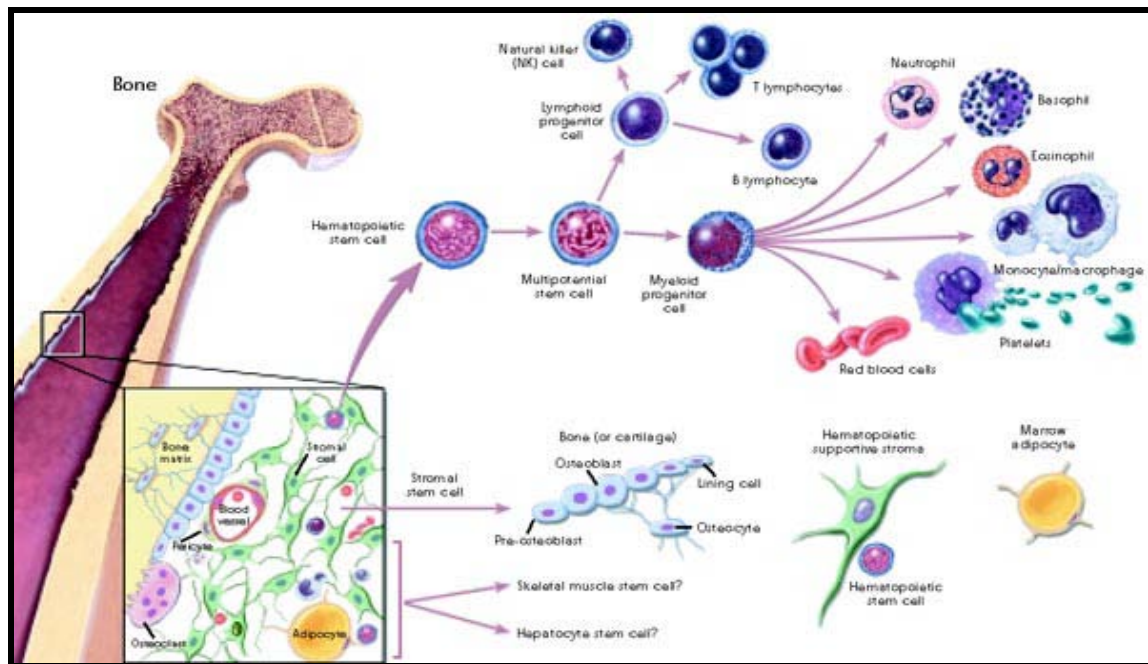
1.6 ΕΝΗΛΙΚΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ

ΚΥΤΤΑΡΑ (MSCs)

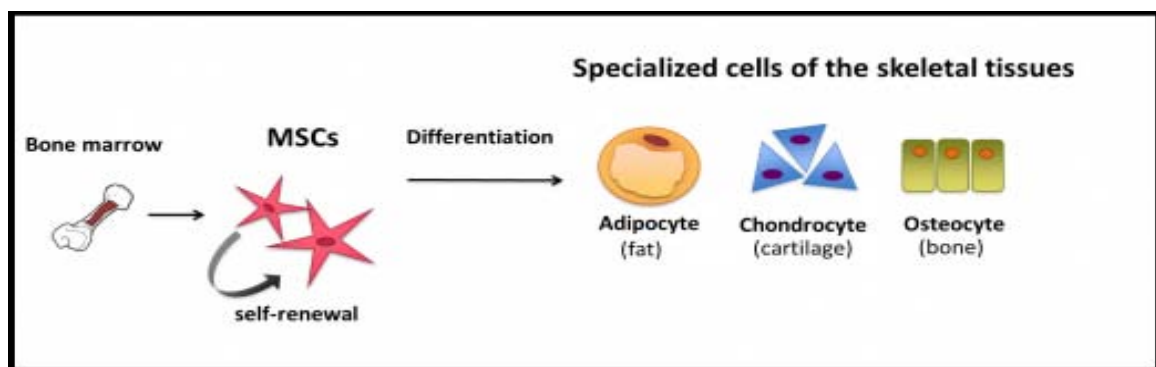
Τα ενήλικα ή σωματικά βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα, που εντοπίζονται ανάμεσα σε διαφοροποιημένα κύτταρα σε ιστούς ή όργανα, διαθέτουν δυνατότητα περιορισμένης αυτοανανέωσης και είναι πολυδυναμικά (διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους αλλά όχι σε όλους). Τα ενήλικα σωματικά κύτταρα αποτελούν μεταγεννητικά παράγωγα των ESCs που εντοπίζονται σε όλο το σώμα. Κάθε ενήλικος ιστός με επιδιορθωτική ή αναγεννητική ικανότητα φαίνεται πως φιλοξενεί ιστό-ειδικά βλαστικά κύτταρα που ορίζονται ως κύτταρα που αυτοανανεώνονται και διατηρούν επαρκή πολλαπλασιαστική και διαφοροποιητική ικανότητα ώστε να επιδιορθώσουν ή να επανακτήσουν ένα ειδικό ιστό **(159), (160), (161), (162)**.

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) είναι αρχέγονα προδρομικά κύτταρα τα οποία έχουν συμβάλει στο μεγαλύτερο κομμάτι των σημερινών γνώσεων σε ό,τι αφορά τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Τα HSCs είναι πολυδύναμα και κυρίως εντοπίζονται στο μυελό των οστών και από αυτά προέρχονται οι τύποι διαφορετικοί των αιματικών κυττάρων. Τα HSCs έχουν χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς εδώ και δεκαετίες **(163)**.

Η πρώτη αναφορά πως ο μυελός των οστών φιλοξενεί μη αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα έγινε πριν 130 χρόνια από τον Γερμανό παθολόγο Cohneim, ο οποίος πρότεινε ότι ο μυελός των οστών μπορεί να είναι πηγή ινοβλαστών που συμβάλουν στην επούλωση τραυμάτων σε περιφερικούς ιστούς **(162)**. Ο Alexander Friedestein ήταν ο πρώτος στα μέσα της δεκαετίας του 70' ο οποίος ταυτοποίησε τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, αποδεικνύοντας ότι όταν ο μυελός των οστών καλλιεργείται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό, προκύπτουν αποικίες κυττάρων προσκολλημένες στην επιφάνεια καλλιέργειας. Η μορφολογία αυτών των κυττάρων είναι όμοια με εκείνη των ινοβλαστών και διαθέτουν ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης, όπως οστεοβλάστες και λιποκύτταρα **(164)**.



Εικόνα 11: Μυελικά αιμοποιητικά & μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα



Εικόνα 12: Μυελικά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και διαφοροποίηση σε συνδετικού τύπου κύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς ενηλίκους συνδετικούς ιστούς, των οποίων ο ρόλος είναι η αναγέννηση και αναδόμηση των ιστών (165). Ξεκινώντας από την αρχική περιγραφή αυτών των κυττάρων οι διάφοροι συγγραφείς-ερευνητές αναφέρονται σε αυτά χρησιμοποιώντας διαφορετικούς χαρακτηρισμούς. Οι αρχικοί όροι που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι, μονάδες που σχηματίζουν αποικίες ινοβλαστών (colony forming unit-fibroblast, CFU-F) ή στρωματικοί ινοβλάστες του μυελού (marrow stromal fibroblasts, MSF) (166), (167). Οι όροι αυτοί εγκαταλείφθηκαν ή αντικαταστάθηκαν από άλλες

ονομασίες όπως μυελικά στρωματικά κύτταρα (marrow stromal cells MSCs) (162), ή πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal progenitors cells MPCs). Ο όρος μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs) χρησιμοποιήθηκε από το Caplan το 1994 και είναι ο όρος που επικράτησε και στη συνέχεια θα αναγράφονται με αυτόν (168).

Ο Caplan περιέγραψε τη μεθοδολογία για την απομόνωση αυτών των κυττάρων η οποία βασίζεται στην ικανότητα τους να προσκολλώνται στην επιφάνεια καλλιέργειας και έπειτα ήταν δυνατόν να παρατηρήσουνε ότι αυτά τα κύτταρα είχαν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν αρχικά *in vitro* και εν συνεχεία *in vivo* σε κύτταρα διαφόρων μεσοδερμικών σειρών. Έτσι μεταξύ 80' και 90' επικράτησε ο όρος «μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα» για να υπογραμμίσει την πολυδυναμικότητα αυτών των κυττάρων (169). Τα MSCs κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης αλλά και αναδιαφοροποιούνται σε κύτταρα μη μεσοδερμικής προέλευσης όπως ηπατοκύτταρα, νευρώνες και αστροκύτταρα (170).

Στον ενήλικα ανθρώπινο οργανισμό ως πλουσιότερη πηγή μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων θεωρούνταν ο μυελός των οστών, πλέον όμως έχουν εντοπιστεί και άλλες πηγές από τις οποίες μπορούμε να αντλήσουμε κύτταρα αδιαφοροποίητα ικανά να εξελιχθούν σε διάφορους κυτταρικούς τύπους μεσεγχυματικής και μη προέλευσης υπό τα κατάλληλα ερεθίσματα. Κύτταρα με αυτά τα χαρακτηριστικά βρίσκονται στους σκελετικούς μυς, στο οστό, στο λίπος, αλλά και στο χόνδρο και στον τένοντα (171), (172), (173), (174), (175), (176). Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών αποτελούν ένα μικρό κλάσμα μονοπύρηνων κυττάρων και αντιπροσωπεύουν περίπου το 0.001%-0.01% των κυττάρων που αναρροφώνται (177).

Μέσω ενζυματικής διάσπασης των ιστών απομονώθηκαν κύτταρα από σκελετικούς μυς αλλά και οστό με ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορα κύτταρα μεσοδερμικής σειράς (μυϊκά, λιπώδη, οστικά και χονδροκύτταρα) (178) (179). Παρόλα αυτά δεν αποδείχτηκε με απόλυτη βεβαιότητα πως τα MSCs αυτών των ιστών αποτελούν τον ίδιο τύπο πρόδρομων κυττάρων αντιπροσωπευόμενο από τα MSCs του μυελού των οστών.

Η ομάδα του Chrisan υποστήριξε πως πολυδύναμα MSCs υπάρχουν σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς και όργανα (180). Η ύπαρξη των MSCs δεν περιορίζεται στον μυελό των οστών αλλά μπορούν να εντοπιστούν στον πλακούντα,

στον οδοντικό πολφό, στους τένοντες, στους σκελετικούς μυς, το λίπος στο ομφαλικό αίμα και στο αμνιακό υγρό (180), (181), (182), (183), (184), (185).

Δυο δεκαετίες πριν ταυτοποιήθηκε ένας πληθυσμός βλαστικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό. Κύτταρα απομονωμένα μέσω λιποαναρρόφησης διαθέτουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε οστεογενή, λιπογενή μυογενή και χονδρογενή σειρά, καθώς επίσης διαθέτουν και φαινότυπο όμοιο με εκείνο των MSCs του μυελού, όμως διαφέρουν ως προς τις συνθήκες που απαιτούν ώστε να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα ή μυοκύτταρα (186), (187).

Ανεξάρτητα της απουσίας καθοριστικών δεικτών για τα MSCs, η ετερογενής φύση των πληθυσμών MSCs και παραλλαγές στο δυναμικό διαφοροποίησης, αυτά παραμένουν μια ελκυστική πηγή βλαστικών κυττάρων για τη θεραπεία ασθενειών (188), (189).

Ο όρος «βλαστικό» αποδίδεται σε ένα κύτταρο που όχι μόνο είναι ικανό να εκφράσει πολλαπλούς χαρακτήρες στις κατάλληλες συνθήκες, αλλά διαθέτει και μια υψηλή ικανότητα αυτοανανέωσης ή διαφορετικά είναι σε θέση να αυτοδιπλασιάζεται. Κάποιοι συγγραφείς αναφέρουν, πράγματι, την ικανότητα των MSCs να πολλαπλασιάζονται για πάνω από σαράντα γενιές χωρίς να χάσουν τη χαρακτηριστική πολυδυναμικότητά τους. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα δεν υφίστανται, πράγματι αλλαγές σε ότι αφορά τον καρυότυπο ή την απώλεια της φυσιολογικής τελομερασικής δραστηριότητας όταν μετρίως πολλαπλασιάζονται *in vitro*, ενώ φαίνεται να οδηγούνται σε γήρανση όταν αυτός ο πολλαπλασιασμός γίνεται υπερβολικός, χάνοντας έτσι την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα αλλά και της πολυδυναμικότητά τους (190), (191).

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι ποιο εξειδικευμένα βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στην πλειονότητα των ιστών και των οργάνων του ανθρώπινου σώματος και από τα οποία προκύπτουν οι ώριμοι τύποι ιστοειδικών κυττάρων. Στους ιστούς τους οποίους έχουν εντοπισθεί ενήλικα βλαστικά κύτταρα, η απομόνωσή τους είναι δύσκολη με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται επαρκής πληθυσμός αυτών κυττάρων ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για κλινικές δοκιμές. Τα MSCs βρίσκονται σε πολύ μικρό αριθμό *in vivo*, αλλά μπορούν εύκολα να πολλαπλασιαστούν *in vitro*. Οι ιστοί που φιλοξενούν πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων δεν είναι εύκολα διαθέσιμοι και προσβάσιμοι.

Μεγάλη είναι η συζήτηση στη βιβλιογραφία για τη πραγματική φύση των κυττάρων που ονομάζουμε MSCs, καθώς ετερογενείς πληθυσμοί κυττάρων

απομονώνονται χρησιμοποιώντας μια σειρά διαδικασιών. Επί του παρόντος η Διεθνής Εταιρεία Κυτταρικής Θεραπείας παρείχε ελάχιστα κριτήρια για τη ταυτοποίηση των MSCs τα οποία περιλαμβάνουν:

- την ικανότητα αυτών των κυττάρων να επικολλώνται στη πλαστική επιφάνεια καλλιέργειας,
- την έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων επιφανείας (*CD90*, *CD105*, *CD73*) και την απουσία έκφρασης αιμοποιητικών δεικτών (*CD45*, *CD34*, *CD14* ή *CD11b*)
- και την ικανότητα διαφοροποίησης *in vitro* σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης (192), (193).

Τα σωματικά βλαστικά κύτταρα διατηρούν την συνέκφραση τουλάχιστον τριών εκ των τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων των εμβρυϊκών βλαστικών (*Oct4*, *klf4* και *Sox2*) καθώς παρουσιάζουν και υψηλή έκφραση αλκαλικής φωσφατάσης. Επιπλέον τα όργανο-ειδικά ενήλικα βλαστικά εκφράζουν μια ομάδα χαρακτηριστικών μαρτύρων. Όμοια με τα εμβρυϊκά, δεν είναι η απτή έκφραση ενός μόνο παράγοντα, αλλά η παρουσία ενός ισορροπημένου δικτύου μεταξύ του πυρήνα των βλαστικών δεικτών, ο οποίος διατηρεί τα χαρακτηριστικά των ενηλίκων βλαστικών κυττάρων (49).

Η χρήση ενηλίκων βλαστικών κυττάρων είναι λιγότερο αντιφατική σε σχέση με αυτή των εμβρυϊκών. Αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, παρότι η διαφοροποιητική τους ικανότητα είναι ποιο περιορισμένη συγκριτικά με αυτή των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα αποτελούν μια υποσχόμενη πηγή για νέες κυτταρικές θεραπείες εξαιτίας των ιδιοτήτων τους, της υψηλής πολλαπλασιαστικής και διαφοροποιητικής ικανότητας, τη ιδιότητας δημιουργίας μικροπεριβάλλοντος και της ανοσοτροποποιητικής δράσης (194).

Τα MSCs διαθέτουν μεταναστευτικές δυνατότητες και μπορούν να εκκρίνουν προστατευτικούς παράγοντες και να δρουν ως πρωτογενή μήτρα για την αναγέννηση του ιστού κατά τη διάρκεια φλεγμονής, τραύματος του ιστού και σε κάποιους καρκινικούς τύπους (195). Αυτές οι λειτουργίες υπογραμμίζουν το σημαντικό φυσιολογικό ρόλο των MSCs και επισημαίνουν τη σημαντική δυνατότητα για τη κλινική χρήση των διαφορετικών πληθυσμών προερχόμενα από ποικιλία ιστών. Το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών εστιάζεται στο ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης αυτών

των κυττάρων και στην ικανότητα τους να δημιουργούν μικροπεριβάλλον και να υποστηρίζουν τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μετά από συνμεταμόσχευση, γεγονός που προσφέρει πολλές ευκαιρίες στη χρήση αυτών των κυττάρων για γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία (194). Η χρήση αυτών των κυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς καθιστά αναγκαία τη δημιουργία μεγάλων αριθμητικά αποθεμάτων των MSCs και αυτό είναι δυνατό μόνο μέσω παρατεταμένων χρονικά *in vitro* καλλιιεργειών.

Παρότι, MSCs βρίσκονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες *in vivo*, αυτά μπορούν εύκολα να πολλαπλασιαστούν *in vitro* και να δώσουν διάφορους μεσεγχυματικούς κυτταρικούς τύπους αλλά και κυτταρικούς τύπους των άλλων γενετικών σειρών (193).

Οι Vaccanti και η ομάδα του, εξέτασαν τη επίδραση των κυτταρικών περασμάτων στα χαρακτηριστικά των μυελικών MSCs. Αυτοί συνέκριναν πρώιμα στάδια καλλιέργειας μέχρι το 5^ο πέραςμα και στάδια μετά το 15^ο πέραςμα και παρουσίασαν ότι στα μεταγενέστερα στάδια της καλλιέργειας τα κύτταρα παρουσίαζαν χαρακτηριστικά συνδεδεμένα με τη κυτταρική γήρανση, όπως συσσώρευση της ακτίνης και μειωμένη ικανότητα επικόλλησης στην επιφάνεια καλλιέργειας. Επίσης μειώνεται η πολυδυναμικότητάς τους και η διαφοροποιητική ικανότητα. (196), (197).

Οι Dhanasekaran και συν., αξιολόγησαν την διατήρηση των χαρακτηριστικών των μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενα από λιπώδη ιστό κατά τη διάρκεια παρατεταμένων καλλιιεργειών. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους δείχνουν τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας, διαφοροποιητικής ικανότητας, του καρυότυπου και του ανοσολογικού προφίλ αυτών των κυττάρων κατά τη διάρκεια 25 κυτταρικών ανακαλλιιεργειών υπό κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (198).

Η πολυδυναμικότητα των μυελικών MSCs εξασθενεί κατά τη διάρκεια μακρόχρονων καλλιιεργειών. Παρατηρήθηκε για παράδειγμα ότι MSCs υπό καλλιέργεια μετά τη 12^η ανακαλλιέργεια παρουσίαζαν σημάδια γήρανσης και απώλεια της λιπογενούς διαφοροποίησης (199). Σύμφωνα και με άλλους συγγραφείς οι οποίοι μελέτησαν καλλιέργειες ανθρώπινων μυελικών MSCs έδειξαν να διατηρούν το οστεογενές δυναμικό τους. MSCs σε καλλιέργεια για 118 μέρες παρουσιάζουν τα συμπτώματα της γήρανσης, τα οποία μορφολογικά εκφράζονται με ανομοιομορφία

και αλλαγή στο σχήμα των κυττάρων, το κυτταρόπλασμα των κυττάρων γίνεται κοκκώδες και κυτταρικά θραύσματα εμφανίζονται στο μέσο καλλιέργειας, (200), (201).

Η αναδιπλασιαστική (κυτταρική) γήρανση των MSCs, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη πηγή προέλευσης τους και τον οργανισμό. Σύμφωνα με τα δεδομένα τα μυελικά ανθρώπινα κύτταρα είναι ανεκτικά σε 40-50 πληθυσμιακούς διπλασιασμούς (202). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού των MSCs μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων του δότη και την αύξηση των κυτταρικών περασμάτων *in vitro* (203), (199). Η λειτουργία των σωματικών βλαστικών κυττάρων μειώνεται κατά τη διαδικασία γήρανσης του οργανισμού (204). Όμοια με τα σωματικά κύτταρα, τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα υπόκεινται σε καταστάσεις στρες κατά τη διάρκεια της ζωής, οδηγώντας σε μείωση του αριθμού τους και των λειτουργιών τους (205).

Η αναδιπλασιαστική-κυτταρική γήρανση των MSCs έχει λειτουργικές επιπτώσεις στην έκφραση των αντιγόνων επιφανείας και στη διαφοροποιητική ικανότητα και προκαλεί μόνιμες αλλαγές στη συνολική γονιδιακή έκφραση και στο προφίλ έκφρασης του miRNA των MSCs. Οι συνδεδεμένες επιπτώσεις της γήρανσης δεν περιορίζονται μόνο στα γηρασμένα περάσματα, αλλά είναι προσθετικές από την έναρξη της *in vitro* καλλιέργειας (206).

Αν και το δυναμικό διαφοροποίησης των MSCs είναι σχετικά περιορισμένο, εν σύγκριση με τα ESC και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, τα MSCs αποτελούν μια ασφαλέστερη πηγή κυτταρικής θεραπείας σε ότι αφορά τον κίνδυνο σχηματισμού όγκων και καρκινογένεσης εξαιτίας μεταμοσχευθέντων βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, όσο η ηλικία των MSCs αυξάνεται οι ιδιότητές τους σταδιακά εξασθενούν, συμπεριλαμβανομένου της διαφοροποίησης, της παλιννόστησης, της ανοσορύθμισης και της επούλωση τραυμάτων. Η σωστή χρήση των MSC για κλινικές εφαρμογές απαιτεί μια γενική κατανόηση της διαδικασίας γήρανσης αυτών. Για τη χρήση των MSCs στη θεραπεία, μεθοδολογίες που επιτρέπουν την παραγωγή μεγάλων πληθυσμών των MSCs χωρίς να επηρεάζουν τις ιδιότητες της διαφοροποίησης ή της ανοσορύθμισης πρέπει να καθοριστούν (205).

Θεωρίες υπήρξαν ότι τα ενήλικα ή ιστού ειδικά βλαστικά κύτταρα μπορεί να είναι αθάνατα, ωστόσο πρόσφατα δημοσιευμένα στοιχεία δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητά τους είναι περιορισμένη από φυσική γήρανση, από κοινού με τις

περισσότερους άλλους σωματικούς τύπους κυττάρων. Μειωμένη δραστηριότητα των βλαστικών κυττάρων σε μεγάλη ηλικία εγείρει ερωτήματα ως προς το αν η ηλικία του δότη πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων και σε ποια ηλικία θα πρέπει να συλλέγονται τα βλαστικά κύτταρα του δότη για να εξασφαλιστεί το μεγαλύτερο δυνατό νούμερο βιώσιμων, λειτουργικών και μη μεταβληθέντων βλαστοκυττάρων. Παρά το γεγονός ότι τα βλαστικά κύτταρα παραμένουν ενεργά σε μεγάλη ηλικία, αλλαγές τόσο στα ίδια όσο και στο μικροπεριβάλλον τους αναστέλλουν την αναγεννητική δυναμική τους. Ο αντίκτυπος της γήρανσης του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων διαφέρει μεταξύ των ιστών και εξαρτάται από μια σειρά εγγενών και εξωγενών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των συστημικών αλλαγών που σχετίζονται με αλλοιώσεις του ανοσοποιητικού συστήματος (205).

Τα προβλήματα απομόνωσης και γήρανσης των ενήλικων βλαστικών κυττάρων ώθησαν την επιστημονική κοινότητα στην αναζήτηση νέων πηγών βλαστικών κυττάρων από ιστούς και όργανα αναπτυξιακά νεότερους.

1.7 ΕΞΩΕΜΒΡΥΪΚΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ

ΚΥΤΤΑΡΑ

Η πιο σημαντική πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων για κυτταρική θεραπεία είναι ο μυελός των οστών. Τα μυελικά MSCs έχουν εξονυχιστικά χαρακτηριστεί και αποτελούν το χρυσό κανόνα για το χαρακτηρισμό και την εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική των MSCs.

Κλινικά, ο ανθρώπινος ενήλικος μυελός των οστών χρησιμοποιείται ως πηγή MSCs. Όμως η χρήση του ενήλικα μυελού των οστών έχει περιορισμούς. Πρώτον, η αφθονία των MSCs στον ενήλικα μυελό είναι χαμηλή (περίπου 1.001-0.01%) (207). Δεύτερον, ο συνολικός αριθμός και η διαφοροποιητική ικανότητα αυτών των κυττάρων μειώνεται με την ηλικία (196), (197) καθώς επίσης και η λήψη του μυελού αποτελεί μια επεμβατική διαδικασία. Συνέπεια αυτών αποτέλεσε η αναζήτηση εναλλακτικών πηγών MSCs που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικά πρωτόκολλα.

Πέρα των μυελικών MSCs, και οι υπόλοιποι πληθυσμοί ενηλίκων μεσεγχυματικών κυττάρων από διάφορους ιστούς σίγουρα δεν αντιμετωπίζουν τις ηθικές ενστάσεις και την ογκογονικότητα των ESCs, η χρήση τους όμως έρχεται αντιμέτωπη με προβλήματα απομόνωσης, μείωση του αριθμού τους καθώς και έκπτωση των λειτουργιών τους, συνδεδεμένα με τη γήρανση αυτών (208) (209).

Οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί παρουσιάζουν μια νέα εναλλακτική πηγή MSCs, αναπτυξιακά νεότερη. Αυτά μπορούν να απομονωθούν είτε από το ίδιο το έμβρυο είτε από εξωεμβρυϊκούς ιστούς όπως ομφάλιο λώρο, αμνιακό υγρό, γέλη του Wharton, χοριακές λάχνες και πλακούντα (210). Πολλές μελέτες δείχνουν ότι τα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από αυτούς τους ιστούς έχουν χαρακτηριστικά και των πολυδύναμων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων αλλά και των πολυδυναμικών ενηλίκων βλαστικών κυττάρων (211). Τα βιολογικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων και η απουσία ηθικών ενστάσεων για τις εφαρμογές τους υποδηλώνει αυτά τα κύτταρα ως υποσχόμενους υποψήφιους για κυτταρικές θεραπείες και αναγέννηση ιστών. Συγκρινόμενα με τα ενήλικα MSCs, εξωεμβρυϊκοί ιστοί διαθέτουν χαρακτηριστικά πλεονεκτικότερα για κλινικές εφαρμογές, σε όρους πολλαπλασιαστικού δυναμικού και προσβασιμότητας (212).

Τα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από στοιχεία του κήματος κατατάσσονται στη κατηγορία των ενηλίκων βλαστικών κυττάρων αλλά μπορούν να αποτελέσουν μια ξεχωριστή κατηγορία ανάμεσα στα ενήλικα και τα εμβρυϊκά.

Προγενέστερες μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία MSCs σε εμβρυϊκούς ιστούς καθόλη τη διάρκεια της κύησης (213), (214), όπως στο αίμα, στο μυελό των οστών, ήπαρ, πνεύμονα, πάγκρεας και σπλήνα (215), (216), (217), (218) και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς όπως γέλη του Wharton, αμνιακό υγρό, αμνιακή μεμβράνη και ο πλακούντας (36), (219), (220), (31), (221). Αυτά τα κύτταρα επιδεικνύουν χαρακτηριστικά των ενηλίκων MSCs, με υψηλότερη πολλαπλασιαστική και διαφοροποιητική ικανότητα έναντι των ενήλικων MSCs (47), (222) και χαρακτηριστικά των ESCs, με έκφραση γονιδίων μαρτύρων της πολυδυναμικότητας, *Oct 4*, *Nanog*, *Sox2* και *Rex1*, ρυθμιστές της τύχης των βλαστικών κυττάρων και αντιπροσωπευτικούς μάρτυρες της αδιαφοροποίητης κατάστασης (47), (223), (224). Ο Guillot και οι συνεργάτες του, παρουσίασαν ότι τα MSCs από εξωεμβρυϊκούς και μέσης κυοφορίας εμβρυϊκούς ιστούς επιδεικνύουν ταχύτερους ρυθμούς ανάπτυξης από τα ενήλικα (225).

Τα βλαστικά κύτταρα απομονωμένα από τη γέλη του Wharton, έχουν το τυπικό προφίλ έκφρασης των ενηλίκων MSCs και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, καρδιομυοκύτταρα και νευρώνες (220). Αυτά τα κύτταρα επίσης εκφράζουν εμβρυϊκούς βλαστικούς δείκτες όπως *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* και *Rex1* (226).

Για πάνω από 70 χρόνια αμνιακό υγρό χρησιμοποιείται για προγεννητική διάγνωση μέσω αμνιοπαρακέντησης, αλλά πρόσφατα έχει αναγνωριστεί ως δυναμική πηγή βλαστικών κυττάρων. Ο πληθυσμός των κυττάρων αμνιακού υγρού είναι ετερογενής, και στην πραγματικότητα προέρχεται και από τα τρία γενετικά στρώματα και διαθέτει αρκετούς, μερικώς διαφοροποιημένους, κυτταρικούς τύπους με επικρατέστερο τον επιθηλιακό τύπο. Οι Tsai και συν., ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων αμνιακού υγρού δευτέρου τριμήνου κύησης, μεταξύ 16-17^{ης} εβδομάδας (221). Αυτά τα κύτταρα είναι θετικά για τα αντιγόνα επιφανείας μάρτυρες των MSCs, αλλά αρνητικά για τα αιμοποιητικά αντιγόνα. Επιπλέον εκφράζουν *Oct4* (227) και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και νευρικά κύτταρα (228), (229). Τα κύτταρα του αμνιακού υγρού είναι θετικά και για άλλους εμβρυϊκούς δείκτες όπως το *Nanog* και *SSEA4*. Επιπλέον η έκφραση του *Oct4* διατηρείται σε υψηλά επίπεδα

για περισσότερες από είκοσι ανακαλλιέργιες υποδεικνύοντας την ικανότητα αυτών των κυττάρων να συντηρούν την αδιαφοροποίητη κατάσταση τους για παρατεταμένα διαστήματα (230).

Πρόσφατα, ο ανθρώπινος πλακούντας παρουσίασε μεγάλο ενδιαφέρον στο πεδίο της κυτταρικής θεραπείας, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε κύτταρα. αυξημένης πλαστικότητας, που απομονώνονται από αυτόν (27), (231). Επιπλέον λόγω της προέλευσης τους από ένα ιστό αναπτυξιακά πολύ νέο, πιθανότητα τα MSCs από πρώιμους νεογνικούς ιστούς, να διατηρούν ένα ευρύτερο διαφοροποιητικό δυναμικό σε σχέση με τα ενήλικα MSCs (36). Παρότι το χόριο και το άμνιο είναι πλούσιες πηγές MSCs, οι περισσότερες πληροφορίες που έχουμε αφορούν το τελειόμηνο άμνιο (232), (233), (234), ενώ υπάρχουν περιορισμένες αναφορές που περιγράφουν χοριακά MSCs προερχόμενα από πρώτου τριμήνου πλακουντιακές λάχνες (235), (212).

Ο πλακούντας είναι έμβryo-μητρικό όργανο που προκύπτει από το τροφοεκτόδερμα και περιλαμβάνει μέρη όπως η κυτταροτροφοβλάστη και η συγκυτιοτροφοβλάστη (6). Οι πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων του πλακούντα μπορούν να διαχωριστούν σε χοριακά τροφοβλαστικά κύτταρα και χοριακά μεσεγχυματικά κύτταρα, και οι δυο πληθυσμοί παρουσιάζουν αξιοσημείωτη πλαστικότητα (236), (237). Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν βλαστικούς δείκτες όπως *Oct4*, *Rex*, *Nanog*, *SSEA-4* και *SSEA-1* (8). Τα MSCs απομονωμένα από τον πλακούντα παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με εκείνα του μυελού και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα (238). Επιπρόσθετα είναι θετικά για τους δείκτες *HLA-ABC* και αρνητικά για *HLA-DR* και τα συνδιεγερτικά μόρια καθώς επίσης ότι η έκφραση αυτών των μορίων δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων ανακαλλιεργειών (172). Τα πλακουντιακά MSCs παρουσιάζουν διαφοροποιητικές και κλωνογονικές ικανότητες που αποτελούν επιπλέον επιβεβαίωση ότι αυτά τα κύτταρα έχουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων (172).

Ανθρώπινα κύτταρα νεογνικής προέλευσης συνήθως προέρχονται από υλικό που πλέον είναι περιττό και φαίνεται να είναι ανοσοπροστατευμένα, παρουσιάζοντας χαμηλή ανοσογονικότητα και υψηλές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (239). Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα MSCs προερχόμενα από τον πλακούντα παρουσιάζουν μια πολύ-γενεαλογική δυνατότητα διαφοροποίησης όμοια με εκείνη των ενηλίκων μυελικών MSCs (24).

Πρώτου τριμήνου λαχνικά MSCs, είναι κύτταρα απομονωμένα από περιττό υλικό διαδικασιών διάγνωσης κατά τα πρώιμα στάδια της κύησης. Λήψη χοριακών λαχνών πραγματοποιείται την 11-13 εβδομάδα κύησης, ενώ η αμνιοπαρακέντηση σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο (14-16 εβδομάδες), καθιστώντας χοριακά-MSCs αναπτυξιακά νεότερα και σχετικά άφθονο κυτταρικό τύπο που μπορεί να προκύψει από μη αμβλωτικό ανθρώπινο υλικό.

Η διάσπαση των χοριακών λαχνών, μετά από λήψη, επιτρέπει την απομόνωση κυτταρικού πληθυσμού με ατρακτοειδή μορφολογία. Οι Poloni και συν., χαρακτήρισαν ένα πληθυσμό κυττάρων θετικό για τα μεσεγχυματικά αντιγόνα επιφανείας και αρνητικό για τους αιμοποιητικούς δείκτες (235). Η αδιαφοροποίητη κατάσταση αυτού του κυτταρικού πληθυσμού αναδείχθηκε από την έκφραση βλαστικών δεικτών όπως *Oct4*, *Rex1*, *Gata* και *Nestin* (235). Τα κύτταρα των χοριακών λαχνών είναι επίσης ικανά προς διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα, χονδροβλάστες και νευρικά κύτταρα και διαθέτουν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και δεν υποβάλλονται σε αλλοιώσεις καρυοτύπου (7). Τόσο τα αμνιακά όσο και χοριακά λαχνικά κύτταρα έχουν μεγαλύτερο μήκος τελομερών έναντι των ενηλίκων το οποίο δεν φαίνεται να μεταβάλλεται κατά τις παρατεταμένες χρονικά καλλιέργειες γεγονός που δηλώνει τη σταθερότητα αυτών των κυττάρων (212).

Χοριακά λαχνικά κύτταρα αναπτύσσονται γρήγορα παρουσία ανθρώπινου ορού στο θρεπτικό μέσο και έχουν παρουσιάσει 20 πληθυσμιακούς διπλασιασμούς σε 59 ημέρες καλλιέργειας (240).

Οι νησίδες βλαστικών κυττάρων είναι ένα υψηλά ισορροπημένο μικροπεριβάλλον το οποίο επιτρέπει στα βλαστικά κύτταρα να επιβιώνουν, να παραμένουν αδρανή και έπειτα να πολλαπλασιάζονται, μεταναστεύουν και να διαφοροποιούνται ώστε να αντικαταστήσουν ή να επιδιορθώσουν ιστούς όταν χρειάζεται (241). Τα MSCs έχουν βρεθεί σε περιαγγειακές νησίδες, όπου μπορεί να συντελούν στη ρύθμιση του σχηματισμού νέων αγγείων και στην ωρίμανση αυτών (241). Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία, οι πρόδρομοι των αιμοαγγειακών κυττάρων στον πρώιμο πλακούντα πιστεύεται ότι προκύπτουν άμεσα από το μεσέγγυμα των λαχνών (242).

Ο Arakawa και η ομάδα του έδειξαν πως τα χοριακά λαχνικά κύτταρα που συλλέγονται κατά την 9^η εβδομάδα κύησης εκφράζουν mRNA και των δυο δεικτών *Nanog* και *Sox2* αλλά όχι *Oct4 mRNA*. Σε αντίθεση σε κύτταρα που συλλέχθηκαν

κατά την 11-12^η εβδομάδα κύησης δεν ανίχνευσαν έκφραση αυτών των πολυδύναμων μαρτύρων δεικτών των βλαστικών κυττάρων (243).

Τα χοριακά λαχνικά κύτταρα 9^{ης} εβδομάδας περιλαμβάνουν έναν υποπληθυσμό αδέσμευτων πρόδρομων κυττάρων που εκφράζουν *Nanog* και *Sox2*, *mRNA* και φαίνεται να διαφέρουν από το πληθυσμό των δεσμευμένων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, ενώ μετά την 10-11^η εβδομάδα δεν παρατηρείται αυτή η έκφραση. Αυτό το δεδομένο φανερώνει πως τα χοριακά λαχνικά κύτταρα ενδεχομένως ρυθμίζουν προς τα κάτω την έκφραση του *Nanog* και *Sox2*, *mRNA* ανάμεσα στη 9^η και 10^η εβδομάδα (243).

Τα MSCs τυπικά παράγουν διάφορους τύπους κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και κυτταρικών μορίων προσκόλλησης, σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον και τις ανοσοτροποποιητικές ικανότητες (244). Πολλές είναι οι αναφορές για τον ανοσοκασταλτικό ρόλο που παρουσιάζουν *in vitro* και το ρόλο που μπορεί να επιτελέσουν σε κυτταρικές θεραπείες του ανοσοποιητικού και σε αλλογενείς μεταμοσχεύσεις. Η μικρή συχνότητα των MSCs στους ιστούς καθιστά την *in vitro* εξάπλωσή τους αναγκαία ώστε να επιτευχθεί ένα επαρκή αριθμό κυττάρων για κυτταρικές θεραπείες (245).

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Τα βλαστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αναγεννώνται διατηρώντας την αδιαφοροποίητη μορφή τους αλλά και να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η βιολογία των βλαστοκυττάρων αποτελεί πεδίο βιοϊατρικών ερευνών με αναζήτηση βλαστικών κυττάρων σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Επιπρόσθετα σημαντικό τμήμα της ερευνητικής δραστηριότητας σήμερα επικεντρώνεται στη δυνατότητα χρήσης των βλαστικών κυττάρων σε θεραπείες αναγενετικής ιατρικής, εκμεταλλευόμενες την πλαστικότητα αυτών των κυττάρων. Η κυτταρική θεραπεία με τη χρήση βλαστικών κυττάρων μπορεί να ανοίξει νέο δρόμο για τη θεραπεία γενετικών ανωμαλιών και να εξασφαλίσει την αναδόμηση κατεστραμμένων ιστών αποκαθιστώντας την ομαλή τους λειτουργία.

Για τη χρήση των MSCs σε κυτταρικές θεραπείες απαραίτητη προϋπόθεση είναι η επάρκεια κυττάρων. Η απομόνωση κυττάρων από ενήλικους ιστούς είναι δεδομένο ότι αποτελεί μια δύσκολη και πολλές φορές ανεπιτυχή διαδικασία.

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από εξωεμβρυϊκούς ιστούς, αντιπαρέρχονται τόσο τους ηθικούς φραγμούς αλλά και τα προβλήματα ογκογονικότητας των ESCs και ίσως μπορούν να δώσουν λύσεις σε θεραπείες αναγενετικής ιατρικής.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των εξωεμβρυϊκών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, ο αριθμός κυττάρων συνεχίζει να αποτελεί θέμα ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους. Ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων, υπό κατάλληλες συνθήκες, σε σχήματα παρατεταμένων χρονικά καλλιιεργειών μας δίνει τη δυνατότητα να δημιουργήσουμε δεξαμενές κυττάρων έτοιμα προς χρήση.

Στην παρούσα εργασία έγινε απομόνωση τροφοβλαστικών κυττάρων από χοριακές λάχνες του πλακούντα την 11^η -12^η εβδομάδα κύησης. Το γεγονός ότι πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο πλακούντας είναι όργανο με πλούσια έκφραση μορίων-δεικτών των βλαστικών κυττάρων και επιπλέον είναι ένα όργανο εμβρυϊκής προέλευσης, μας ώθησε να απομονώσουμε και αναζητήσουμε τα χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων και πώς αυτά μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια παρατεταμένων χρονικά καλλιιεργειών.

Τα πλακουντιακά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των ενηλίκων βλαστικών κυττάρων και κατατάσσονται στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα αλλά παράλληλα παρουσιάζουν και έκφραση μορίων-μαρτύρων των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Η αναζήτηση MSCs σε χοριακές λάχνες πρώτου τριμήνου πραγματοποιήθηκε θεωρώντας ότι τα βλαστοκύτταρα που μπορεί να προκύψουν είναι προτιμότερα εκείνων των ενηλίκων αλλά και εκείνων του τελειόμηνου πλακούντα λόγω του πρώιμου σταδίου εξέλιξης και είναι εγγύτερα στα εμβρυϊκά κύτταρα

Τα χοριακά κύτταρα απομονώθηκαν και τέθηκαν σε παρατεταμένες χρονικά καλλιέργειες μέσω επαναλαμβανόμενων ανακαλλιιεργειών με σκοπό να αξιολογηθεί η πολλαπλασιαστική τους δυναμική και η έκφραση εμβρυϊκών γονιδίων δεικτών αλλά και να διερευνηθούν οι πιθανές επιπτώσεις της επί μακρόν καλλιέργειας στα χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην ενότητα αυτή παρατίθενται, το υλικό και η ανάπτυξη των διαφόρων μεθοδολογιών, που χρησιμοποιήθηκαν, με στόχο την απομόνωση και τη παρατεταμένη χρονικά εξάπλωση του κυτταρικού πληθυσμού μεσεγγυματικών ομοιαζόντων κυττάρων προερχόμενα από χοριακές λάχνες πλακούντα πρώτου τριμήνου. Σκοπός της επί μακρόν καλλιέργειας των κυττάρων ήταν ταυτοποίηση του πολυδυναμικού τους χαρακτήρα αλλά και η διατήρηση του κατά τις επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες της έκφρασης εμβρυϊκών γονιδίων μαρτύρων της πολυδυναμικότητας.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα δείγματα χοριακών λαχνών που χρησιμοποιήθηκαν για την έρευνα μας παραχωρήθηκαν από το τμήμα προγεννητικού ελέγχου της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής και επρόκειτο για μικρά δείγματα ιστού που περίσσευαν από διαδικασίες προγεννητικής διάγνωσης. Τα δείγματα χοριακών λαχνών προήρθαν από 30 έγκυες γυναίκες μεταξύ της 11^{ης} και 13^{ης} εβδομάδας κύησης μέσω της διαδικασίας λήψης χοριακών λαχνών. Όλα τα δείγματα που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη ήταν φυσιολογικού καρυότυπου. Για τη χρήση των δειγμάτων χοριακών λαχνών δόθηκε πλήρης συναίνεση από τις δότριες γυναίκες.

2.1 Κύτταρα

2.1.1 Διάσπαση Ιστού Χοριακών Λαχνών & Απομόνωση Κυττάρων

Διαδικασία:

1. Ο ιστός βιοψίας επεξεργάστηκε άμεσα ώστε να αποφύγουμε τη αποδόμηση του ιστού. Τα δείγματα κυτταροτροφοβλαστικών λαχνών υποβλήθηκαν σε διαδοχικές πλύσεις μέσω φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (Phosphate Buffered Saline – Sigma) σε στείρες συνθήκες και θερμοκρασία δωματίου. Οι διαδοχικές εκπλύσεις πραγματοποιήθηκαν ώστε να αποβληθούν τα πύγματα αίματος. Το άλας συμπαρασύρει και απομακρύνει προσμίξεις και ερυθρά αιμοσφαίρια και επιτρέπει την καθίζηση του ιστού στον πυθμένα του σωληναρίου.

2. Ο ιστός κόπηκε σε μικρότερα τμήματα και μεταφέρθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα HANKS (Biochrome) ώστε να καθαζάνει.

3. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη του ιστού μέσω ενζυμικής διάσπασης, τοποθετώντας τον ιστό σε ίσο όγκο κολλαγενάσης τύπου I, 1mg/ml (Sigma) και θρυψίνης 1x (Biochrome) και επώζοντας στο στον κλίβανο στους 37° C υπό συνθήκες υγρασίας για 40-50 λεπτά. Η ενζυμική διάσπαση βοηθά στην απελευθέρωση και απομόνωση των κυττάρων από τον ιστό των λαχνών.

4. Μετά την επώαση, πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση των ενζύμων με την προσθήκη διπλάσιου όγκου καλλιεργητικού μέσου το οποίο περιείχε εμβρυϊκό ορό βοοειδούς. Η απενεργοποίηση των ενζύμων εμποδίζει την περαιτέρω αλλοίωση της κυτταρική μεμβράνης των κυττάρων, που μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ικανότητα επικόλλησης στην επιφάνεια καλλιέργειας και σε κυτταρικό θάνατο.

5. Η ενζυμική διάσπαση και η απενεργοποίηση των ενζύμων ακολουθούνταν από φυγοκέντρηση του εναιωρήματος στις 1700 rpm για 7 λεπτά με σκοπό τη συλλογή του ιστού σε μορφή ιζήματος και τη περαιτέρω διάσπαση του ιστού μέσω μηχανικής ανάδευσης.

6. Το ίζημα που προέκυπτε επαναδιαλυόταν σε μικρή ποσότητα θρεπτικού μέσου DMEM-F12 (Sigma) και με τη βοήθεια βελόνας ινσουλίνης, 26 gauge μέσω επαναλαμβανόμενων περασμάτων από τη βελόνη, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διάσπαση του ιστού.

7. Εν συνεχεία πραγματοποιούνταν φυγοκέντρωση στα 800 rpm για 10 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλυόταν σε θρεπτικό υλικό DMEM-F12 (Sigma) και καλλιεργείτο σε φιάλη καλλιέργειας 25 κ.εκ (Nunc).

2.1.2 Καλλιέργεια Χοριακών Λαχνών-Προερχόμενων Κυττάρων

Διαδικασία:

1. Το ίζημα που προκύπτει μέσω της ενζυμικής και μηχανικής διάσπασης καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12 (Sigma) το οποίο περιείχε 10% νεογνικό ορό βοοειδούς (FBS, Invitrogen, Gibco), 100units/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Invitrogen, Gibco), και 5% L-γλουταμίνη (Invitrogen, Gibco) και επωάστηκε στους 37° C σε συνθήκες υγρασίας σε ατμόσφαιρα 5% διοξειδίου του άνθρακα CO₂.

2. Τα κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται προσκολλημένα στη επιφάνεια της φιάλης καλλιέργειας έφθασαν σε σύγκλιση 80%, περίπου δυο-τρεις εβδομάδες μετά τη πρώτη καλλιέργεια. Το καλλιεργητικό υλικό ανανεωνόταν με τη προσθήκη φρέσκου \ κάθε τρεις-τέσσερις ημέρες για τον εμπλουτισμό θρεπτικών συστατικών.

3. Τα κύτταρα αποκόλλήθηκαν από την επιφάνεια καλλιέργειας με τη χρήση ενζύμου θρυψίνης 1mg/ml και τοποθέτηση στον κλίβανο στους 37° C & 5% CO₂ και 100% υγρασία.

3. Το ένζυμο αποκόλλησης απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη διπλάσιου όγκου καλλιεργητικού υλικού που περιέχει τουλάχιστον 10% FBS.

4. Μέσω φυγοκέντρωσης, στα 800 rpm για 10 λεπτά, του εναιωρήματος που προέκυψε τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε ίζημα το οποίο επαναδιαλύθηκε και επανακαλλιεργήθηκε ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που προέκυψε, σε μεγαλύτερες φιάλες καλλιέργειας.

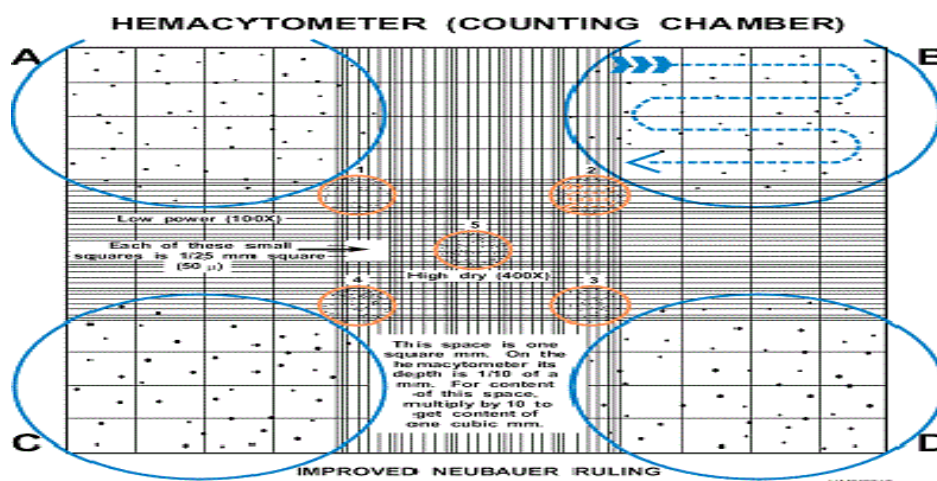
5. Το καλλιεργητικό υλικό ανανεωνόταν με φρέσκο κάθε δυο μέρες και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων επιτεύχθηκε μέσω επαναλαμβανόμενων ανακαλλιιεργειών.

Κατά την αποκόλληση των κυττάρων ένας αριθμός κυττάρων υποβαλλόταν εκ νέου σε καλλιέργεια για την εξάπλωση του πληθυσμού των κυττάρων και ένα μέρος σε διαδικασίες ταυτοποίησης μορφολογικών, ανοσοφαινοτυπικών, μοριακών χαρακτηριστικών αλλά και του διαφοροποιητικού δυναμικού τους και της καρυοτυπικής σταθερότητας τους.

2.1.3 Μέτρηση Κυττάρων

Τα κύτταρα σε καλλιέργεια αξιολογήθηκαν για τη ζωτικότητα τους αλλά και για την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα μέσω χρώσης με μπλε του τρυπανίου (Sigma) και μέτρηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα Newbauer. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1-2ml μέσο καλλιέργειας και ίδιος όγκος χρωστικής, μπλε του τρυπανίου, (Trypan Blue, Sigma) και εναιωρήματος κυττάρων αναδεύτηκε ώστε να πραγματοποιηθεί η μέτρηση. Τα νεκρά κύτταρα εμποτίζονται με τη χρωστική βάφονται μπλέ λόγω διάχυσης της χρωστικής μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και διαχωρίζονται από τα ζωντανά κύτταρα στα οποία η μεμβράνη είναι ακέραιη και δεν εισέρχεται η χρωστική. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων φαίνεται στον Πίνακα 1.

Κάτω από το μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, τα κύτταρα φαίνονται φωτεινά και ευδιάκριτα. Η αλλαγή θερμοκρασίας κάτω από τους 37° C δεν είναι επιβλαβής για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ εκτενείς διακυμάνσεις του pH θα πρέπει να αποφεύγονται καθώς αυτό μπορεί να μειώσει την βιωσιμότητά τους. Για το λόγο αυτό, ένας δείκτης pH (Phenol Red) εμπεριεχόταν στο καλλιεργητικό υλικό.



Εικόνα 13: Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Newbauer

Πεδίο	A	B	C	D	Μέσος όρος
Αριθμός ζώντων κυττάρων	α	β	γ	δ	$\frac{\alpha+\beta+\gamma+\delta}{4}$
Αριθμός νεκρών κυττάρων	ε	ζ	η	θ	$\frac{\epsilon+\zeta+\eta+\theta}{4}$
Σύνολο	α+ε	β+ζ	γ+η	δ+θ	

α, β, γ, δ, ε, ζ, η, θ : ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν στα τέσσερα πεδία της πλάκας Newbauer

Κύτταρα/ml: μέσος όρος ζωντανών κυττάρων ανά τετράγωνο x συντελεστή αραιώσης (2) x 10^4

No κυττάρων: Κύτταρα/ml x αρχικό όγκο εναιωρήματος κυττάρων στο σωλήνα

Κυτταρική Βιωσιμότητα (%): (No ζωντανών κυττάρων / No (ζωντανών + νεκρών) κυττάρων) X100

Πίνακας I: Μέτρηση του αριθμού κυττάρων με τη μέθοδο μπλε του τρυπανίου

Τα κύτταρα συλλεγόταν και χρησιμοποιούνταν είτε για ανακαλλιέργεια είτε για φαινοτυπικό χαρακτηρισμό, επαγωγή σε διαφοροποίηση και απομόνωση RNA.

Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνταν σε συγκέντρωση $5000/\text{cm}^2$ σε νέες φιάλες καλλιέργειας.

2.1.4 Υπολογισμός Πληθυσμιακού-Κυτταρικού Διπλασιασμού

Παρατεταμένης διάρκειας καλλιέργειες προέκυψαν μετά από θρυψινοποίηση και συνεχείς ανακαλλιέργειες. Η δυναμική πολλαπλασιασμού και ο πληθυσμιακός διπλασιασμός των κυττάρων υπό καλλιέργεια υπολογίστηκε σε κάθε ανακαλλιέργεια με τη λογαριθμική εξίσωση που δίνεται από τον τύπο:

$\text{Log}_2 \left(\frac{\text{Νούμερο αποκολλημένων ζωντανών κυττάρων}}{\text{Νούμερο κυττάρων προς καλλιέργεια}} \right)$

Ο τελικός κυτταρικός διπλασιασμός καθορίζεται από την πρόσθεση των επιμέρους κυτταρικών διπλασιασμών όπως καταγράφονται σε κάθε κυτταρικό πέρασμα έως ότου τα κύτταρα σταματήσουν να διαιρούνται.

2.2 Ανάλυση Καρυότυπου

Η σταθερότητα του καρυότυπου σε καλλιέργειες πρωτοπαγών κυττάρων είναι ένα από τα βασικότερα κριτήρια που απαιτούνται για τις προκλινικές και κλινικές εφαρμογές κυτταρικής θεραπείας. Τα δείγματα χοριακών λαχνών από τα οποία απομονώσαμε τα μεσεγχυματικά ομοιάζοντα κύτταρα ήταν φυσιολογικού καρυοτύπου αλλά κυτταρογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων ανακαλλιεργειών με σκοπό να ανιχνεύσουμε πιθανή γενετική αστάθεια των κυττάρων κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης χρονικά καλλιέργειας, και των επαναλαμβανόμενων ανακαλλιεργειών,

Κυτταρογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο 6ο, 12ο και 18ο πέρασμα. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη χρήση θρυψίνης και επανακαλλιεργήθηκαν σε

Chang θρεπτικό μέσο (Irvine Scientific) σε δισκία Petri στα οποία είχαν τοποθετηθεί αντικειμενοφόρες πλάκες για 24-48 ώρες. Στη συνέχεια επωάστηκαν σε 200μl κολχικίνης (10μg/ml) (Sigma) για τρεις ώρες στους 37o C και σε 0.075mol/l KCl (Sigma) για 25 λεπτά.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα 3:1 μεθανόλης/οξικού οξέος (Sigma) και υποβλήθηκαν σε QFQ banding και αξιολογήθηκαν σε φθορίζον μικροσκόπιο Zeiss AxioPlan 2 (Carl Zeiss AG). Περίπου 25 μεταφάσεις αναλύθηκαν από κάθε δείγμα σε επίπεδο 300-400 μπάντες κατά προσέγγιση .

Οι χρωμοσωμικές μεταφάσεις αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού PSI MacKtype 4.5

2.3 Ανοσοφαινοτυπική Ανάλυση-Κυτταρομετρία ροής

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των αντιγόνων επιφανείας πραγματοποιήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Διαδικασία:

1. Για την παρασκευή του δείγματος που υποβαλλόταν σε κυτταρομετρία χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές χρώσης και έκπλυσης. Εν συντομία, 50-100μl (~ 100.000 κύτταρα/ αντίσωμα) εναιωρήματος κυττάρων επωάσθηκε για 15 λεπτά στο σκοτάδι, με κορεσμένα ισοδύναμα 10 διαφορετικών τριπλών συνδυασμένων μονόκλωνων αντισωμάτων με το CD45 ως κοινό σημείο αναφοράς (Πίνακας 2) .
2. Τελικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 1ml PBS.

Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται χρησιμοποιώντας cytomics FC 500 Flow cytometer (Beckman Coulter). Για την ανάλυση εφαρμόσθηκε μια στρατηγική διαχωρισμού με CD45/SS (sidescatter) για την απομόνωση των CD45 αρνητικών τροφοβλαστικών-μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.

ΑΝΤΙΣΩΜΑ	FITC: fluoresceine isothiocyanate	PE: phycoerythrin
	<i>CD45</i> (leukocyte common antigen) (Beckman Coulter, Brea Cal. USA),	<i>CD105</i> (SH2; endogrin) (BD Pharmigen, CA, USA)
	<i>CD73</i> (SH3) (BD Pharmigen, CA, USA)	<i>CD14</i> (monocyte differentiation antigen) (BD Pharmigen, CA, USA)
	<i>CD90</i> (Thy-1), BD Pharmigen, CA, USA)	<i>CD44</i> (hyaluronol receptor) (BD Pharmigen, CA, USA)
	<i>CD29</i> (integrin $\beta 1$) (Abcam UK)	<i>HLA ABC</i> (MHC I). (BD Pharmigen, CA, USA)
	<i>HLA DR</i> (MHC II) (Miltenyi Bergisch Gladbach, Germany)	<i>CD34</i> (hematopoietic progenitor cell antigen) (BD Pharmigen, CA, USA)
	<i>AC133</i> (endothelial progenitor cell marker) (Miltenyi Bergisch Gladbach, Germany)	

Πίνακας 2: Αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές

2.4 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω στατιστικού προγράμματος SPSS v.17 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Η κατανομή των δεδομένων ήταν κανονική και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω μιας παραμέτρου της διακύμανσης. P-value μικρότερο από 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με το μέσο όρο και τη σταθερή απόκλιση (μέση τιμή \pm SD).

2.5 Αξιολόγηση Διαφοροποιητικής Ικανότητας

Τα απομονωθέντα και καλλιεργημένα κύτταρα χοριακών λαχνών υποβλήθηκαν σε επαγωγή οστεογενούς, λιπογενούς και χονδρογενούς διαφοροποίησης στο 5^ο, 8^ο και 10^ο πέρασμα καθώς και σε νευρικά κύτταρα στη 5^η, και 10^η ανακαλλιέργεια.

2.5.1 Λιπογενής διαφοροποίηση

Για να αξιολογηθεί η ικανότητα των κυττάρων να διαφοροποιηθούν σε λιπογενή σειρά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 1×10^4 σε ειδικό λιπογενές θρεπτικό μέσο (STEMPRO®, GIBCO) και το μέσο καλλιέργειας ανανεωνόταν κάθε τρεις ημέρες.

Μετά από 14 ημέρες, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα (PBS) σταθεροποιήθηκαν με τη χρήση κρύας μεθανόλης και υποβλήθηκαν σε ειδική χρώση που ανέδειξε την παρουσία λιπιδικών κύστεων αλλά και σε μοριακή ανάλυση για ανίχνευση γονιδίων μαρτύρων της διαφοροποίησης.

2.5.2 Οστεογενής Διαφοροποίηση

Η επαγωγή των κυττάρων σε οστεογενή διαφοροποίηση πραγματοποιήθηκε καλλιεργώντας τα κύτταρα με πυκνότητα $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ στο κοινό μέσο καλλιέργειας τους DMEM-F12.

Όταν η πυκνότητα της καλλιέργειας άγγιζε στο 50% το θρεπτικό μέσο αντικαθίστατο από οστεογενές επαγωγικό θρεπτικό μέσο (STEMPRO®, GIBCO). Τα κύτταρα επωζόταν σε οστεογενές μέσο, που ανανεωνόταν κάθε τρεις ημέρες, για τρεις εβδομάδες.

Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος ακολούθησε έκλυση των κυττάρων μονιμοποίηση με 10% φορμαλίνη (Sigma) και δυο διαφορετικές χρώσεις που

ανέδειξαν την εναπόθεση ασβεστίου και τη παρουσία αλκαλικής φωσφατάσης. Επίσης για την ταυτοποίηση της διαφοροποίησης ανιχνεύτηκαν γονίδια-μάρτυρες των οστεοβλαστών.

2.5.3. Χονδρογενής Διαφοροποίηση

Η χονδρογενής διαφοροποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συστήματος μικρομάζας κυττάρων. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια ανάπτυξης τους και μέσω φυγοκέντρωσης και εναιώρησης, σε κατάλληλο όγκο επαγωγικού χονδρογενούς μέσου (STEMPRO®, GIBCO), δημιουργήθηκαν μικρομάζες κυττάρων με συγκέντρωση $1,6 \times 10^7$.

Οι μικρομάζες κυττάρων επώαστηκαν σε συνθήκες υψηλής υγρασίας στους 37°C για περίπου μία ώρα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο με 5% CO_2 στους 37°C για είκοσι ημέρες. Προσθήκη θρεπτικού μέσου στο σύστημα των μικρομαζών πραγματοποιούνταν κάθε 2-3 ημέρες.

Μετά τις 20 ημέρες τα ιζήματα κυττάρων πλύθηκαν με αλατούχο φωσφορικό διάλυμα, PBS, και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης (Sigma). Χρώση πραγματοποιήθηκε για να αναδείξει την συσσώρευση πρωτεογλυκανών και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ταυτοποίηση γονιδίων μαρτύρων.

2.5.4. Νευρογενής Διαφοροποίηση

Τα MSCs έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα των άλλων γενετικών σειρών εκτός του μεσοδέρματος.

Η επαγωγή σε διαφοροποίηση των κυττάρων σε νευρικά ομοιάζοντα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 2-μερκαπτο-αιθανόλης. Συγκεκριμένα όταν η πυκνότητα της καλλιέργειας άγγιζε το 50% το πλήρες θρεπτικό μέσο αντικαθίσταντο με θρεπτικό μέσο DMEM-F12 ελεύθερου ορού το οποίο περιείχε συγκέντρωση 1mM 2-μερκάπτο-αιθανόλης για 24 ώρες και στη συνέχεια για άλλες 8 ώρες με συγκέντρωση 3mM 2-μερκάπτο-αιθανόλης (177).

Τα νευρικά κύτταρα ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά με χρώση Cresyl violet που ανέδειξε τα χαρακτηριστικά τους και έκφραση γονιδίου της νεστίνης (Nes) μάρτυρα αυτών των κυττάρων.

2.6 Χρώση των Κυττάρων

2.6.1 Crystal Violet

Τα κύτταρα στα διάφορα στάδια ανακαλλιέργειας χρωματίστηκαν με κρυσταλλικό ιώδες για να αναδειχθεί η μορφολογία τους.

Μέρος κυττάρων μετά από κάθε σταδιακή ανακαλλιέργεια τέθηκε εκ νέου σε καλλιέργεια υπό τις ίδιες συνθήκες και με τη χρήση ίδιου θρεπτικού μέσου (DMEM-F12 Sigma) σε ειδικές πλάκες μικροσκοπίου, Nunk Lab Teck II Chamber System (Nunk). Όταν τα κύτταρα έφτασαν σε σύγκλιση 80% σταθεροποιήθηκαν με ένα διάλυμα μεθανόλης (Sigma) και κρυσταλλικού ιώδες (Sigma) 5% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο με αντίθεση φάσης.

2.6.2 Oil Red O

Τα κύτταρα μετά την επαγωγή σε λιπογενή διαφοροποίηση, για 14 ημέρες, χρωματίστηκαν με Oil Red O (Sigma) χρωστική η οποία βάφει στα χρώματα του ερυθρού και αναδεικνύει τις λιπιδικές κύστες που συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

Στο τέλος της επαγωγής οι καλλιέργειες ξεπλύθηκαν απαλά δυο φορές με PBS και σταθεροποιήθηκαν με τη χρήση κρύας μεθανόλης (Sigma) για 10 λεπτά στους -20° C και στη συνέχεια χρωματίστηκαν με Oil Red O και Εοσύνη-Αιματοξυλίνη (Sigma) η οποία χρωματίζει τους πυρήνες των κυττάρων. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.

2.6.3 Nitro blue Tetrazolium & Alizarin red S

Μετά την επαγωγή των κυττάρων σε οστεογενή διαφοροποίηση τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δυο διαφορετικές χρώσεις. Η χρώση με διάλυμα νιτρικό-μπλε του τετραζολίου και Χ-φωσφορικό άλας (Nitro Blue tetrazolium & X-phosphate, Sigma) που αναδεικνύει τη δημιουργία δοκίδων με την εναπόθεση ασβεστίου. Η χρώση με κόκκινο S της αλιζαρίνης (Alizarin Red S, Sigma) αναδεικνύει την υψηλή έκφραση

της αλκαλικής φωσφατάσης. Τα κύτταρα πριν υποβληθούν στη διαδικασία χρώσης ξεπλύθηκαν δυο φορές με PBS και σταθεροποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλίνης για δέκα λεπτά. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της οστεογενούς διαφοροποίησης παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.

2.6.4 Alcian Blue

Η χονδρογενής διαφοροποίηση, μέσω του συστήματος καλλιέργειας μικρομαζών αναδεικνύεται από τη συσσώρευση θεικών πρωτεογλυκανών μέσω χρώσης με μπλε τη αλυσίνης (Alcian Blue, Sigma). Τα οζίδια-μικρομάζες κυττάρων, ξεπλύθηκαν απαλά δυο φορές με PBS και σταθεροποιήθηκαν με μεθανόλη για 10 λεπτά. Επακολούθησε χρώση με διάλυμα μπλε της αλυσίνης και επώαση για 30 λεπτά. Μέσω μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης παρατηρήθηκαν οι μορφολογικές αλλαγές της διαφοροποίησης.

2.6.5 Cresyl Violet

Τα νευρικά κύτταρα που προέκυψαν μετά την επαγωγή τους με 2-μερκαπτοαιθανόλης ξεπλύθηκαν δυο φορές με PBS και σταθεροποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλίνης 10%. Στη συνέχεια χρωματίστηκαν με 0.3% Cresyl Violet (Sigma) για 30 λεπτά ώστε να αναδειχθεί η χαρακτηριστική μορφολογία των νευρώνων.

2.7 Μοριακές Τεχνικές

2.7.1 Απομόνωση RNA

Όλες οι διαδικασίες απομόνωσης RNA πραγματοποιούνταν σε πάγο και όλα τα υλικά και πλαστικά εργαλεία, που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν επεξεργαστεί με διάλυμα DEPC για την αναστολή των ενζύμων που διασπούν το RNA και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με DNase I (Promega, UK) για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των δειγμάτων DNA.

Για τη διαδικασία εκχύλισης RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

Διάλυμα RLN+ για τη διάσπαση των κυττάρων το οποίο περιέχει:

NP40 (υδατικό διάλυμα 10% Igepal C-630) (Sigma)

VRC (Fluka)

MgCl₂ (Sigma)

Tris HCl, (Sigma)

NaCl και ddH₂O (Sigma)

Το συνολικό RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα σε καλλιέργεια σε κάθε πέρασμα με τη χρήση ειδικού kit (RNase Kit; Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Συνοπτικά, ίζημα κυττάρων σε συγκέντρωση κυττάρων 1×10^6 διαπερνάτε από στήλες με τη χρήση ειδικών διαλυμάτων που κατακρημνίζουν το κύτταρο και απελευθερώνουν το RNA.

Διαδικασία:

1. Προσθήκη διαλύματος RLN+ στο ίζημα των κυττάρων που προέκυψε μετά από φυγοκέντρηση σε αναλογία 200μl/ 10^6 κύτταρα για διάλυση αυτών και εκχύλιση του RNA
2. Παραμονή 5 λεπτών σε πάγο με ενδιάμεση ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex), ώστε να επιτευχθεί πολύ καλή ομογενοποίηση του μίγματος

3. Φυγοκέντρωση για 4 λεπτά στα 9000 rpm στους 4° C
4. Μεταφορά υπερκείμενης υδάτινης φάσης στην οποία περιέχεται το RNA και προσθήκη διαλύματος RLT (Qiagen) και απόλυτης αιθανόλης (Sigma)
5. Ανάδευση και διάχυση μέσω στήλης φίλτρου το οποίο δεσμεύει το RNA (Qiagen)
6. Φυγοκέντρωση της στήλης για 15 δευτερόλεπτα στα 10.000 rpm στους 4°C
7. Προσθήκη στη στήλη φίλτρου 700μl διαλύματος RW1
8. Φυγοκέντρωση της στήλης για 15 δευτερόλεπτα στα 10.000 rpm στους 4°C
9. Προσθήκη στη στήλη φίλτρου 500μl διαλύματος RPE
10. Φυγοκέντρωση της στήλης για 15 δευτερόλεπτα στα 10.000 rpm στους 4°C
11. Προσθήκη στη στήλη φίλτρου 500μl διαλύματος RPE
12. Φυγοκέντρωση της στήλης για 2 λεπτά στα 10.000 rpm στους 4° C
13. Φυγοκέντρωση της στήλης για 1 λεπτό στα 13.000 rpm στους 4° C
14. Προσθήκη νερού RNase Free
15. Φυγοκέντρωση της στήλης για 2 λεπτά στα 10.000 rpm στους 4° C
16. Συλλογή εναιωρήματος που προέκυψε από τη φυγοκέντρωση και διατήρηση στους – 80° C.

2.7.2 Ποσοτικός και Ποιοτικός Έλεγχος RNA

Φωτομέτρηση

Η συνολική ποσότητα και η ποιότητα του RNA καθορίστηκε σπεκτροφωτομετρικά στα 260 και 280nm, ενώ η ακεραιότητα αξιολογήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση

Ο έλεγχος ποιότητας του δείγματος RNA πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%.

2.7.3 Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Αντίστροφη Μεταγραφή

Η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε μέσω αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random examers, 500μg/ml). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την μεταγραφή M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl, Invitrogen UK). Στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν επίσης ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης, 5X RT buffer και νουκλεοτίδια dNTPs 10mM (Invitrogen, UK) (Πίνακας 3)

Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 1μg του συνολικού RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα μεταγράφηκε αντίστροφα σε single-standed cDNA σε 20μl μίγματος αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (Invitrogen) και oligo-(dT) εξαμερής εκκινητές και προσθήκη νερού, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε επώαση στους 65°]C για 10 λεπτά με σκοπό την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών. Κατόπιν το διάλυμα διατηρήθηκε στον πάγο για 5 λεπτά.

Υπόστρωμα	Όγκοι (μl)
RNA	1 μg = x μl
ddH ₂ O	20-(8+x)
Αντιδραστήρια	
RT buffer 5x	4
Εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (500μg/ml)	1
dNTPs (10mM)	2
M-MLV RT (200U/μl)	1
Συνολικός όγκος	20

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια για τη σύνθεση cDNA

Μετά και τη προσθήκη των λοιπών αντιδραστηρίων, ακολούθησε η αντίδραση σύνθεσης του cDNA, με επώαση στους

1. 37° C για 60 λεπτά
2. 94° C για 2 λεπτά
3. Φύλαξή στους 4°C

Η επιτυχία της σύνθεσης του cDNA αξιολογήθηκε μέσω PCR αντίδρασης χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*.

2.7.4 Σχεδιασμός Εκκινητών Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Ειδικοί εκκινητές γονιδίων σχεδιάστηκαν για το *GAPDH*, γονίδιο αναφοράς και για τα γονίδια υπό έλεγχο (πίνακας 4), βασιζόμενοι στην αλληλουχία του mRNA όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων των αλληλουχιών του NCBI

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Primers Express της Applied Biosystems. Προκειμένου να αποφευχθεί ενίσχυση του γενωμικού DNA, οι παραπάνω εκκινητές επιλέχθηκαν να περιλαμβάνουν τουλάχιστον δυο εξόνια.

<i>Primer</i>	nucleotide sequence	Product size, bp	Anneal o C
<i>GAPDH</i>	F: 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3'	107	56 ° C
	R: 5'-GGG TCA TTG ATG GCA ACA ATA TC-3'		
<i>POU5F1 (Oct4)</i>	F:5'-CCTCACTTCACTGCACTGTACTCCT-3'	134	55 ° C
	R: 5'-CCCTGTCCCCCATTCCTAGA-3'		
<i>Nanog</i>	F:5'-CTCCTCCCATCCCTCATAGGAT-3'	113	55 ° C
	R:5'-GCTGATTAGGCTCCAACCATACTC-3'		
<i>ZFP42 (Rex1)</i>	F: 5'-AATCGCTTGTCTCAGAGTGGA-3'	130	56 ° C
	R: 5'-TGAGCTCTCAACGAACGCTTTC-3'		
<i>Sox2</i>	F: 5'- GGAGAAAACCCGGTACGCTCA-3'	165	57 ° C
	R: 5'- CCCAAAAAGAAGTCCAGGATCTCT-3'		
<i>Gata4</i>	F: 5'-GTCGACAATCTGGTTAGGGGAA-3'	179	55 ° C
	R: 5'-CCACGGTCTAGGCCACAGT-3'		
<i>Nestin</i>	F: 5'-GCTGAGGAGGATGTACCACCAGT-3'	184	56 ° C
	R: 5'-TCTCCCCAGAACCCAACTCCT-3'		
<i>PPARγ2</i>	F: 5'-GGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGT-3'	265	63 ° C
	R : 5'-TAGCTGCACGTGTTCCGTGACAAT-3'		
<i>SPPI</i>	F: 5'-ATGGCCGAGGTGATAGTGTGGT-3'	264	62 ° C
	R: 5'-ATCTGGACTGCTTGTGGCTGTG-3'		
<i>SOX9</i>	F: 5'-CACCAGCAGTTAACCTTCAAGACA-3'	171	60 ° C
	R: 5'-ATTTAACAACAGATGACCATACCCTT-3'		

Πίνακας 4: Αλληλουχία Εκκινητών

2.7.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας 1μl cDNA, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,5μM εκκινητές, 1,25U ένζυμο Taq DNA πολυμεράσης (Invitrogen) και 5x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Invitrogen) σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl και επωάστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή Bio-Rad MJ Mini.

Αντιδραστήρια	Όγκοι (μl)/Συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα	cDNA: 1μl
PCR BUFFER	5μl
dNTPs	1μl
MgCl ₂	1.5μl
Forward Primers	0.5μl
Reversed Primers	0.5μl
Taq DNA Polymerase	0.25μl
Συνολικός όγκος	50μl

Πίνακα 5: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την ενίσχυση των γονιδίων μέσω PCR αντίδρασης

Για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα περιλαμβανόταν ένα σωληνάριο, που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός του υποστρώματος (negative control).

Οι βέλτιστες συνθήκες PCR- κυκλοποίησης για κάθε ζεύγος εκκινητών για κάθε αντίδραση ενίσχυσης ήταν κοινές εκτός από τη θερμοκρασία στο στάδιο σύνδεσης των εκκινητών (annealing), η οποία διέφερε σε κάθε ζεύγος εκκινητών.

Τα στάδια της αντίδρασης PCR και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες ήταν οι ακόλουθες:

- Αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 3 λεπτά
- Κυρίως αντίδραση διεξάγεται σε 32-40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

Φάση αποδιάταξης στους 94° C για 30 δευτερόλεπτα,

Φάση σύνδεσης εκκινητών (annealing) στους 55-60° C για 30 δευτερόλεπτα

Φάση επέκτασης (σύνθεση μορίων DNA) στους 72° C για 1 λεπτό

- Τελική σύνθεση μορίων DNA, επέκταση: στους 72° C για 10 λεπτά.

Το αποτέλεσμα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών, που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων, τα οποία εκφράζονται σταθερά στον υπό ανάλυση κυτταρικό τύπο (γονίδιο αναφοράς). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο *GAPDH* το οποίο αποτέλεσε το θετικό μάρτυρα για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA.

2.7.6. Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτώματα Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί τη συνήθη απλή μέθοδο διαχωρισμού ταυτοποίησης τμημάτων DNA μεγέθους 0.1-60Kb.

Στο πήκτωμα αγαρόζης οι ζώνες του DNA, RNA και των προϊόντων της PCR ανιχνεύονται με τη προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (Scharlau) σε χαμηλή συγκέντρωση. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια φθορίζουσα ουσία, που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και του RNA και έτσι επιτρέπει την ανίχνευση ποσοτήτων DNA και RNA (μέχρι και 1ng), όταν το πήκτωμα εκτεθεί στο υπεριώδες φως.

Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δίκλωνων και μονόκλωνων μορίων νουκλεϊκών οξέων, και μπορεί είτε να υπάρχει στο πήκτωμα αγαρόζης σε συγκέντρωση 0.5mg/ml είτε να προστεθεί ως χρωστική στο τέλος της ηλεκτροφόρησης.

Υλικά:

- Αγαρόζη (Invitrogen UK): η ποσότητα που προστίθεται εξαρτάται από την περιεκτικότητα που θέλουμε να έχει το πήκτωμα. Ο έλεγχος ποιότητας του δείγματος RNA πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% και όμοιοι όγκοι των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης.
- Βρωμιούχο αιθίδιο 0.5mg/ml (Sigma-Aldrich)
- 10X TBE: 106g/l Tris (Sigma-Aldrich)
55g/l Βορικό οξύ (Sigma-Aldrich)
9.3g/l EDTA (Invitrogen, UK)

Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται διάλυμα 1X TBE

- Διάλυμα φόρτωσης 2X (loading Buffer): 2,25g EDTA (Invitrogen, UK)
10% γλυκερίνη (Sigma-Aldrich)
0,1 % bromophenol blue (Invitrogen, UK)
10mM Tris (Invitrogen, UK)

Φωτογράφιση του πηκτώματος

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζονταν με το μηχάνημα E-Gel® Imager System with UV Light Base

Μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους (DNA ladder), (Sigma-Aldrich) οι οποίοι ηλεκτροφορήθηκαν μαζί με τα προς εξέταση δείγματα.

2.7.7 Φωτομετρικός Προσδιορισμός Συγκέντρωσης των Νουκλεϊκών Οξέων

Για να προσδιοριστεί η ακριβής συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική (φασματοσκοπική) μέθοδος απορρόφησης του υπεριώδους φωτός. Τα νουκλεϊκά οξέα, λόγω των αζωτούχων βάσεων που περιέχουν, απορροφούν το υπεριώδες φως δίνοντας χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης με μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 260 και 280nm. Έχει υπολογισθεί ότι μία μονάδα απορρόφησης στα 260nm αντιστοιχεί σε: 50μg/ml δίκλωνου DNA, 40μg/ml RNA και 33μg/ml μονόκλωνου DNA.

Το κλάσμα των τιμών απορρόφησης στα 260nm και στα 280nm (A_{260}/A_{280}) παρέχει μια εκτίμηση καθαρότητας του διαλύματος του νουκλεϊκού οξέος. Για το λόγο αυτό, ο λόγος A_{260}/A_{280} πρέπει να κυμαίνεται 1.7-1.9.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

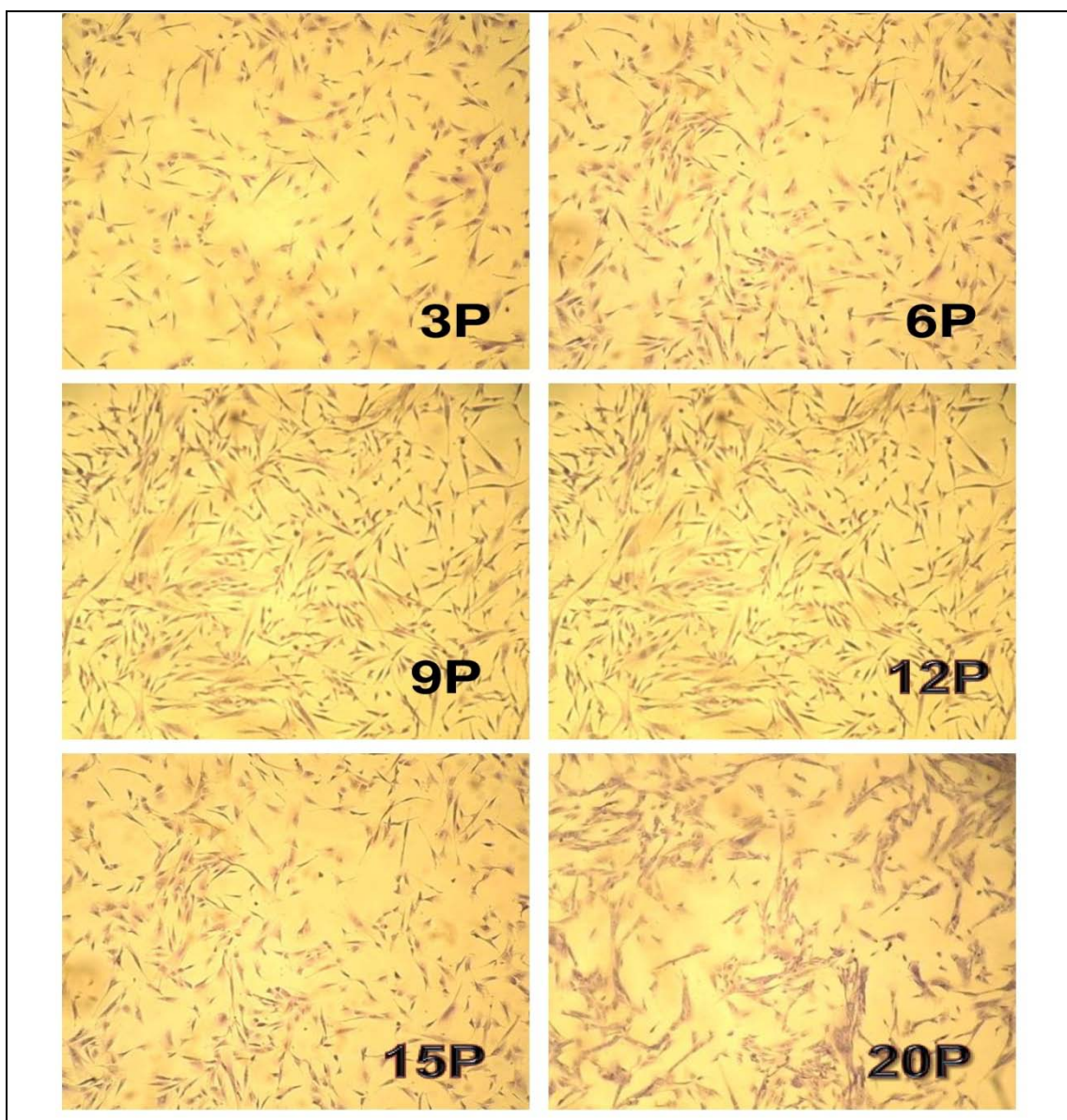
3.1 Καλλιέργεια Κυττάρων

Η καθιέρωση ενός υποσυρρέοντα πληθυσμού κυττάρων με πυκνότητα 70-80%, επιτυγχάνεται σε διάστημα τριών-τεσσάρων εβδομάδων από τη αρχική πρωτογενή καλλιέργεια. Τα κύτταρα με την επίδραση θρυψίνης αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια καλλιέργειας και επανακαλλιεργήθηκαν σε αναλογία 1 προς 3 χωρίς μέτρηση αυτών.

Η πρωτοταγής καλλιέργεια των λαχνικών χοριακών κυττάρων αποτελεί ένα ετερογενή πληθυσμό κυττάρων με κύτταρα μεγάλου-επίπεδου σχήματος και κύτταρα ομοιάζοντα σε ινοβλάστες. Ομοιογενής πληθυσμός κυττάρων με τη χαρακτηριστική μορφολογία ατρακτοειδούς σχήματος, αναπτυσσόμενα επικολλημένα σε πλαστική επιφάνεια, προέκυψαν μετά από δυο συνεχείς θρυψινοποιήσεις και επακόλουθες υποκαλλιέργειες. Τα ινοβλαστικά ομοιάζοντα κύτταρα γίνονται επικρατέστερα και αυτός ο πληθυσμός, ο οποίος δεν μπορεί να διαχωριστεί μορφολογικά από τα MSCs προερχόμενα από το μυελό των οστών, είναι εύκολα πολλαπλασιαζόμενός *in vitro* για τουλάχιστον είκοσι ανακαλλιέργειες, 120 ημέρες καλλιέργειας, χωρίς κάποια εμφανή τροποποίηση. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες απεικονίζονται στην Εικόνα 14.

3.1.1 Μορφολογία

Ένα εκ των χαρακτηριστικών των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων είναι η μορφολογία τους. Αυτά τα κύτταρα προερχόμενα από τις διάφορες πηγές τόσο ενηλίκων ιστών όσο και των εξωεμβρυϊκών εμφανίζουν ατρακτοειδές επίμηκες σχήμα. Η χρώση με ιωδιούχο κρυσταλλικό διάλυμα ανέδειξε αυτή τη μορφολογία τους η οποία παρέμεινε αναλλοίωτη στη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων ανακαλλιεργειών. Μόνο κατά τη τελευταία ανακαλλιέργεια όταν αρχίζει ο γηρασμός των κυττάρων και παύουν να διαιρούνται, αλλάζει το σχήμα τους και χάνουν το επίμηκες σχήμα τους.



Εικόνα 14: Μορφολογία κυττάρων κατά τη διάρκεια παρατεταμένων χρονικά καλλιεργειών (P: passage)

3.1.2.Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός

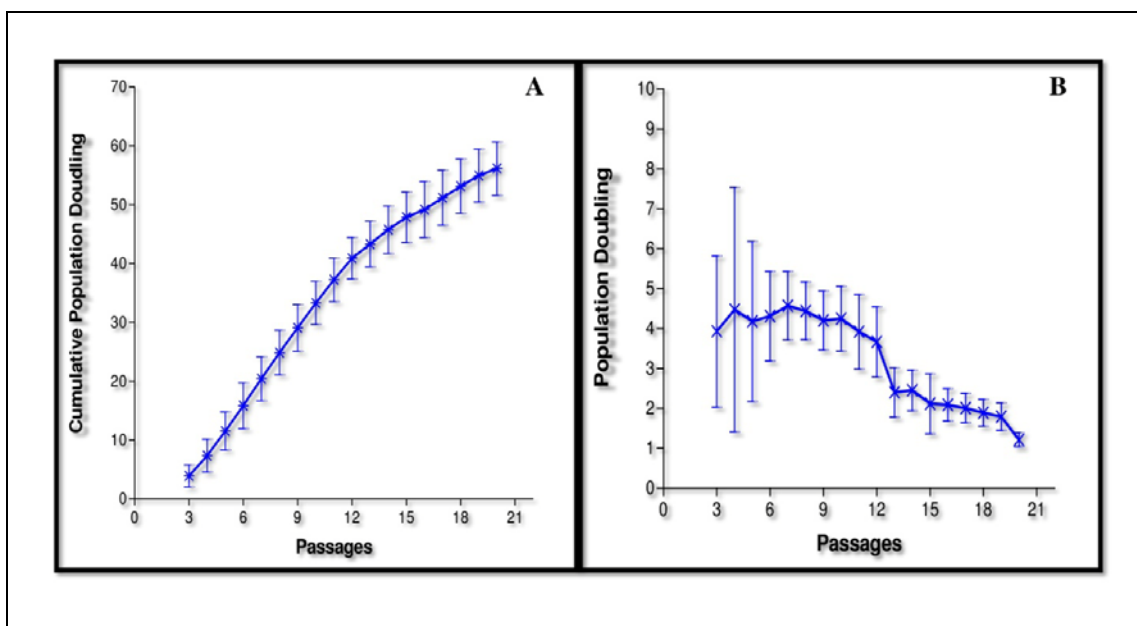
Ο κυτταρικός διπλασιασμός των κυττάρων υπό καλλιέργεια υπολογίστηκε από την τρίτη ανακαλλιέργεια και μετά, όταν πλέον είχε σταθεροποιηθεί ένας ομοιογενής, ινοβλαστικής μορφολογίας κυτταρικός πληθυσμός.

Τα χοριακά λαχνικά κύτταρα επιτυγχάνουν ένα ρυθμό πολλαπλασιασμού της τάξης 56.12 ± 4.51 , σωρευτικό (cumulative) πληθυσμιακό διπλασιασμό (σε λογαριθμική κλίμακα $\log_s 26.84 \pm 1.89$) σε 120 ημέρες, στην εικοστή ανακαλλιέργεια. Ο ρυθμός ανάπτυξης αυτών των κυττάρων παραμένει σταθερός στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (3^η έως 7^η ανακαλλιέργεια) αλλά και κατά την 8^η έως τη 12^η ανακαλλιέργεια. Σε αυτά τα στάδια ο κυτταρικός διπλασιασμός είναι αντίστοιχα 4.08 ± 1.55 ($\log_s 1.91 \pm 0.61$) και 4.09 ± 0.83 ($\log_s 2.00 \pm 0.31$).

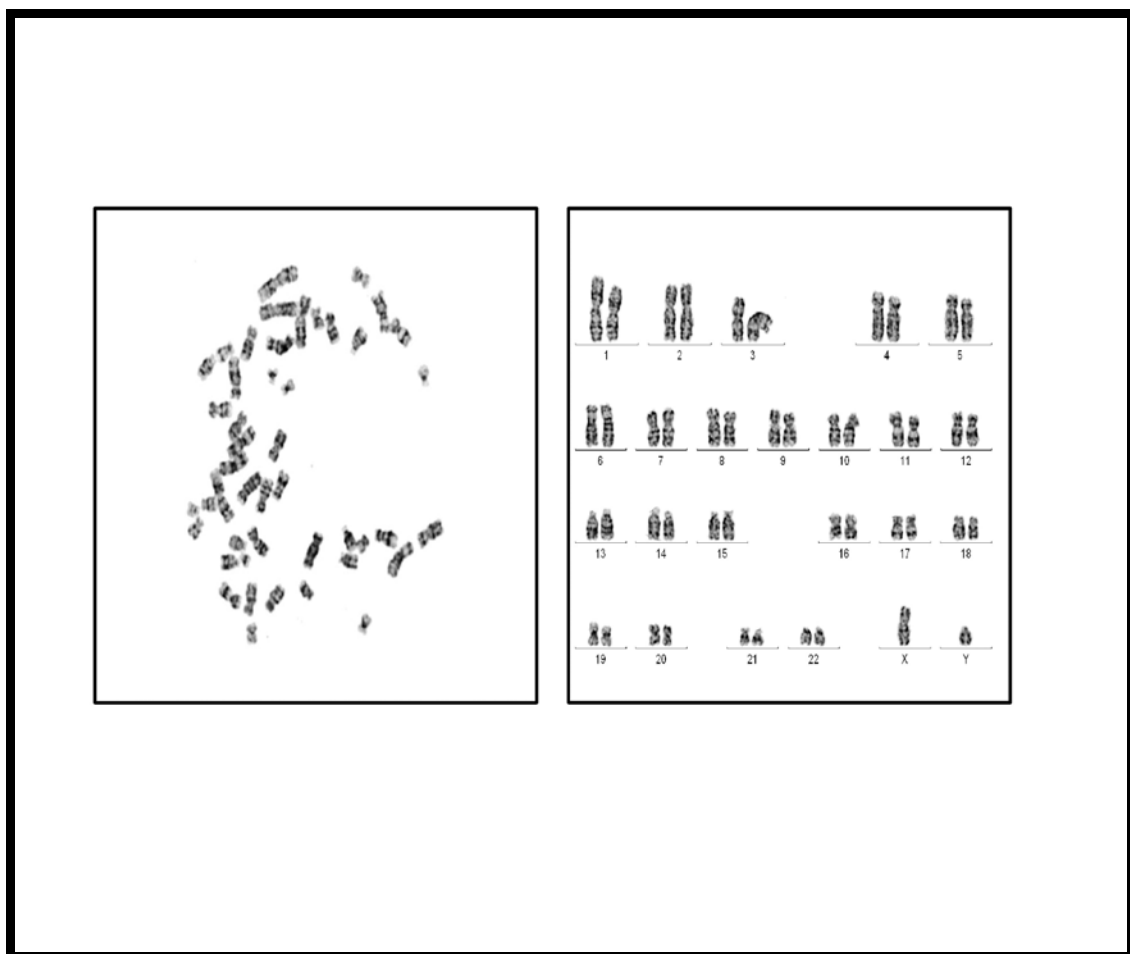
Στατιστικά σημαντική διαφορά στον κυτταρικό διπλασιασμό παρατηρήθηκε στα μεταγενέστερα και τελικά στάδια της καλλιέργειας, μεταξύ 13^η-17^η και 18^η-20^η ανακαλλιέργειας, συγκρινόμενα με τα πρώιμα και ενδιάμεσα στάδια. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού αντιστοιχούσε στο 2.28 ± 0.6 ($\log_s 1.14 \pm 0.4$) για τα μεταγενέστερα στάδια και στο 1.72 ± 0.42 ($\log_s 0.74 \pm 0.37$) για τα τελικά στάδια ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται στις γραφικές παραστάσεις που απεικονίζονται στην Εικόνα 15.

3.2 Καρυότυπος

Ένας μέσος όρος 25 μεταφάσεων αναλύθηκε σε επίπεδο 300-400 μπάντες σε κάθε περίπτωση, κατά το 6^ο, 12^ο και 18^ο πέρασμα καλλιέργειας και τα κύτταρα επέδειξαν φυσιολογικό καρυότυπο. Σε όλα τα κύτταρα υπό έλεγχο δεν βρέθηκαν δομικές ή αριθμητικές ανωμαλίες (Εικόνα. 16).



Εικόνα 15: Α:Συνολικός κυτταρικός πληθυσμιακός διπλασιασμός,
Β: Ρυθμός κυτταρικού ανά σταδιακή ανακαλλιέργεια



Εικόνα 16: Ανάλυση Καρυοτύπου

3.3 Ανοσοφαινότυπος

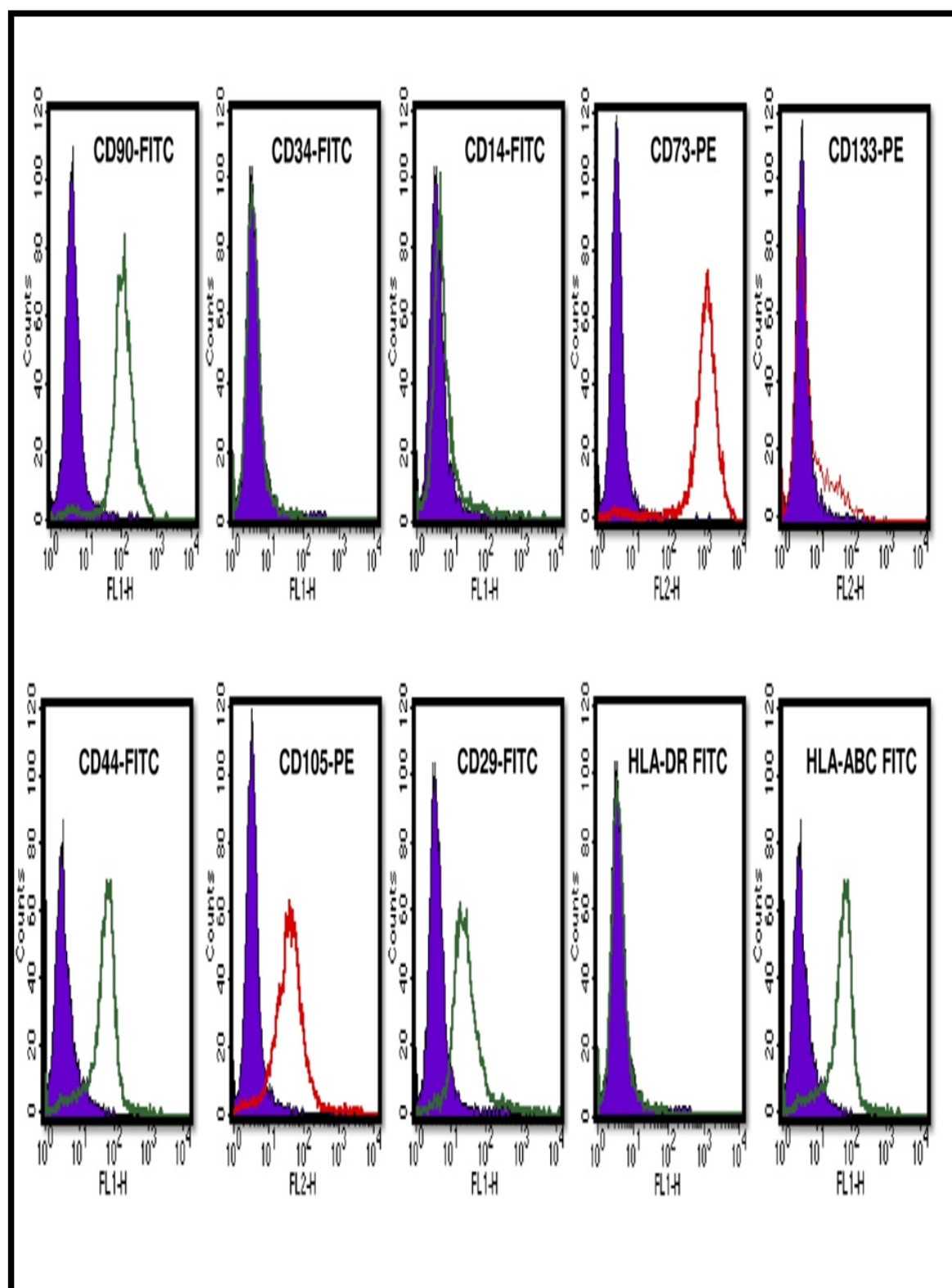
Η έκφραση των αντιγόνων επιφανείας των χορικών λαχνικών κυττάρων αξιολογήθηκε από το πρώτο έως και το δεκατοένατο πέρασμα μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα κύτταρα παρουσιάζουν ένα μορφολογικά ομοιογενή ινοβλαστοειδή πληθυσμό μετά την τρίτη ανακαλλιέργεια καθώς επίσης και η ανοσοφαινοτυπική ομοιογένεια παρουσιάζεται μετά την τρίτη ανακαλλιέργεια.

Τα κύτταρα υπό καλλιέργεια ήταν θετικά, σε ποσοστό που ξεπερνούσε το 90%, για τα αντιγόνα επιφανείας *CD90* (*Thy-1*), *CD105* (*SH2; endogrin*) και *CD73* (*SH3/4*). Αυτή η θετική αντιγονικότητα σε υψηλά ποσοστά (>90%) διατηρήθηκε σταθερή και μόνο κατά το 19^ο και τελευταίο πέρασμα παρατηρήθηκε μείωση στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) στο 84.24% για το αντιγόνο *CD73*. Για τα αντιγόνα *CD90* και *CD105* τα ποσοστά έκφρασης κυμαινόταν πάνω από 9 % μέχρι τη δέκατηπεμπτη ανακαλλιέργεια. Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε για το *CD105* μετά το δέκατοεβδομο πέρασμα, το ποσοστό μειώθηκε στο 81.44% ($p < 0.05$).

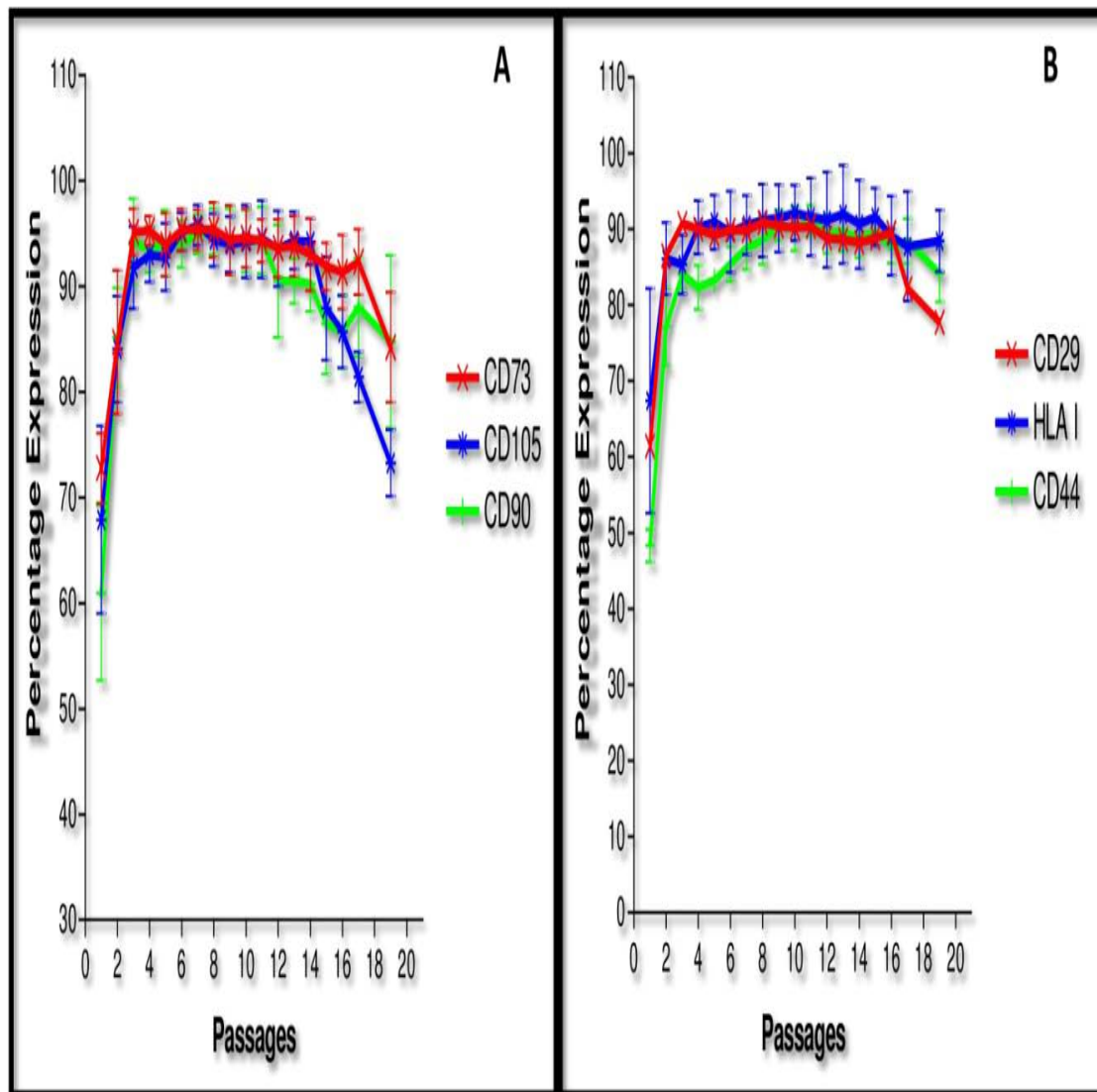
Σε ότι αφορά την έκφραση των αντιγόνων *CD44* (υαλουρονικός υποδοχέας), *CD29* (ιντεγκρίνη β1) και *HBL-ABC* (*MHC I*), η έκφραση κυμαινόταν πάνω από 80% και καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Σε αντίθεση, η έκφραση για το *CD14* (αντιγόνο διαφοροποίησης των μονοπύρηνων), *CD34* (αντιγόνο αιμοποιητικών πρόδρομων κυττάρων), *AC133* (μάρτυρας ενδοθηλιακών πρόδρομων κυττάρων) και *HLA-DR* (*MHC II*) δεν ξεπέρασε το ποσοστό του 2% σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Απεικονιστικά διαγράμματα των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής παρουσιάζονται στην Εικόνα 17 και η στατιστική ανάλυση με γραφικές παραστάσεις στην Εικόνα 18.



Εικόνα 17: Διαγράμματα έκφρασης αντιγόνων επιφανείας



Εικόνα 18: Διαγράμματα μεταβολής της έκφρασης των αντιγόνων επιφανείας στη διάρκεια των παρατεταμένων χρονικά ανακαλλιιεργειών

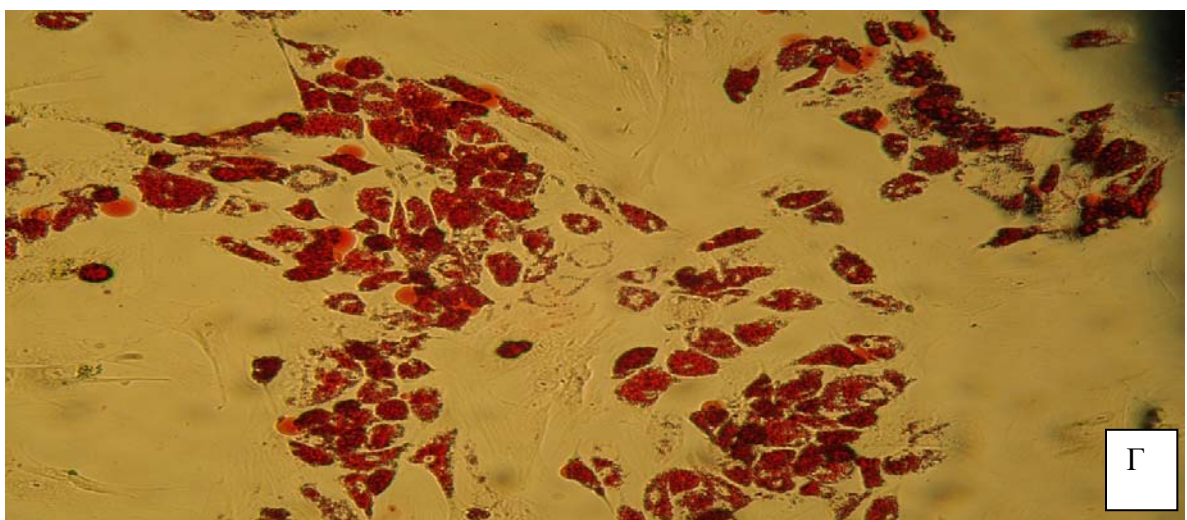
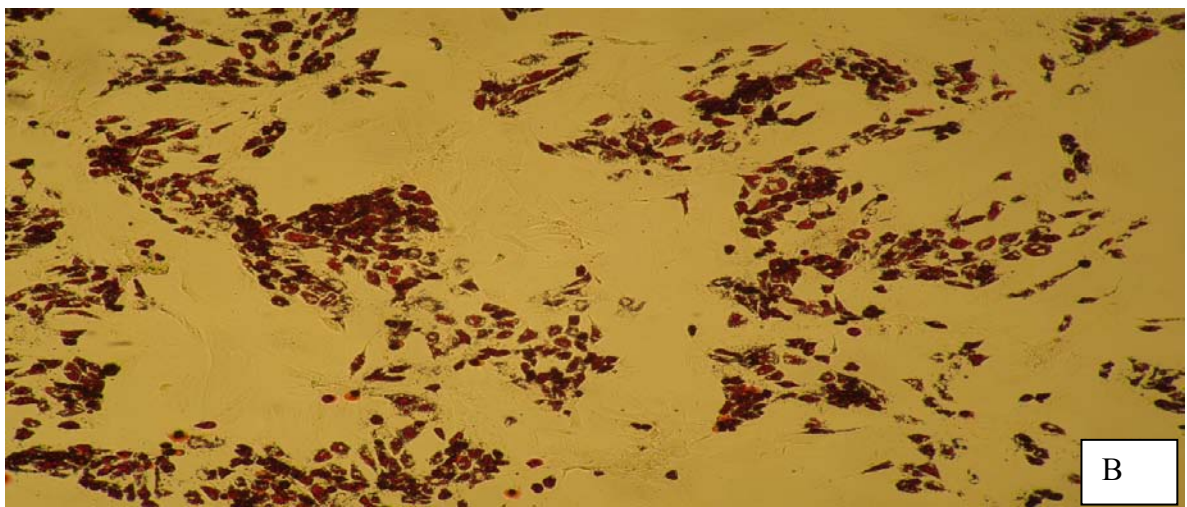
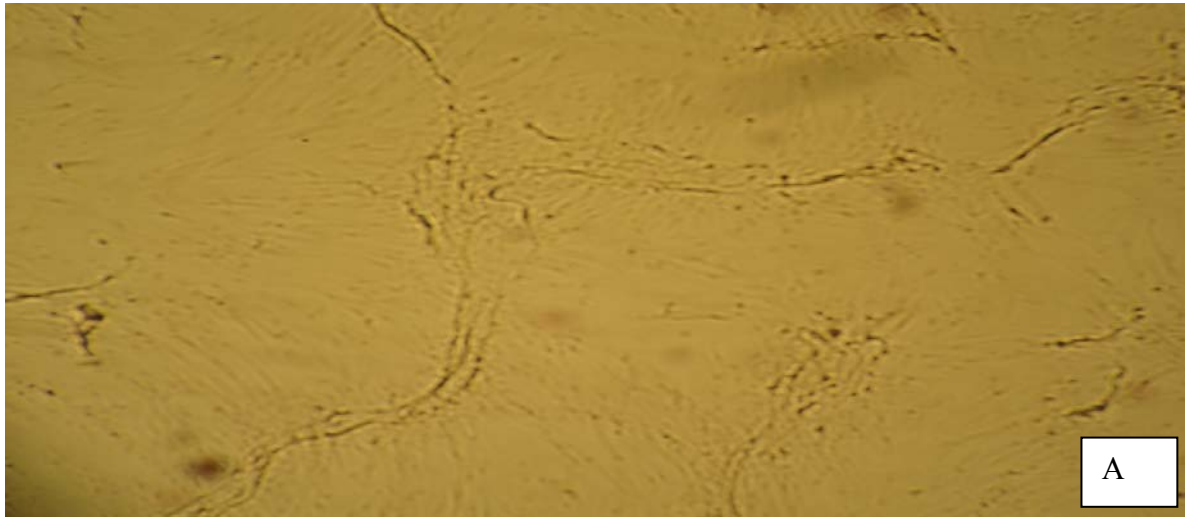
3.4 Διαφοροποιητική Ικανότητα

3.4.1 Λιπογενής Διαφοροποίηση

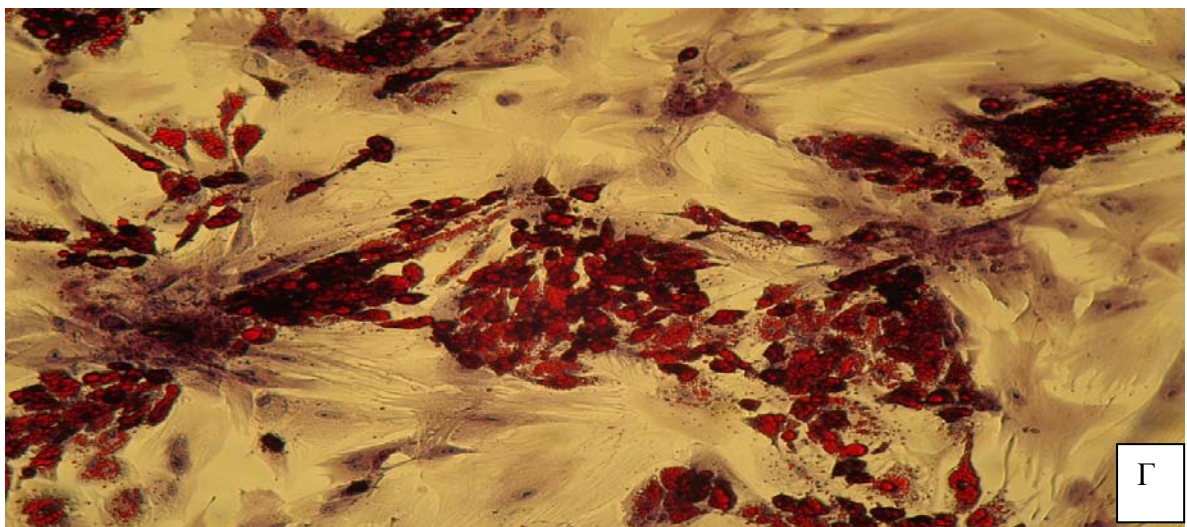
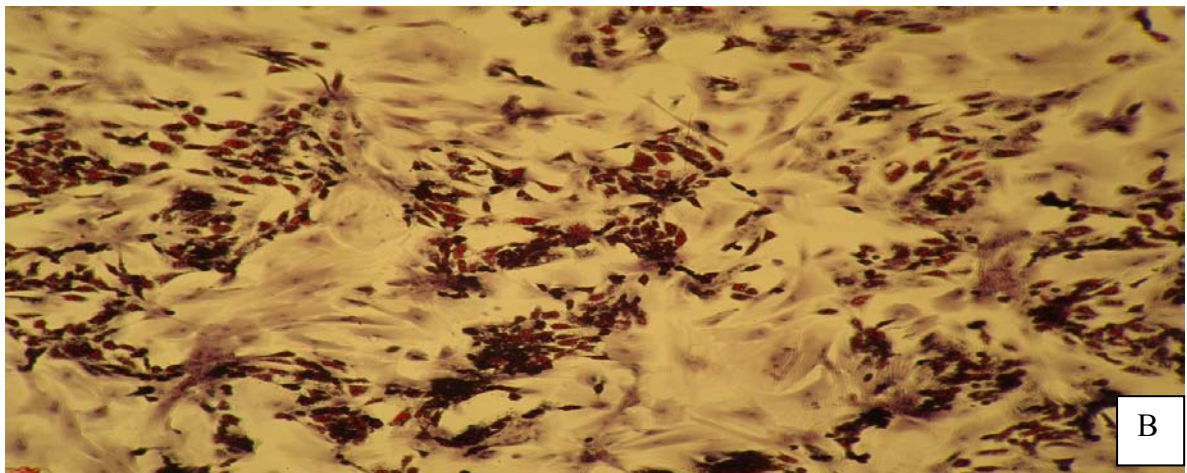
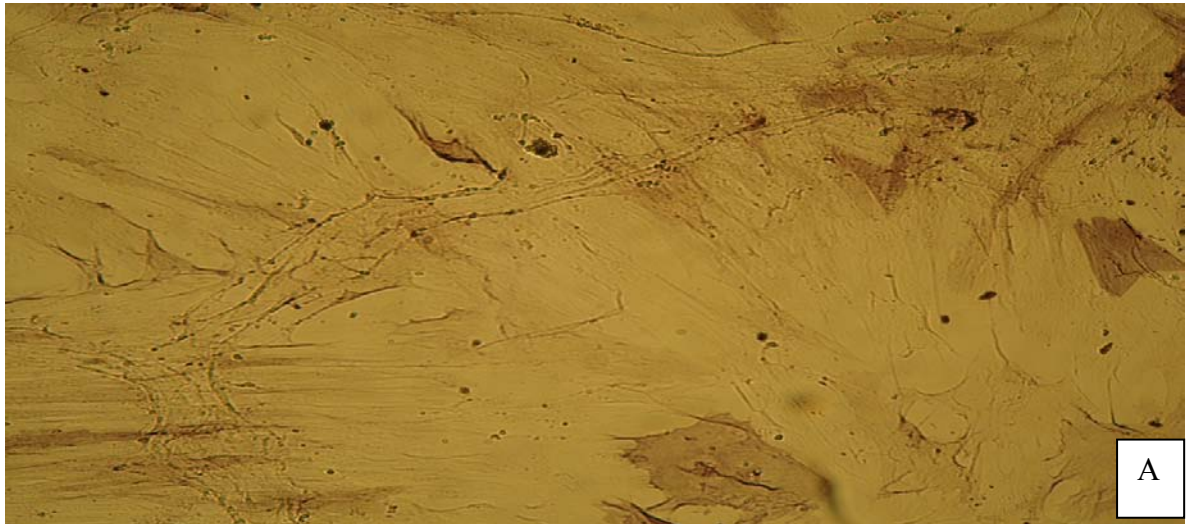
Τα λαχνικά προερχόμενα κύτταρα είχαν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα λιπογενούς, οστεογενούς και χονδρογενούς σειράς.

Η λιπογενής διαφοροποίηση αποδεικνύεται μέσω της συσσώρευσης λιπιδικών κύστεων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων υπό διαφοροποίηση. Από την πρώτη εβδομάδα της επαγωγής παρουσιάστηκαν μικρές λιπιδικές κύστεις στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Στο τέλος των δύο εβδομάδων επαγωγής τα σημάδια διαφοροποίησης ήταν πλέον εμφανή. Η παρουσία πολλαπλών λιπιδικών κύστεων αναδείχθηκε μέσω χρώσης με Oil Red O καθώς επίσης και αιματοξυλίνης που χρωματίζει τον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 19 & 20).

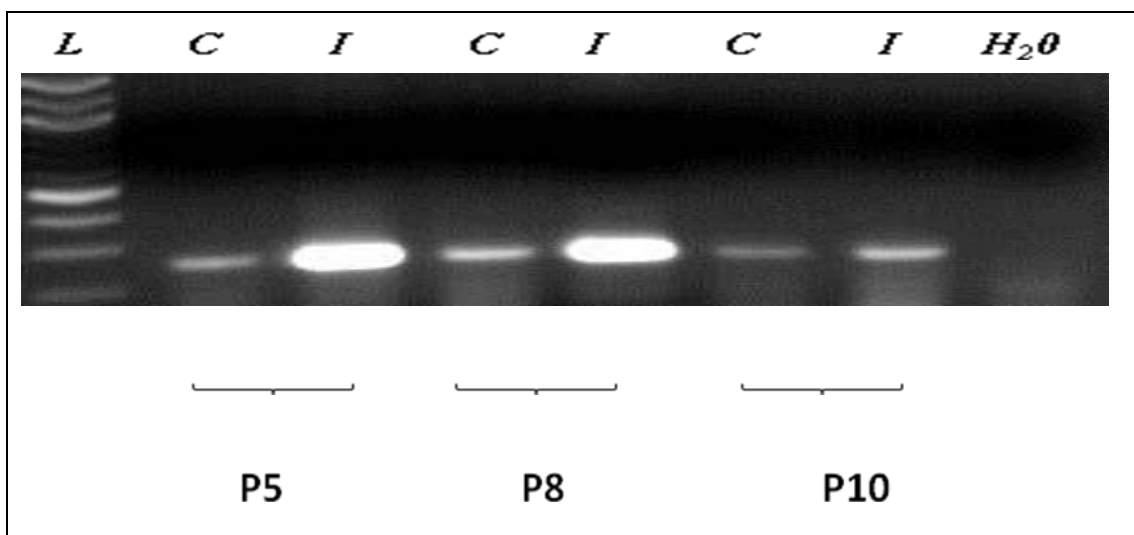
Η διαφοροποίηση των κυττάρων σε λιποκύτταρα επιβεβαιώθηκε με την ανάδειξη έκφρασης του γονιδίου μάρτυρα των λιποκυττάρων *PPARγ2*, μέσω αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία (Εικόνα 21).



Εικόνα 19: Διαφοροποίηση χοριακών λαχνικών κυττάρων σε λιποκύτταρα A: Μη διαφοροποιημένα κύτταρα control, B & Γ: Κύτταρα διαφοροποιημένα σε λιποκύτταρα όπως αποδεικνύεται, μέσω χρώσης με Oil Red O, η παρουσία λιπιδικών κύστεων



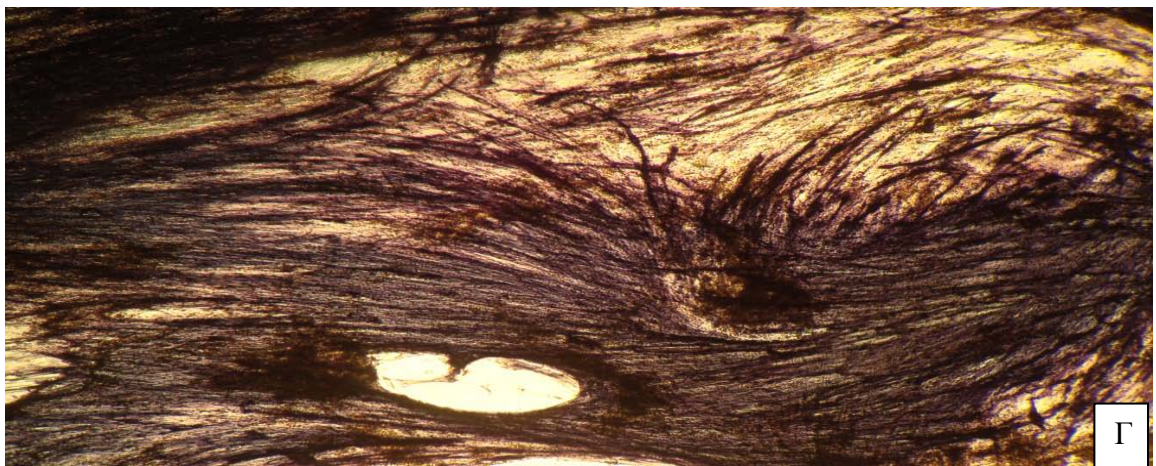
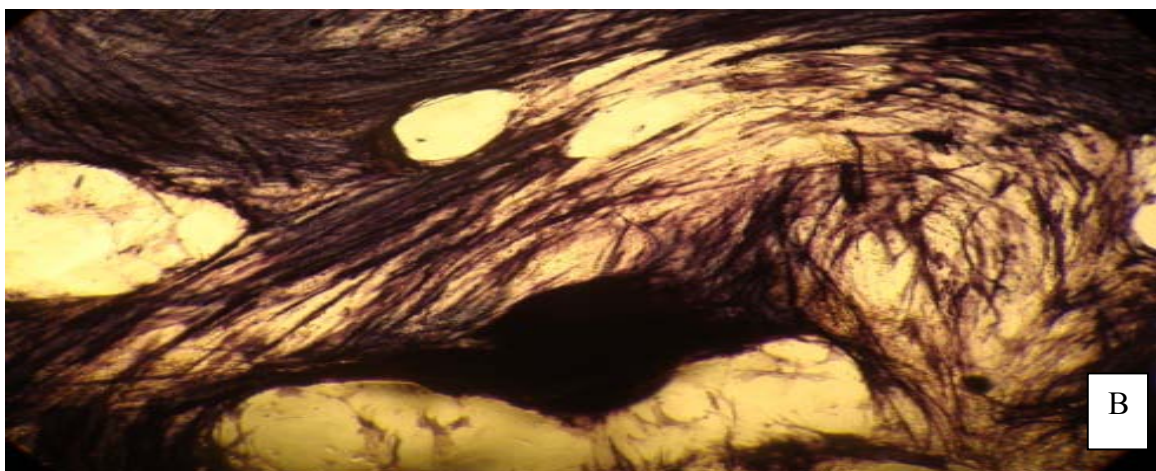
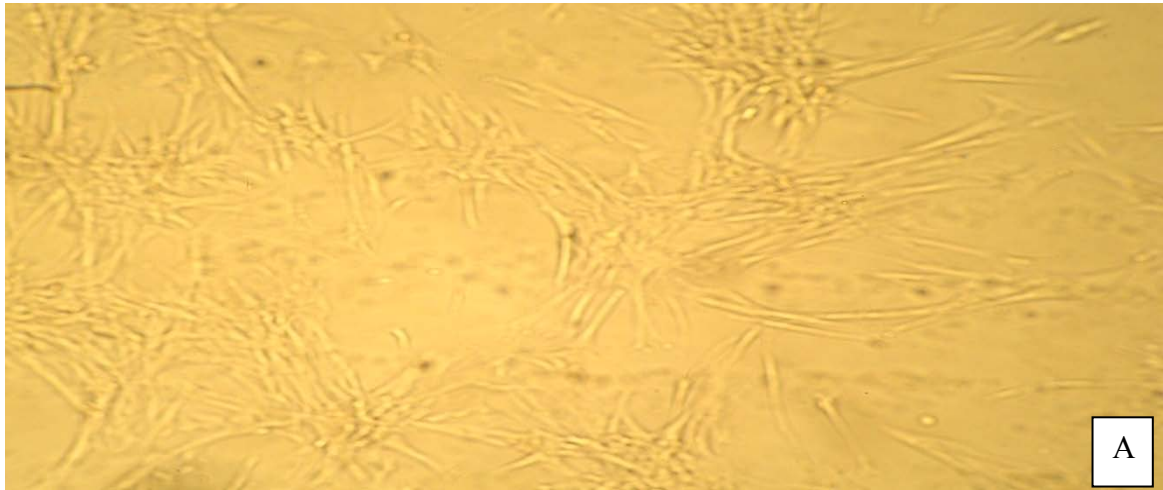
Εικόνα 20: Διαφοροποίηση χοριακών λαχνικών κυττάρων σε λιποκύτταρα A: Μη διαφοροποιημένα κύτταρα control, B & Γ: Κύτταρα διαφοροποιημένα σε λιποκύτταρα όπως αποδεικνύεται, μέσω χρώσης με Oil Red O, η παρουσία λιπιδικών κύστεων και χρώσης αιματοξυλίνης που χρωματίζει τους πυρήνες



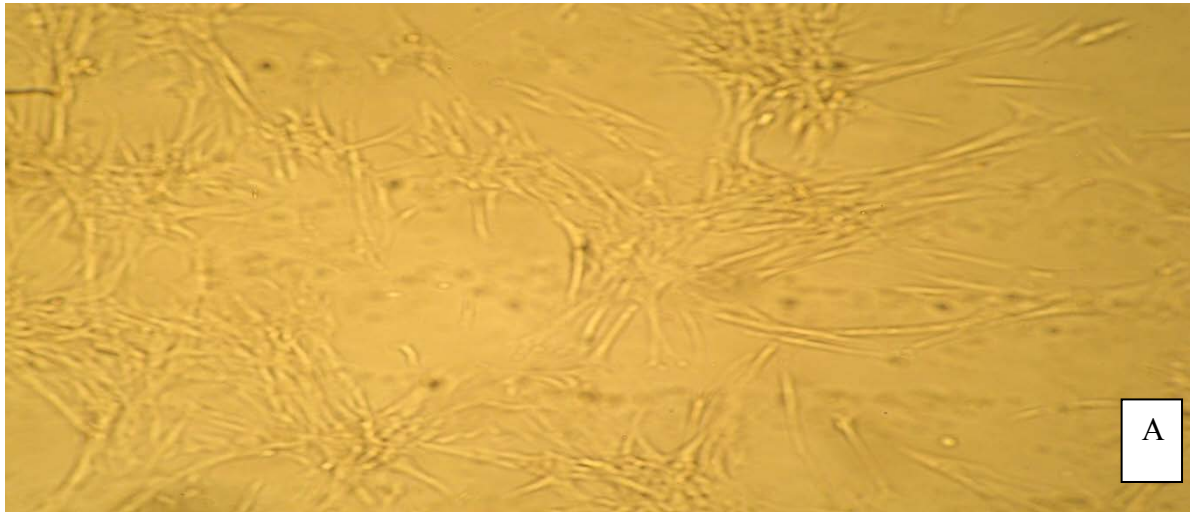
Εικόνα 21: Λιπογενής διαφοροποίηση, έκφραση γονιδίου *PPARγ2*: 265bp κατά την 5^η, 8^η και 10^η ανακαλλιέργεια

3.4.2.Οστεογενής Διαφοροποίηση

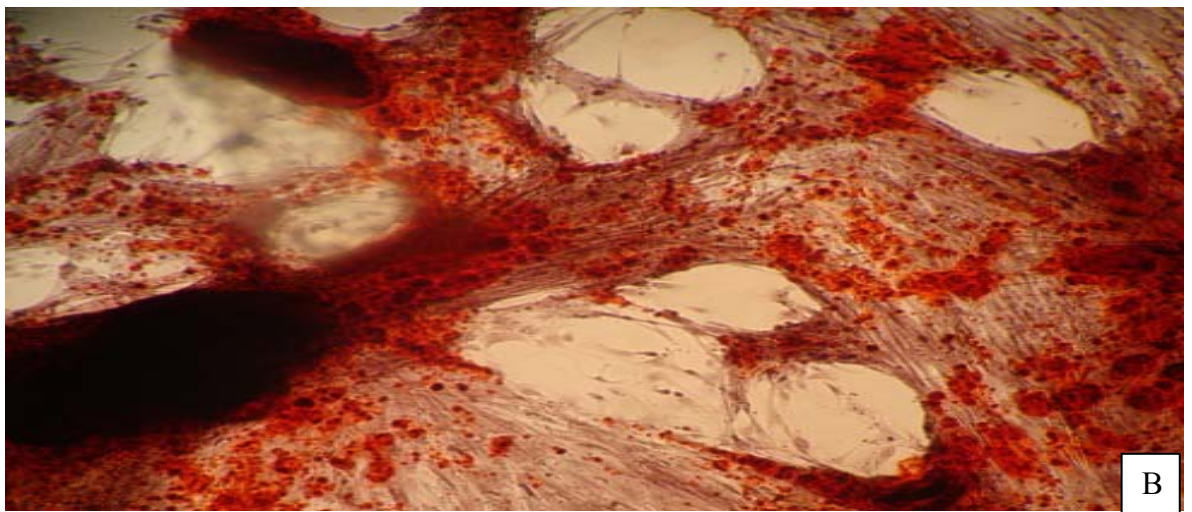
Τα χοριακά λαχνικά κύτταρα είχαν επίσης την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες υπό κατάλληλη επαγωγή. Κατά τη διάρκεια της επαγωγής παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές από το σχηματισμό δοκίδων με εναπόθεση ασβεστίου και αυξημένη έκφραση αλκαλικής φωσφατάσης, όπως καθορίζεται από τη χρώση με κυανό-μπλέ του τετραζολίου και Χ-φωσφορικό άλας καθώς και με τη χρώση κόκκινου της Αλυσίνης. (Εικόνα 22 & 23).



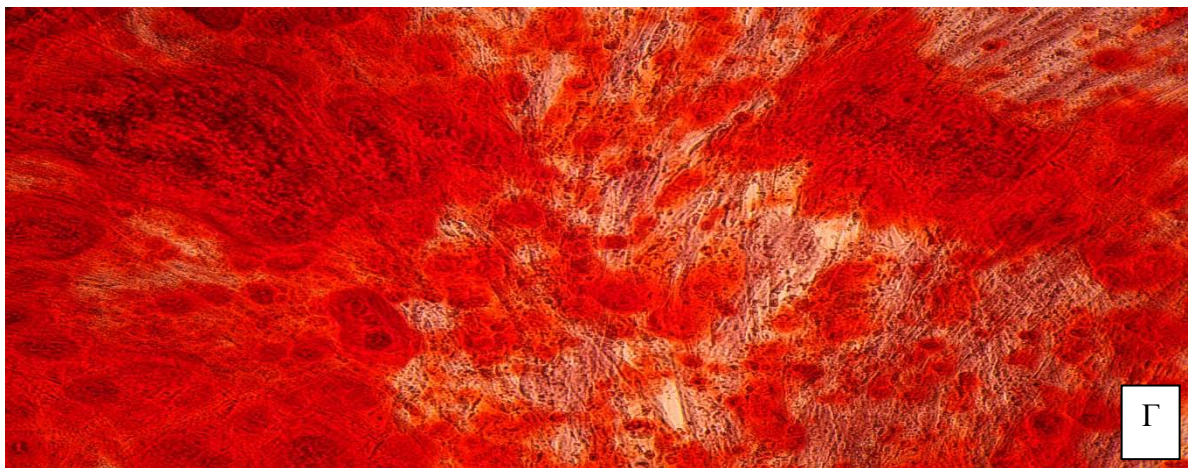
Εικόνα.22: Κύτταρα διαφοροποιημένα σε οστεοβλάστες, A: control, κύτταρα μη διαφοροποιημένα και κύτταρα διαφοροποιημένα σε οστεοκυτταρική σειρά, B, Γ: χρώση με nitro blue and X fosfate που αποδεικνύει την εναπόθεση ασβεστίου και αλκαλικής φωσφατάσης.



A



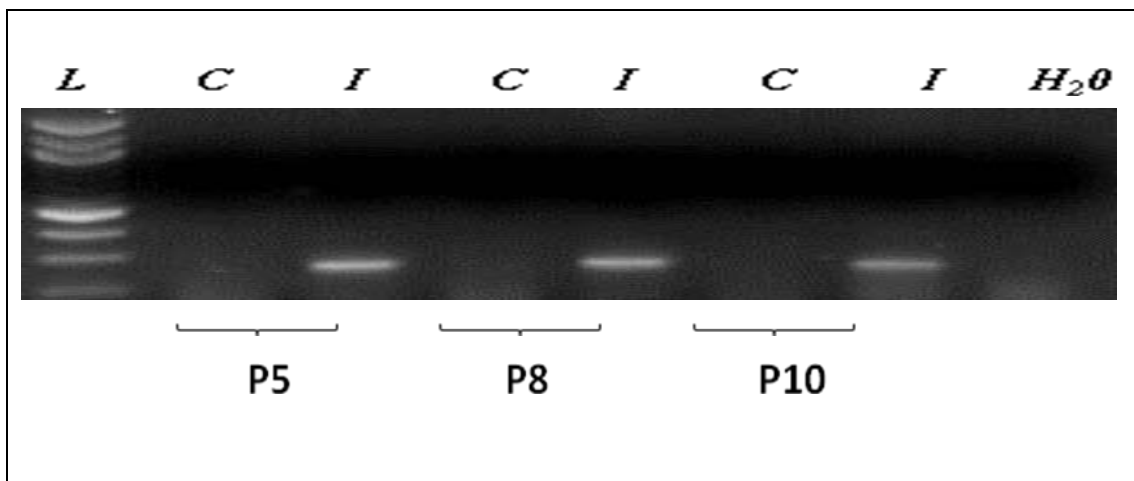
B



Γ

Εικόνα.23: Κύτταρα διαφοροποιημένα σε οστεοβλάστες, A: control, κύτταρα μη διαφοροποιημένα και κύτταρα διαφοροποιημένα σε οστεοκυτταρική σειρά, B, Γ: χρώση με alizarin red S που αποδεικνύει την εναπόθεση ασβεστίου,

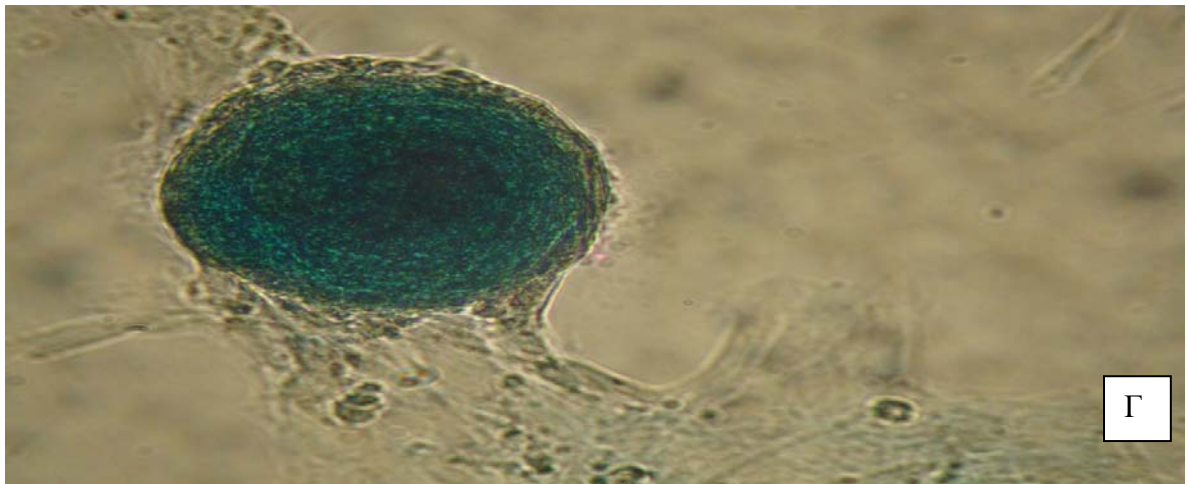
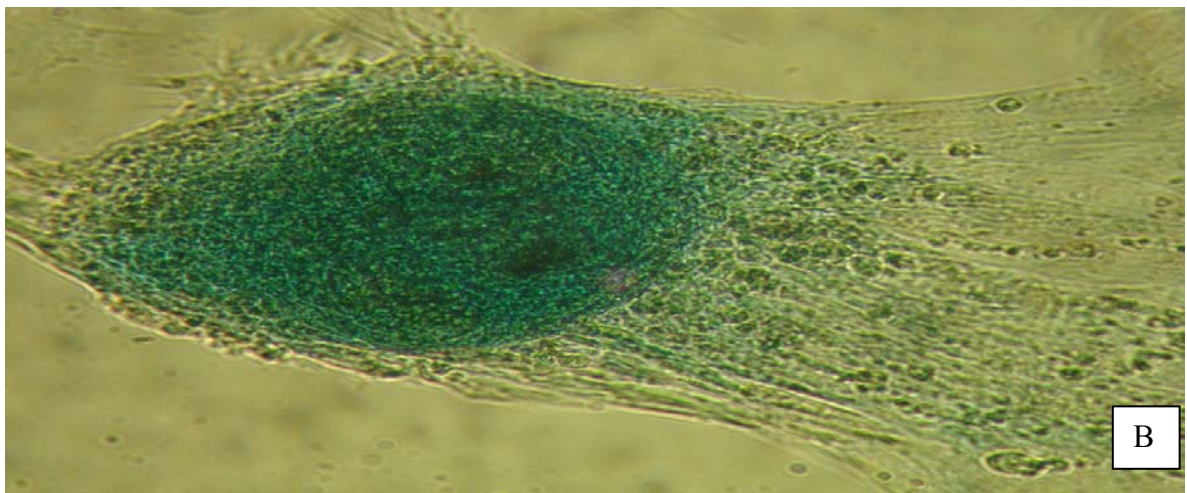
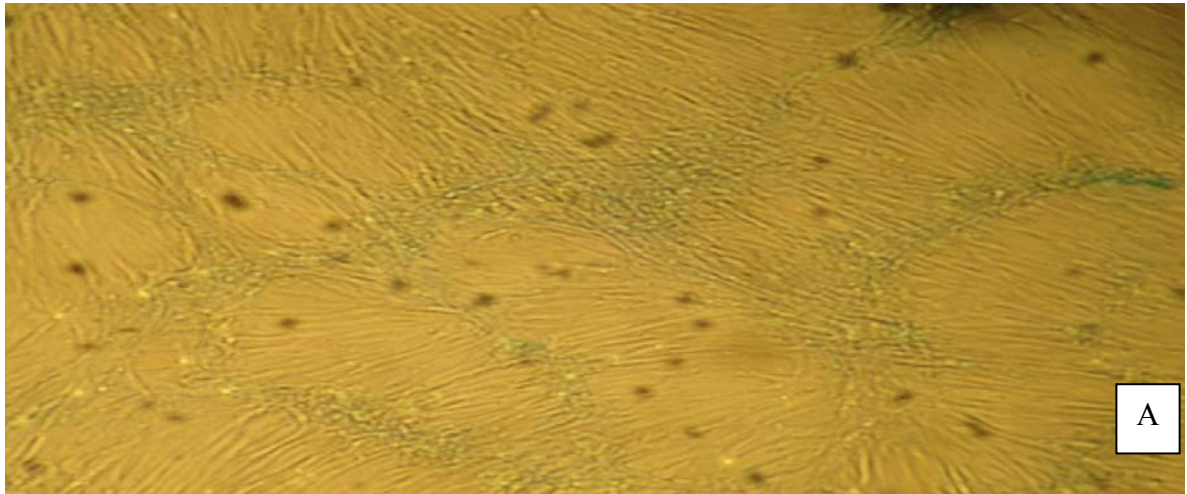
Επιπλέον απόδειξη διαφοροποίησης υπήρξε η έκφραση οστεοποντίνης (SSP1), τυπικός δείκτης οστεογενούς διαφοροποίησης μέσω ανάλυσης RT-PCR (Εικόνα 24).



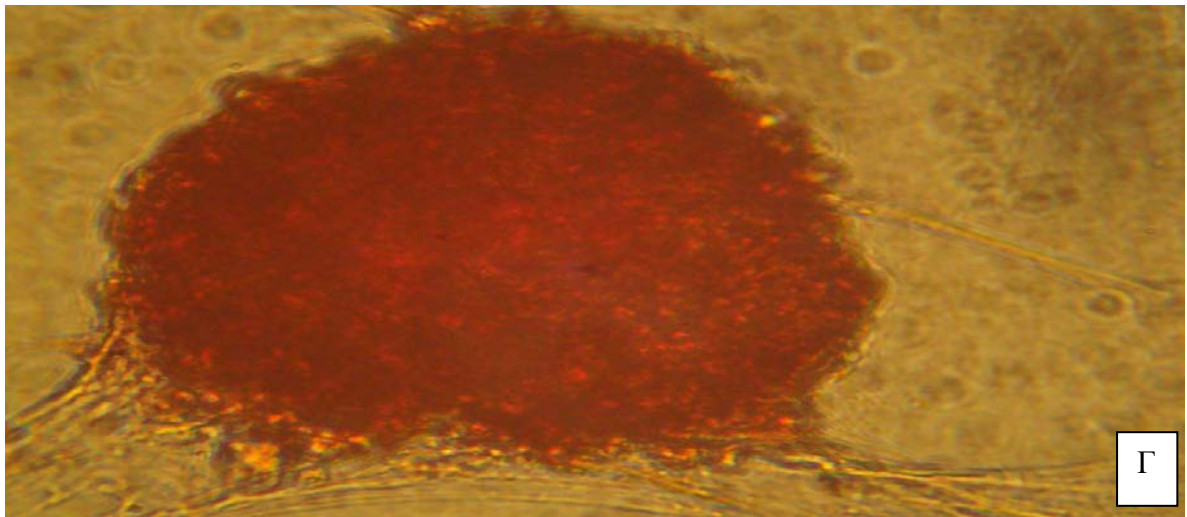
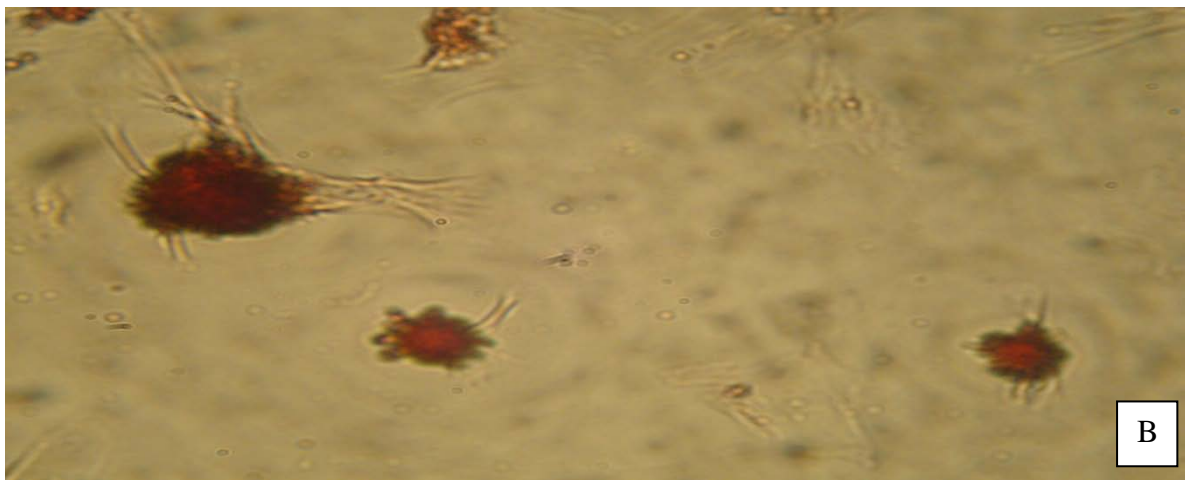
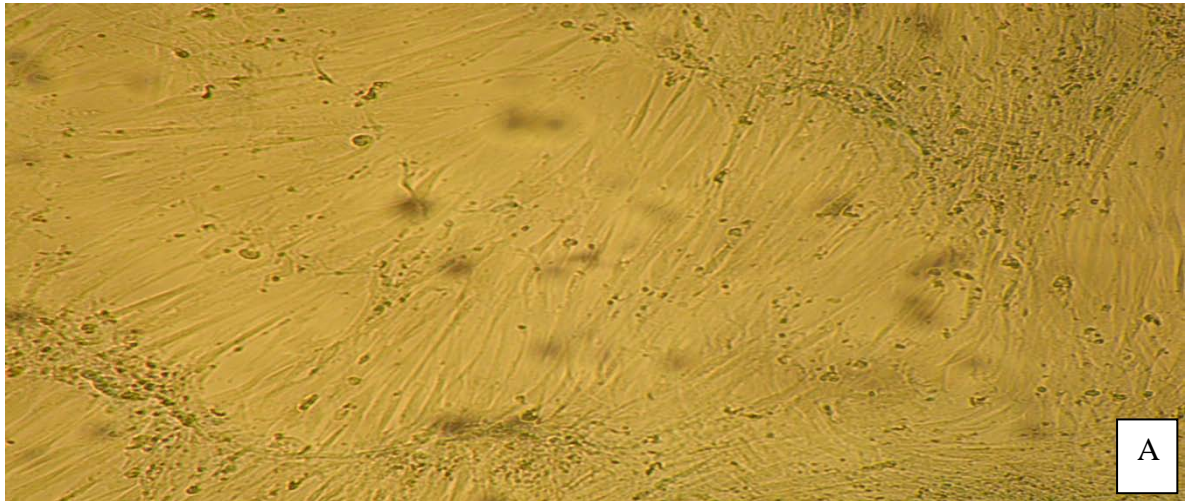
Εικόνα 24: Οστεογενής διαφοροποίηση, έκφραση *OSP*: 264bp, κατά την 5^η, 8^η, και 10^η ανακαλλιέργεια

3.4.3. Χονδρογενής Διαφοροποίηση

Η διαφοροποίηση των κυττάρων σε χονδροκύτταρα, μέσω συστήματος καλλιέργειας μικρομαζών κυττάρων, αναδείχτηκε από την δημιουργία μήτρας με τη συσσώρευση θεικών πρωτεογλυκανών όπως χρωματίστηκαν με τη χρήση χρωστικής μπλε της Αλσατίας και αιματοξυλίνης (Εικόνα 25 & 26).

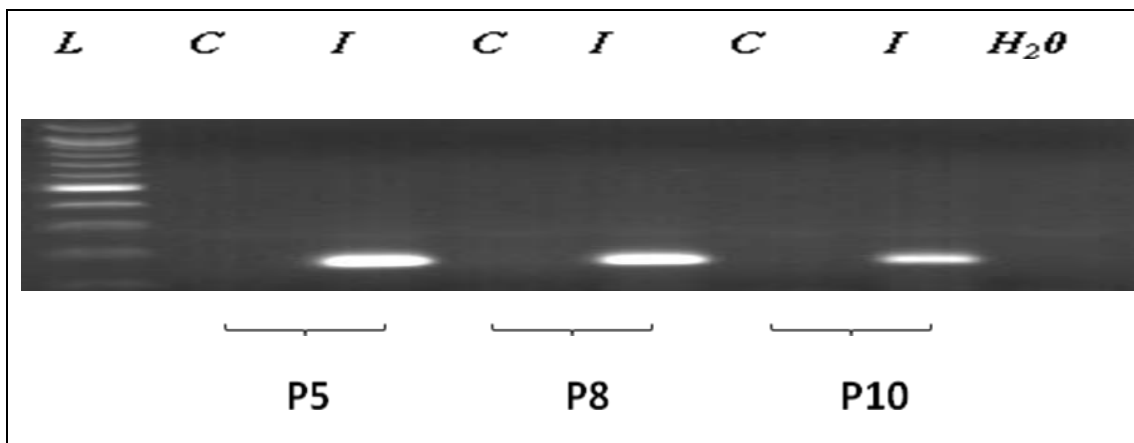


Εικόνα 25: Κύτταρα διαφοροποιημένα σε χονδροβλάστες, Α, control: κύτταρα μη διαφοροποιημένα και κύτταρα διαφοροποιημένα Β, Γ: χρώση με Alcian Blue που δείχνει την δημιουργία θεμέλιας ουσίας και την συσσώρευση πρωτεογλυκανών.



Εικόνα 26: Κύτταρα διαφοροποιημένα σε χονδροβλάστες, Α, control: κύτταρα μη διαφοροποιημένα και κύτταρα διαφοροποιημένα, Β, Γ: χρώση με αιματοξυλίνη που αποδεικνύει την δημιουργία θεμέλιας ουσίας και την συσσώρευση πρωτεογλυκανών.

Μέσω μοριακής ανάλυσης, RT-PCR τα κύτταρα που επάχθηκαν σε χονδρογενή διαφοροποίηση έδειξαν πως εκφράζουν το γονίδιο *Sox9*, τυπικό μάρτυρα των χονδροκυττάρων (Εικόνα 27).

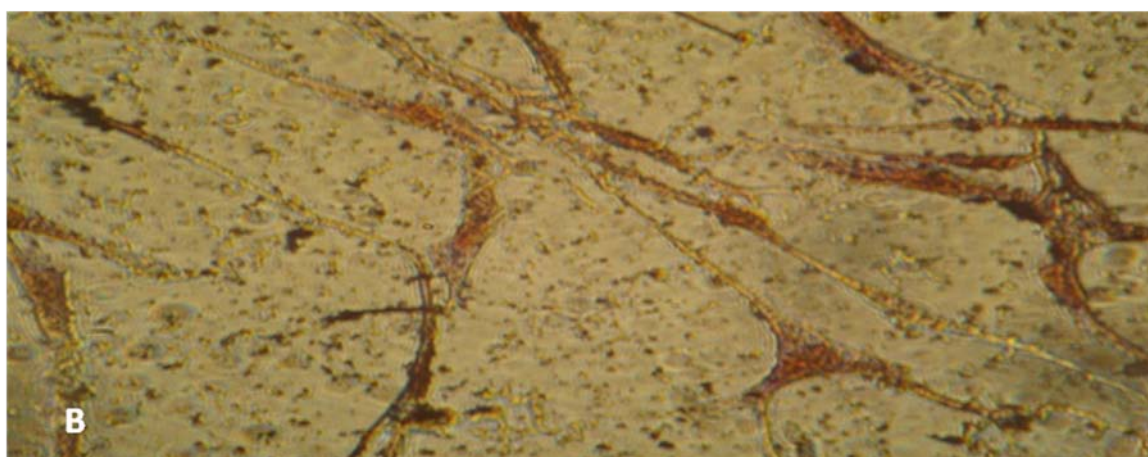
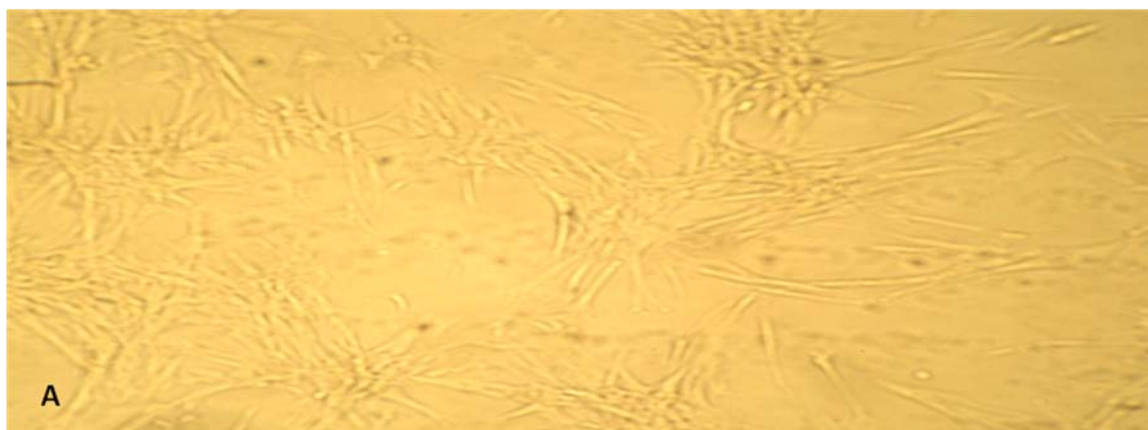


Εικόνα 27: Χονδρογενής διαφοροποίηση, έκφραση *Sox9*: 171bp, κατά την 5^η, 8^η, και 10^η ανακαλλιέργεια

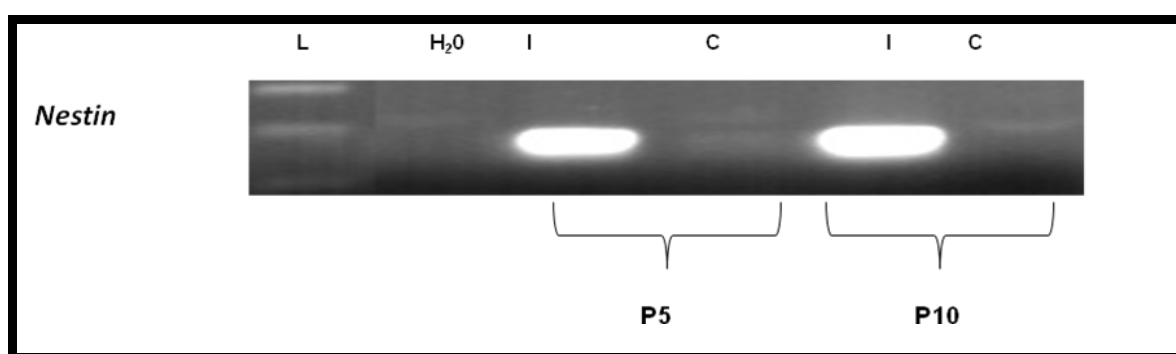
3.4.3. Νευρογενής Διαφοροποίηση

Η διαφοροποίηση των κυττάρων σε νευρικά ομοιάζοντα κύτταρα μέσω επαγωγής με 2-μερκάπτο αιθανόλη αναδείχθηκε μέσω χρώσης με Cresyl Violet το οποίο ανέδειξε τις μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων τα οποία μετατράπηκαν σε κύτταρα με επιμήκης αποφυάδες όμοια των νευρώνων (Εικ.28).

Μέσω μοριακής ανάλυσης RT-PCR ταυτοποιήθηκαν η έκφραση της *Nes* (νεστίνης), γονιδίου μάρτυρα των νευρικών κυττάρων (Εικόνα 29).



Εικόνα 28: Κύτταρα διαφοροποιημένα σε νευρικά, A, control: κύτταρα μη διαφοροποιημένα B: κύτταρα διαφοροποιημένα, χρώση με Cresyl Violet που αναδεικνύει τη μορφολογία νευρώνων.



Εικόνα 29: Νευρογενής διαφοροποίηση, έκφραση *Nestin*: 184bp, κατά την 5^η και 10^η ανακαλλιέργεια

Στις καλλιέργειες κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου-αναφοράς και στο ίδιο χρονικό διάστημα παρέμειναν στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης DMEM-F12 δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων αλλά ούτε και έκφραση των γονιδίων μαρτύρων της διαφοροποίησης όπως φαίνεται και από τις Εικόνες 19^A, 20^A, 22^A, 23^A, 25^A, 26^A και 28^A.

3.4 Έκφραση Γονιδιακού Προφίλ

Η πολυδυναμικότητα και η έκφραση γονιδίων μαρτύρων των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ανιχνεύτηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αρχικά αξιολογήθηκε η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* για να πιστοποιήσει την επιτυχία της αντίστροφης μεταγραφής και της σύνθεσης συμπληρωματικού cDNA. Συγκριτικά με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς αξιολογήθηκε η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων.

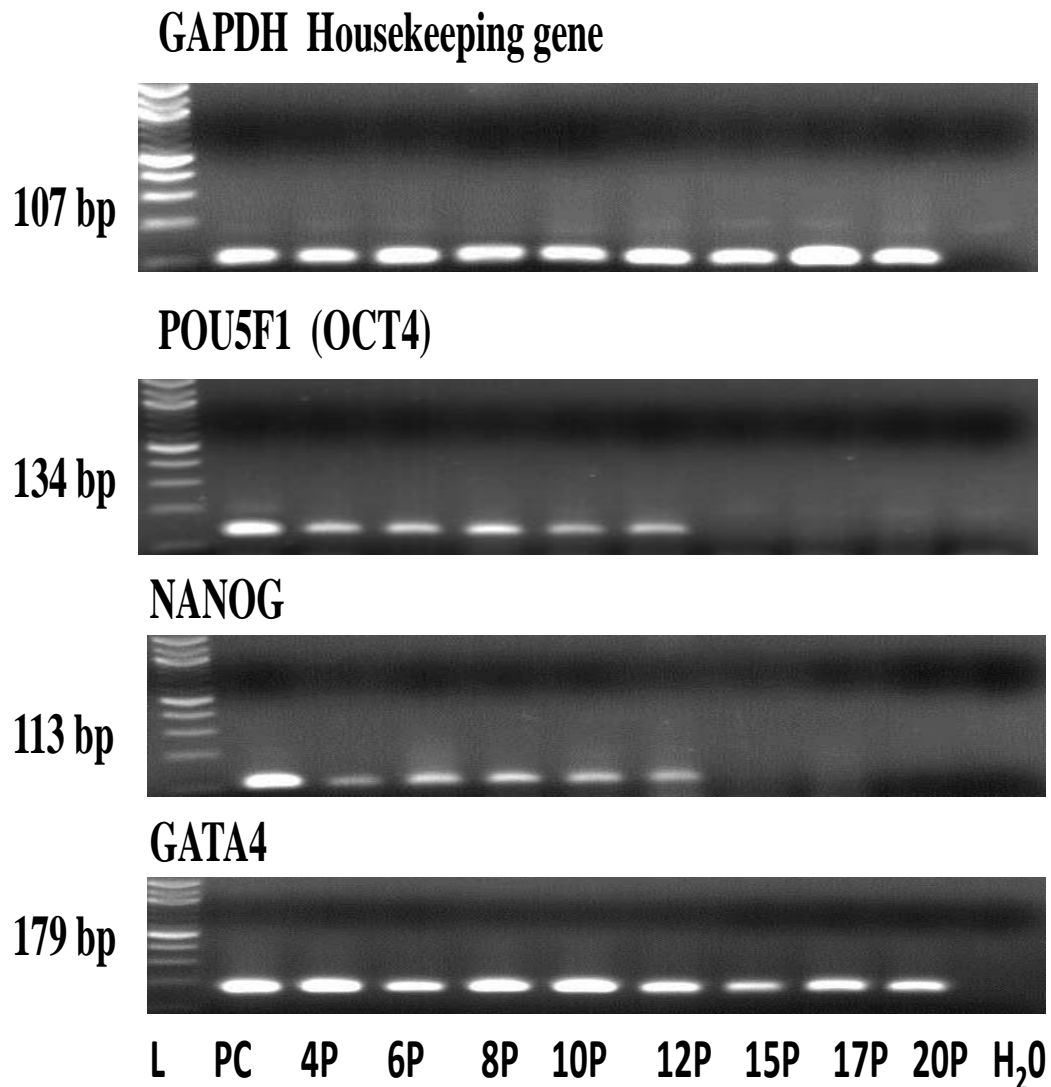
Η έκφραση των γονιδίων της πολυδυναμικότητας *Oct4 (POU5F1)* καθώς και *Nanog*, ανιχνεύτηκε κατά τα πρώιμα στάδια της κυτταρικής καλλιέργειας, από την τρίτη έως την δωδέκατη ανακαλλιέργεια. Στα μεταγενέστερα και τελικά στάδια (13^ο έως 20^ο) παρατηρείται απώλεια της έκφρασής των συγκεκριμένων γονιδίων (Εικόνα 27).

Η έκφραση τόσο του *Rex1 (ZPF42)* όσο και *Sox2* γονιδίων δεν ανιχνεύτηκε καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας των κυττάρων

Επιπλέον τα χοριακά λαχνικά κύτταρα, παρουσιάζουν υψηλή έκφραση του γονιδίου *Gata4*, ενός πρώιμου ενδοδερμικού δείκτη, αλλά και με υψηλή έκφραση στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, από το τρίτο έως το εικοστό κυτταρικό πέρασμα (Εικόνα 27).

Η έκφραση του γονιδίου *Nes (Nestin)*, μάρτυρας των νευρικών βλαστικών κυττάρων δεν ανιχνεύτηκε κατά τις επακόλουθες ανακαλλιέργειες.

Έκφραση Γονιδίων Δεικτών των ESCs



Εικόνα 30: Έκφραση γονιδίων μαρτύρων των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (L: Ladder, PC: positive control, P: passage

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συζήτηση

Η έρευνα για τα βλαστοκύτταρα χαιρετίστηκε για το ενδεχόμενο να φέρει επανάσταση στο μέλλον της ιατρικής με τη δυνατότητα να αναγεννά κατεστραμμένα-νοσούντα όργανα και ιστούς και επιπλέον μπορεί να συντελέσει στην κατανόηση βασικών βιολογικών διαδικασιών.

Οι βιολογικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων είναι το κλειδί για την επιτυχία της κυτταρικής θεραπείας, για την οποία τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα υποσχόμενο υποψήφιο. Παρότι οι περισσότερες θεραπευτικές εφαρμογές πραγματοποιούνται με τη χρήση μυελικών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων αυξημένες είναι και εφαρμογές πλέον με κύτταρα προερχόμενα από εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Πληθαίνουν επίσης οι ενδείξεις πως τα MSCs προερχόμενα από πρώιμης και μέσης κυοφορίας ιστούς έχουν μεγαλύτερη πλαστικότητα και πολλαπλασιάζονται ταχύτερα (47) και ίσως αποτελούν ιδανικούς υποψηφίους για αναγεννητική ιατρική και αναπλαστική μηχανική ιστών.

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν εντοπιστεί σχεδόν σε όλους τους ενήλικους ιστούς και ποιο πρόσφατα σε στοιχεία του κυήματος και εξωεμβρυϊκούς ιστούς (246), (36). Έρευνες προτείνουν ότι αυτά τα κύτταρα μπορεί να αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική πηγή πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, αναπτυξιακά και λειτουργικά, τοποθετημένα μεταξύ των εμβρυϊκών και των ενηλίκων βλαστικών κυττάρων (247), (47).

Ο ανθρώπινός πλακούντας είναι ένα ετερογενές όργανο αποτελούμενο από διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς που ο καθένας χωριστά συντελεί στην φυσιολογία του οργάνου. Πράγματι, εκτός από την τροφοβλάστη, οι πλακουντιακές λάχνες αποτελούνται από ενδοθηλιακά κύτταρα και πρόδρομους μυοϊνοβλάστες και μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο δίκτυο το οποίο συντονισμένα αλληλοεπιδρά για να διατηρήσει την πλακουντιακή λειτουργία (248).

Χοριακά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν απομονωθεί από τελειόμηνο πλακούντα και διαθέτουν το ανοσολογικό και γονοτυπικό προφίλ που ευρέως χαρακτηρίζει τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (249). Είναι κύτταρα με τη χαρακτηριστική ινοβλαστική, ατρακτοειδή μορφολογία και ικανότητα πολλαπλασιασμού που δεν αλλοιώνεται από τις επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες διατηρώντας σταθερό τον καρυότυπό τους (201), (215), (235). Η χαμηλή έκφραση του

HLA-DR των πλακουντιακών κυττάρων τα καθιστά μια πολύτιμη πηγή κυττάρων για θεραπείες μεταμόσχευσης εξαιτίας της ανοσό-προστατευμένης κατάστασης τους και των ανοτροποποιητικών ιδιοτήτων τους (249),(250).

Επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες των απομονωμένων MSCs είναι απαραίτητες για την αναγεννητική ιατρική καθώς απαιτείται μεγάλος αριθμός κυττάρων. Η κατά σειρά επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες θα μπορούσαν να μεταβάλουν τόσο το φαινότυπο όσο και το γονότυπο των υπό καλλιέργεια πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων εξαιτίας της προσαρμογής στο περιβάλλον της κυτταρικής καλλιέργειας (251). Τέτοιες μεταβολές έχουν περιγραφεί και αναφερθεί σε αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα (252), σε πλακουντιακά προερχόμενα βλαστικά κύτταρα (250) και σε λιπώδους ιστού προερχόμενα βλαστικά κύτταρα (253).

Στη δική μας μελέτη απομονώσαμε μεσεγχυματικά-ομοιάζοντα βλαστικά κύτταρα με τη χαρακτηριστική ινοβλαστική ατρακτοειδή μορφολογία από ανθρώπινα δείγματα χοριακών λαχνών πλακούντα 1^{ου} τριμήνου. Τα απομονωμένα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν σε παρατεταμένες χρονικά καλλιέργειες και συγκεκριμένα 20 ανακαλλιέργειες. Καθόλη τη διάρκεια των καλλιεργειών, 120 ημέρες, τα κύτταρα χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, υποβλήθηκαν σε διαφοροποίηση καθώς αξιολογήθηκε και η έκφραση κάποιων εκ των γονιδίων δεικτών των εμβρυϊκών βλαστικών. Ταυτοποιήθηκαν τα χαρακτηριστικά των MSCs και επιδιώχθηκε να προσδιοριστούν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ αυτών και των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Η μεγάλης διάρκειας καλλιέργειες και οι επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να αξιολογηθεί η επίδραση τους στα μορφολογικά, φαινοτυπικά και μοριακά χαρακτηριστικά των απομονωθέντων και πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, δηλαδή πως επηρεάζεται η πολυδυναμικότητα και τα εμβρυονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων.

Τα χοριακά-λαχνικά (CV) μεσεγχυματικά-ομοιάζοντα βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου αποτελούν ένα πληθυσμό κυττάρων ο οποίος μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με τα ομόλογα ενήλικα κύτταρα και διατηρούν αυτά τα χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης χρονικά καλλιέργειας. Σε αντίθεση χάνουν τα χαρακτηριστικά των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων μετά από μια σειρά διαδοχικών ανακαλλιεργειών.

Τα CV-ομοιάζοντα MSCs διαθέτουν τη μορφολογία των μυελικών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, εκφράζουν τα τυπικά αντιγόνα επιφανείας των

πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (20 ανακαλλιέργειες), ενώ η έκφραση των γονιδίων της βλαστικότητας *Oct4* και *Nanog*, ρυθμιστών της πολυδυναμικότητας, διατηρούνται μόνο κατά τη διάρκεια των πρώτων 12 ανακαλλιεργειών.

Αρχικά, απομονώσαμε, μέσω επικόλλησης σε πλαστική επιφάνεια, κύτταρα, με επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα, ινοβλαστικής μορφολογίας. Ο φαινότυπος των κυττάρων των πρωταρχικών καλλιεργειών μετατρέπεται ολοκληρωτικά σε ινοβλαστική μορφολογία με τις σταδιακές ανακαλλιέργειες όπως αναφέρεται και από τις ομάδες του Poloni και του Fong (235), (67).

Ένας ομοιογενής ινοβλαστοειδής πληθυσμός κυττάρων σταθεροποιήθηκε μετά την τρίτη ανακαλλιέργεια και επέδειξε μια παρατεταμένη επιβίωση. Τα χοριακά-λαχνικά προερχόμενα κύτταρα, εξαπλώνονται γρήγορα και επιδεικνύουν ένα υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Ο συνολικός πληθυσμιακός διπλασιασμός των κυττάρων ανέρχεται στα 56.12 ± 4.51 σε 120 ημέρες και 20 επακόλουθες ανακαλλιέργειες. Σύμφωνα με τους De Corpi και συν., τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού, μια εξωεμβρυϊκή πηγή MSCs όμοιου αναπτυξιακού σταδίου με τις χοριακές λάχνες, μπορούν να διατηρηθούν σε καλλιέργεια για πάνω από 20 ανακαλλιέργειες (223), (254). Όσο αυξανόταν ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων ανακαλλιεργειών ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειωνόταν και στα τελικά στάδια της καλλιέργειας, μετά το 17^ο “πέρασμα” ο ρυθμός πολλαπλασιασμού μειώθηκε στο 1.72 ± 0.42 ($\log_2 0.74 \pm 0.37$) πριν οδηγηθούν στο τελικό στάδιο της γήρανσης και σταματήσουν πλέον να διαιρούνται (254).

Η παρατεταμένη καλλιέργεια των CV-MSCs δεν επηρέασε τη γενετική σταθερότητα αυτών των κυττάρων, τα οποία επέδειξαν αναλλοίωτο καρυότυπο καθόλη τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους (201), (215), (235). Τα κύτταρα εμφανίζονται γενετικά σταθερά και πέραν της 10-12^{ης} ανακαλλιέργειας (196), (266).

Τα CV-MSCs επιπρόσθετα της τυπικής ινοβλαστικής μορφολογίας που παρουσιάζουν, το ανοσοφαινοτυπικό τους προφίλ είναι όμοιο με αυτό των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενα από το μυελό των οστών αλλά και από άλλες πηγές (177), (255), (192), (235), (246).

Αυτά τα κύτταρα παρουσίαζαν μια αξιοσημείωτη, σε ποσοστό μεγαλύτερο το 90%, θετικότητα για τα αντιγόνα επιφανείας *CD90*, *CD105*, *CD73* και υψηλά θετικά ποσοστά, μεγαλύτερα του 80%, για τα *CD44*, *CD29* and *HLA-ABC*, από την τρίτη ανακαλλιέργεια και μετέπειτα. Το γεγονός αυτό αντανακλά την αύξηση της

κυτταρικής προσκόλλησης στην επιφάνεια καλλιέργειας, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σύμφωνα με τους Gui και συν., (256). Μια μείωση στα επίπεδα έκφρασης *CD73*, *CD90* και *CD105* παρατηρήθηκε κατά τη 19^η και 17^η ανακαλλιέργεια αντίστοιχα ($p, < 0.05$).

Όπως αναμενόταν τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν εκφράζουν δείκτες των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων *CD14*, *CD34*, *AC133* και *HLA-DR* (192).

Η παρουσία του *HLA-ABC* και *CD90* αποκλείουν την παρουσία άλλων κυττάρων όπως τροφοβλαστικά τα οποία θα μπορούσαν να επιμολύνουν τα απομονωθέντα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (251). Επίσης η υψηλή έκφραση του *HLA-ABC* όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και η σταθερή αρνητικότητα του *HLA-DR* προσδίδει στα χοριακά MSCs ανοσοτροποποιητικές δυνατότητες και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες οι οποίες δεν επηρεάζονται από τις κατά σειρά ανακαλλιέργειες (25), (257).

Η διαφοροποιητική ικανότητα είναι ένα άλλο χαρακτηριστικό των MSCs. Τα CV-MSCs διαφοροποιήθηκαν σε λιπογενή, οστεογενή και χονδρογενή κυτταρική σειρά υπό κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας αλλά και σε νευρικά κύτταρα (177). Η επαγωγή σε διαφοροποίηση των κυττάρων προς τις τρεις αυτές κατευθύνσεις τεκμηριώθηκε μέσω ειδικών χρώσεων και επιβεβαιώθηκε από την έκφραση των mRNAs για το *PPARγ2*, *Osteopontin (SSPI)*, *Sox9* και *Nes* γονίδια, τα οποία είναι μάρτυρες της λιπογενούς, οστεογενούς, χονδρογενούς και νευρογενούς διαφοροποίησης αντίστοιχα (241) (177).

Η ανάλυση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ανέδειξε μια χαμηλή έκφραση του γονιδίου *PPARγ2* και στα μη επαγόμενα κύτταρα ενώ αυτή η έκφραση αυξανόταν αισθητά στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε λιπογενές μέσο καλλιέργειας. Αναφορά για έκφραση του *PPARγ2* γονιδίου σε αδιαφοροποιήτα κύτταρα γίνεται επίσης και από τους Bolosasco και συν., για κύτταρα προερχόμενα από αμνιακό υγρό (258).

Παρότι η έκφραση των πολυδύναμων μαρτύρων θεωρείται σήμα κατατεθέν των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, αναφορές προτείνουν ότι τα πρώιμα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ενδέχεται να εκφράζουν κάποιους πολυδύναμους δείκτες. Ανθρώπινα εξωεμβρυϊκά MSCs φαίνεται να παρουσιάζουν πρωτόγονα αναπτυξιακά γονίδια καθώς επίσης και γονίδια που εμπλέκονται στην πολυδυναμικότητα και στη διατήρηση της αυτοανανέωσης (247), (259).

Τα CV-MSCs διατηρούν κάποια χαρακτηριστικά των πρώιμων εμβρυϊκών σταδίων, εκφράζουν τους δείκτες πολυδυναμικότητας *Oct4* και *Nanog*, η οποία έκφραση μπορεί να επισημαίνει τα χαρακτηριστικά της πολυδυναμικότητας και αυτοανανέωσης αυτών των κυττάρων.

Τα γονίδια *Oct4* και *Nanog* εκφραζόταν σταθερά από τη 4^η έως τη 12^η ανακαλλιέργεια αλλά μετά τη 12^η ανακαλλιέργεια η έκφρασή τους χάνεται. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν την αναφορά από τους Poloni και συν., ότι τα καλλιεργημένα CV-MSCs εκφράζουν τον πολυδύναμο δείκτη *Oct4* (235), καθώς και την αναφορά των Greco και συν., ότι οι παρατεταμένες ανακαλλιέργειες οδηγούν σε μείωση της έκφρασης του *Oct4* (260).

Το γονίδιο *Oct4* έχει προταθεί ως ο κύριος ρυθμιστής της πολυδυναμικότητας των κυττάρων (261), το οποίο αλληλοεπιδρά με τους άλλους εμβρυϊκούς ρυθμιστές στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας και στην αποτροπή της διαφοροποίησης (262). Η μείωση του *Oct4* στα CV-MSCs μετά από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες μπορεί να εξηγήσει τη μείωση των γονιδίων στόχων του όπως είναι το *Nanog* (94).

Σε συγκριτική μελέτη μεταξύ πληθυσμών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων πλακούντα πρώτου τριμήνου, τελειόμηνου πλακούντα και ενήλικα μυελού των οστών, το ανοσοφαινοτυπικό προφίλ και η διαφοροποιητική ικανότητα προς μεσοδερμικούς ιστούς και των τριών πληθυσμών κυττάρων δεν παρουσιάζουν διαφορές, αλλά η έκφραση του *Oct4* μάρτυρα πολυδυναμικότητας παρουσιάζεται στην πρώτη ομάδα αλλά όχι στις άλλες δυο (263). Αυτά τα ευρήματα μπορεί να απορρέουν από το γεγονός ότι ο πλακούντας πρώιμης κύησης είναι πιο κοντινός στο εμβρυϊκό στάδιο από τον τελειόμηνο πλακούντα.

Σε αντίθεση με άλλες μελέτες (234), δεν ανιχνεύσαμε την έκφραση του *Rex1* (*ZFP42*). Το *Rex1* είναι ένα ακόμη γονίδιο εμπλεκόμενο στη λειτουργικότητα των εμβρυϊκών βλαστικών το οποίο ανιχνεύεται στα MSCs προερχόμενα από διάφορους ιστούς, έχοντας όμως μια ποικίλη έκφραση ακόμα και από πλακούντα σε πλακούντα σύμφωνα με αναφορά των Greco και συν., (260). Η υπερέκφραση ή υποέκφραση του *Oct4* οδηγεί στη μείωση της έκφρασης του *Rex-1* (264).

Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας ο *Sox2*, συνδεδεμένος με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα είναι υψηλά εκφραζόμενος στα νευρικά βλαστικά και πρόδρομα κύτταρα (265). Όμως τόσο στη δική μας μελέτη αλλά και σε αναφορά από τους Meraviglia και συν., τα CV-MSCs δεν παρουσίασαν έκφραση του *Sox2* (266).

Σύμφωνα με τους Meraviglia και συν., τα CV-MSCs δεν εκφράζουν τους πολυδύναμους μεταγραφικούς παράγοντες *Nanog*, *Oct4* και *Sox2* (266).

Ενδιαφέρον είναι, ότι ο ανοσοφαινότυπος, η καρυοτυπική σταθερότητα, η χαμηλή δραστηριότητα της τελομεράσης (267), και η περιορισμένη έκφραση πολυδυναμικά-συνδεδεμένων γονιδίων (268) καθιστά τα CV-MSCs εγγύτερα στα μυελικά MSCs απ' ό,τι σε κύτταρα εμβρυϊκής προέλευσης, όπου τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των πολυδύναμων παραγόντων *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* και η ισχυρή δραστηριότητα τελομεράσης είναι καλά αναγνωρισμένα (74), (266). Σε αντίθεση, η θετικότητα για αυτούς τους βλαστικούς παράγοντες είναι ακόμα αμφιλεγόμενη για κύτταρα ενήλικης προέλευσης (269), (268), (267), (266).

Επιπλέον των εμβρυϊκών δεικτών, στη παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε την έκφραση των γονιδίων *Gata-4* και *Nestin*. Το *Gata-4* είναι ένας πρώιμος ενδοδερμικός δείκτης, εκφραζόμενος στο πρωτοταγές ενδόδερμα αλλά επίσης παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (270), (221), (235) και αυτό πιστοποιήθηκε επίσης και από τα δικά μας αποτελέσματα.

Το *Nestin* αποτελεί ένα δείκτη των νευρικών βλαστικών κυττάρων (271), με έκφραση και στα MSCs όπως έχει αναφερθεί από διάφορους συγγραφείς (235), (272), αλλά χωρίς να αποτελεί μάρτυρα κλειδί αυτών των κυττάρων (49). Η έκφραση του *Nestin* δεν ανιχνεύτηκε στα κύτταρα μας υπό καλλιέργεια. Όπως αναφέρει η ομάδα Hwang και συν., το γονίδιο *Nestin* φαίνεται να μην έχει ειδική έκφραση στους μεσεγχυματικούς συνδετικούς ιστούς, αλλά μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών (273). Η έκφρασή του *Nes* γίνεται εμφανής κατόπιν επαγωγής διαφοποίησης των λαχνικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα.

Τα χοριακά μεσεγχυματικά ομοιάζοντα κύτταρα, παρά την απώλεια των πολυδύναμων γονιδίων *Oct4* και *Nanog* μετά τη 12^η ανακαλλιέργεια διατηρούν τα χαρακτηριστικά της πολυδυναμικότητας και αυτοανανέωσης. Τα κύτταρα υπό καλλιέργεια συνεχίζουν να εκφράζουν τους δείκτες επιφανείας των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων και η έκφραση αυτών των θεωρητικά πολυδυναμικών βλαστικών δεικτών επιμένει σε υψηλά επίπεδα καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, μετά από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες και μόνο στα τελικά στάδια παρατηρείται μια σημαντική μείωση.

Ανάμεσα στους εμβρυϊκούς ιστούς, οι χοριακές λάχνες είναι μια ελκυστική πηγή ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, μπορούν να συλλεχθούν είτε προγεννητικά, μέσω λήψης λαχνών στην 10-12 εβδομάδα για προγεννητικό

έλεγχο είτε κατά τη γέννηση. Το κύριο πλεονέκτημα των χοριακών λαχνών πρώτου τριμήνου είναι ότι παρέχει, λόγω του χρόνου λήψης τους, τη δυνατότητα απομόνωσής τους, πολλαπλασιασμού τους και διαφοροποίησης τους ώστε τα MSCs να μπορούν να εμφυτευτούν στο νεογνό δότη σε μια αυτόλογη προσέγγιση (254).

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτόλογες και αλλογενείς κλινικές δοκιμές από το 2005. Η κοινή πρακτική περιλαμβάνει απομόνωση των hMSCs και εκτεταμένη *in vitro* εξάπλωσή τους. Τα MSCs από νέες πηγές πρέπει να αξιολογηθούν για τη δυναμική τους να πολλαπλασιάζονται σε παρατεταμένες χρονικά καλλιέργειες και να επαληθεύεται η διατήρηση των χαρακτηριστικών τους στις συνεχόμενες ανακαλλιέργειες.

Οι πλακουντιακά προερχόμενοι ιστοί αντιπροσωπεύουν μια πολύτιμη πηγή MSCs (274), (235), (218). Οι ενδείξεις ότι οι πρώτου τριμήνου χοριακές λάχνες περιέχουν μεσεγχυματικά κύτταρα με βλαστικά/πρόδρομα χαρακτηριστικά δίνει την πιθανότητα για μακρόχρονη αποθήκευση του νεογνικού υλικού για κλινικές εφαρμογές (235), (274).

Συμπερασματικά, τα χοριακά μεσεγχυματικά κύτταρα κατέχουν ιδιότητες των ενηλίκων MSCs με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού και αναγεννητική ικανότητα και διατηρούν αυτές τις ιδιότητες ακόμη και μετά από εκτεταμένες *in vitro* καλλιέργειες, παρόλο που τα CV-ομοιάζοντα MSCs παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων τα οποία όμως χάνονται κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων ανακαλλιεργειών. Αν αυτό το γεγονός αποτελεί πλεονέκτημα ή μειονέκτημα παραμένει να διευκρινιστεί. Για αυτό το λόγο, επιπλέον μελέτες χρειάζονται για τη βελτιστοποίηση των καλλιεργειών αυτών των κυττάρων με σκοπό τη πιθανή κλινική εφαρμογή τους.

Τα χοριακά λαχνικά κύτταρα διαθέτουν μια σειρά πλεονεκτημάτων, που συμβάλουν στη πιθανή θεραπευτική τους χρήση. Πρώτον, μπορεί να έχουν υψηλότερη διαφοροποιητική ικανότητα σε σύγκριση με κύτταρα προερχόμενα από άλλους ιστούς, λόγω του πρώιμου σταδίου ανάπτυξης του ιστού από τον οποίο προέρχονται. Δεύτερον, η δυνατότητα να απομονώσουμε πολυδύναμα αυτόλογα πρόδρομα κύτταρα, όπως αυτά κατά τη διάρκεια της κύησης, μπορεί να αποτελεί πλεονέκτημα για την έγκαιρη θεραπεία γενετικών ανωμαλιών των νεογνών. Τρίτον, τα εξωεμβρυϊκά MSCs δεν δημιουργούν τερατώματα όταν μεταμοσχεύονται σε ενήλικες και είναι λιγότερο ανοσογενή από άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, καθιστώντας αυτά ιδιαίτερα κατάλληλα για μεταμόσχευση (218), (223). Επιπλέον,

αποτελούν ένα κυτταρικό πληθυσμό που προκύπτει χωρίς να εφαρμόσουμε κάποια επιπλέον επεμβατική μέθοδο.

Τα πρώιμης κυοφορίας μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα θα πρέπει να είναι επιλογή για αυτόλογες προγεννητικές μεταμοσχεύσεις, λόγω του παραθύρου της ανοσολογικής αδράνειας, επίσης και για αλλογενείς και μεταγενετικές αυτόλογες χρήσεις καθώς μπορεί ήδη να έχουν πολλαπλασιαστεί σε μεγάλη κλίμακα σε συνθήκες καλλιέργειας με ανθρώπινο ορό και να είναι έτοιμα προς χρήση (240).

4.2 Συμπεράσματα

Τα CV-MSCs

- είναι ινοβλαστοειδή κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται επικολλημένα στη πλαστική επιφάνεια
- παρουσιάζουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού
- εκφράζουν αντιγόνα επιφανείας των MSCs
- Είναι γενετικά σταθερά
- Διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδερμικής σειράς
- Διαφοροποιούνται σε νευρικά κύτταρα

Τα CV-MSCs διαθέτουν ιδιότητες των αληθινών MSCs με υψηλή πολλαπλασιαστική & αυτοανανεωτική ικανότητα και διατηρούν αυτά τα χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια παρατεταμένων καλλιεργειών.

- Εκφράζουν κάποια εκ των γονιδίων μαρτύρων των ESCs: *POU5F1* (Oct-4) & *Nanog*, έως το 12^η ανακαλλιέργεια
- Δεν εκφράζουν *ZFP42*, *SOX2* & *NES* (*Nestin*) αλλά εκφράζουν *GATA4*

Τα CV-MSCs παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των ESCs αλλά μόνο στα πρώιμα στάδια της καλλιέργειας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΝΟΨΗ

5.1 Σύνοψη

Εισαγωγή

Παραδοσιακά τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) μπορούν να προκύψουν από πληθώρα ανθρώπινων ιστών, όπως ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός, τους μύες, τον εγκέφαλο και το δέρμα. Τα MSCs είναι ικανά να αυτόανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, μυοκύτταρα καθώς επίσης και σε ηπατοκύτταρα και νευρικά κύτταρα υπό κατάλληλες συνθήκες.

Πρόσφατα, MSCs απομονώθηκαν από εξωεμβρυϊκές πηγές όπως το ομφαλικό αίμα και η γέλη του Wharton, οι αμνιακές μεμβράνες, το αμνιακό υγρό και ο πλακούντας. MSCs προερχόμενα από πλακουντιακές χοριακές λάχνες πρώτου τριμήνου φαίνεται να ομοιάζουν, βιολογικά, στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs), λόγω του πρώιμου σταδίου ανάπτυξης του πλακούντα.

Στην παρούσα μελέτη, προσπαθήσαμε να διαλευκάνουμε τα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των MSCs προερχόμενα από πρώτου τριμήνου χοριακές λάχνες και ESC. Με βάση τα δεδομένα προηγούμενων μελετών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ενός ευρύτερου φάσματος γονιδίων-μαρτύρων των ESCs, καθώς επίσης πραγματοποιήθηκαν παρατεταμένες χρονικά καλλιέργειες των MSCs με σκοπό να αξιολογηθούν *in vitro*, πως διαμορφώνονται το δυναμικό διαφοροποίησης, τα μοριακά χαρακτηριστικά και γενικότερα οι δείκτες πολυδυναμοκότητας καθόλη τη περίοδο καλλιέργειας.

Υλικά και Μέθοδοι

MSCs ελήφθησαν από 30 δείγματα χοριακών λαχνών και καλλιεργήθηκαν για να εκτιμηθεί η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η έκφραση των αντιγόνων επιφανείας των MSCs. Χρησιμοποιώντας ειδικές συνθήκες καλλιέργειας, MSCs διαφοροποιήθηκαν σε λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και νευρικά κύτταρα. Ειδικές χρώσεις των διαφοροποιημένων κυττάρων και ανάλυση έκφρασης μέσω RT-PCR των γονιδίων-δεικτών των ESC και

των γονιδίων δεικτών της διαφοροποίησης διεξήχθει για την αξιολόγηση της επιτυχίας διαφοροποίησης.

Αποτελέσματα

Τα χοριακά λαχνικά κύτταρα, αναπτύσσονται εύκολα σε συνθήκες καλλιέργειας, εμφανίζονται να είναι φαινοτυπικά σταθερά και παρουσιάζουν χαρακτηριστική ινοβλαστοειδή μορφολογία. MSCs ανακαλλιιεργήθηκαν για 20 φορές κατά τη διάρκεια περιόδου 120 ημερών. Ρυθμός πολλαπλασιασμού των MSCs κυμαίνονταν από 1,91 logs στα πρώιμα στάδια (3-7 περάσματα), σε 2,00 logs στα ενδιάμεσα στάδια (περάσματα 8-12) και παρουσίασε πτώση στα μεταγενέστερα (13-16 περάσματα) και τελευταία (17-20 περάσματα) στάδια στα 1,14logs και 0,74logs αντίστοιχα. Καθόλη τη διάρκεια της μακρόχρονης καλλιέργειας ο καρυότυπος των κυττάρων δεν τροποποιήθηκε.

Η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι τα κύτταρα χοριακών λαχνών ήταν θετικά για *CD90*, *CD73*, *CD105*, *CD29*, *CD44*, *HLA ABC* αντιγόνα και αρνητικά για *CD14*, *CD34*, *AC133*, και *HLA DR* αντιγόνα, για ολόκληρη την περίοδο καλλιέργειας.

Τα από χοριακές λάχνες προερχόμενα MSCs διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς σε λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα αλλά και σε νευρικά κύτταρα. Διαφοροποίηση λιποκυττάρων επιβεβαιώθηκε με *Oil Red O* χρώση και έκφραση *PPARγ2*, ενώ η οστεογενής διαφοροποίηση εκτιμήθηκε με ανοργανοποίηση του συσσωρευμένου ασβεστίου μέσω χρώσης με *Alizarin Red S* και έκφραση *SPPI* (οστεοποντίνης), η συσσώρευση των θεικών πρωτεογλυκανών στη χονδρογενή διαφοροποίηση ταυτοποιήθηκε με χρώση *Alcian Blue* και έκφραση της *Sox9* ειδικού γονιδίου. Τα νευρικά ομοιάζοντα κύτταρα χρωματίστηκαν με *Cresyl Violet* και ταυτοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου της *Νεστίνης*.

Η έκφραση ESCs γονιδίων-δεικτών *POU5F1* (*Oct-4*) και *Nanog* παρατηρήθηκε σε πρώιμα στάδια (4-12 περάσματα), ενώ τα τελευταία στάδια (14-20 περάσματα) δεν παρουσίασαν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης. *ZFP42* και *Sox2* έκφραση δεν παρατηρήθηκε. Επιπλέον, MSCs βρέθηκαν να εκφράζουν το γονίδιο *GATA4* αλλά όχι το *NES* (νεστίνη) σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα.

Συμπεράσματα

Τα από χοριακές λάχνες προερχόμενα MSCs έχουν πολυδύναμες ιδιότητες μεταξύ εμβρυϊκών και ενήλικων βλαστικών κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη με τη χρήση ενός ευρύτερου φάσματος δεικτών, διαπιστώθηκε ότι MSC από χοριακές λάχνες εμφανίζουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, διατηρώντας αναλλοίωτο το χρωμοσωμικό τους προφίλ, και την αυτό-ανανεωτικής ικανότητα τους, μοιράζονται κοινή έκφραση αντιγόνων επιφάνειας με τα ενήλικα MSCs και εκφράζουν ορισμένα γονίδια μάρτυρες των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Αυτά τα χαρακτηριστικά θέτουν τις χοριακές λάχνες ως μια ελκυστική πηγή MSC για τις ανάγκες της αναγεννητικής ιατρικής.

5.2 SUMMARY

Introduction

Traditionally, mesenchymal stem cells (MSCs) can be obtained from a big number of human tissues, such as bone marrow, adipose tissue, muscles, brain and dermis. MSCs are able to self-renew and differentiate into adipocytes, osteocytes, chondrocytes, myocytes, as well as into hepatocytes and neural cells under appropriate conditions.

Recently, MSCs have been isolated from fetal extraembryonic sources, such as cord blood, Wharton's Jelly, amniotic membranes, amniotic fluid and placenta. MSCs derived from placental chorionic villi of the first trimester are likely to resemble, biologically, embryonic stem cells (ESC), due to the earlier development stage of placenta.

In the present study, we are attempting to unravel the common features between the MSCs, obtained from placental chorionic villi of the first trimester, and ESC. In the light of former studies, expression analysis of a wider range ESCs-genes markers than previously as well as long-term cultures of MSCs were assessed in order to evaluate MSCs *in vitro* differentiation potential, molecular features and markers of pluripotency during the period of culture.

Materials and Methods

MSCs were obtained from 30 samples of chorionic villus and cultured to estimate their proliferative capacity, karyotyping stability and morphological characteristics. Flow cytometry was used to determine the expression of MSCs-surface antigens. Using specific culture conditions, MSCs were differentiated into adipocytes, osteoblasts, chondrocytes and neuronal cells. Specific staining of the differentiated cells and RT-PCR expression analysis of ESC-gene markers and differentiation-gene markers were followed to evaluate the differentiation success.

Results

Chorionic villi cells, which were growing easily in culture conditions, appear to be phenotypically stable and displayed typical fibroblastoid morphology. MSCs cultures were undergone 20 passages during a period of 120 days, maintaining a stable karyotype throughout long term expansion. MSCs expansion rate ranged from 1.91 logs at the earlier stages (passages 3-7), to 2.00 logs at the middle culture stages (passages 8-12) and drop at the later (passages 13-16) and latest (passages 17-20) stages at 1.14 logs and 0.74 logs respectively.

Flow cytometry analysis has shown that the chorionic villi cells were positive, for *CD90*, *CD73*, *CD105*, *CD29*, *CD44*, *HLA ABC* antigens and negative for *CD14*, *CD34*, *AC133*, and *HLA DR* antigens, over the entire period of culture.

Chorionic villi-derived MSCs were successfully differentiated in adipocytes, osteoblasts, chondrocytes and neuronal cells. Adipocyte differentiation was confirmed by *Oil Red O* staining and expression of *PPAR γ 2*, while osteogenic differentiation was assessed by mineralization of calcium accumulation-*Alizarin Red S* staining and *SPP1* (*Osteopontin*) expression, and accumulation of sulphated proteoglycans for chondrogenic differentiation documented by *Alcian Blue* staining and expression of *Sox9* specific gene. Neuronal differentiation was shown by *Cresyl Violet* staining and expression of *Nes* (neuronal marker).

The expression of the ESC-gene markers *POU5F1* (*Oct-4*) and *NANOG* was observed at earliest stages (4-12 passages), while the late stages (14-20 passages) did not presented any detectable expression levels. *ZFP42* and *SOX2* expression were not detected. Moreover, MSCs were found to express *GATA4* but not *NES* (*Nestin*).

Conclusions

Chorionic villi-derived MSCs possess multipotent properties between embryonic and adult stem cells. In the present study with the use of a wider range of markers, it was found that chorionic villi MSCs display high proliferation rate and self-renew capacity, share common surface antigens with adult MSCs and express certain embryonic stem cells gene markers. These characteristics highlight chorionic villi as an attractive source of MSCs for the needs of regenerative medicine.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Hubrecht A.A.W., et al.**, Studies on mammalian embryology. *J Microb. Sci.* 1899: 30:283-404
- [2] **Huppertz B., & Gauster M .**, Trophoblast fusion. *Adv Exp Med Biol.*, 2011: 713:81-95.
- [3] **Boyd J. D., and Hamilton W. J., et al.** The human placenta. Heffer, Cambridge, 365 pp. 1970
- [4] **Gerami-Naini B., Dovzhenko OV., Durning M., et al.** Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology.*, 2004Apr:145 (4):1517-24.
- [5] **Watari H., Ogiso Y., Abe K., Arai T., et al.** Dome formation induce by v-H-ras onogogege in human choriocarcinoma cell line. *Placenta.*, (1996): 17:443-449.
- [6] **Parolini O., Alviano F., Betz AG., et al.** Meeting report of the first conference of the International Placenta Stem Cell Society (IPLASS). *Placenta.*, 2011 Oct:32 Suppl 4:S285-90.
- [7] **Parolini O., Alviano F., Bagnara GP., et al.** Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *C. Stem Cells.*, 2008 Feb:26(2):300-11.
- [8] **Genbacev O., Lamb JD., Prakobphol A., et al.** Human trophoblast progenitors: where do they reside? *Semin Reprod Med.*, 2013 Jan:31(1):56-61.
- [9] **James JL., Stone PR., Chamley LW., et al.** The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod Update.*, 2006 Mar-Apr:12(2):137-44.
- [10] **Carter AM., & Pijnenborg R., et al.** Evolution of invasive placentation with special reference to non-human primates. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 2011 Jun:25(3):249-57

- [11] **Giakoumopoulos M., Golos TG., et al.** Embryonic stem cell-derived trophoblast differentiation: a comparative review of the biology, function, and signaling mechanisms. *J Endocrinol.*, 2013 Feb 25:216(3)
- [12] **Pijnenborg R., Robertson WB., Brosens I., et al.** Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta.*, 1981 Jan-Mar:2(1):71-91
- [13] **Kingdom J., Huppertz B., Seaward G., et al.** Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2000 Sep:92(1):35-43
- [14] **Aplin JD., et al.** Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. *Int J Dev Biol.*, 2010:54(2-3):323 -9.
- [15] **Knöfler M., Pollheimer J., et al.,** Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet.*, 2013 Sep 26:4:190
- [16] **Loregger T., Pollheimer J., Knofler M., et al.,** Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast- a review. *Placenta.*, 2003:104-110.
- [17] **Baczyk D., Dunk C., Huppertz B., et al.** Bi-potential behaviour of cytotrophoblast in first trimester chorionic villi. *Placenta.*, 2005:27:367-374.
- [18] **Saito S., Sakai M., et al.** Th1/ Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol.*, 2003: 59: 161-173.
- [19] **Baczyk D., Satkunaratnam A., Nait-Oumesmar B., et al.** Complex patterns of GCMI mRNA and protein in villus and extravillous trophoblast cells of the human placenta. *Placenta.*, 2004: 25: 553-559
- [20] **Bischof P., Irminger-Finger I., et al.** The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2005 Jan:37(1):1-16.
- [21] **Zipori D., et al.** The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells.*, 2005 Jun-Jul; 23(6):719-26

- [22] **Delorme B., Basire A., Gentile C., et al.** Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost.*, 2005 Dec:94(6):1270-9.
- [23] **Brooke G., Rossetti T., Pelekanos R., et al.** Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Br J Haematol.*, 2009 Feb:144(4):571-9
- [24] **Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D., et al.** Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells.*, 2004:22(5):649-58
- [25] **Battula VL., Bareiss PM., Trembl S., et al.** Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation.*, 2007 Apr:75(4):279-91
- [26] **Portmann-Lanz CB., Schoeberlein A., Huber A., et al.** Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol.*, 2006 Mar:194(3):664-73.
- [27] **Soncini M., Vertua E., Gibelli L., et al.** Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med.*, 2007 Jul-Aug:1(4):296-305
- [28] **Zhang X., Miao Z., Jin J., et al.** Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.*, 2006 Sep:30(9):681-7.
- [29] **Pasquinelli G., Tazzari P., Ricci F., et al.** Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastruct Pathol.*, 2007 Jan-Feb:31(1):23-31
- [30] **Tamagawa T., Ishiwata I., Ishikawa H., et al.** Induced in-vitro differentiation of neural-like cells from human amnion-derived fibroblast-like cells. *Hum Cell.*, 2008 May:21(2):38-45

- [31] **Alviano F., Fossati V., Marchionni C., et al.** Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.*, 2007 Feb 21:7:11
- [32] **Zhao P., Ise H., Hongo M., et al.** Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation.*, 2005 Mar 15:79(5):528-35
- [33] **Miki T., Marongiu F., Ellis E., et al.** Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.*, 2007 Nov:Chapter 1:Unit 1E.3
- [34] **Harun R., Ruban L., Matin M., et al.** Cytotrophoblast stem cell lines derived from human embryonic stem cells and their capacity to mimic invasive implantation events. *Hum Reprod.*, 2006 Jun:21(6):1349-58
- [35] **Gerami-Naini B., Dovzhenko OV., Durning M., et al.** Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology.*, 2004 Apr:145(4):1517-24
- [36] **Abdulrazzak H., Moschidou D., Jones G., et al.** Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *R Soc Interface.*, 2010 December 6: 7(Suppl 6): S689–S706
- [37] **Bianco Paolo., et al.** “Mesenchymal” Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.*, 2014: 30: 677-704.
- [38] **Naomi D'souza., Filippo Rossignoli., Giulia Golinelli., et al.** Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies *BMC Med.*, 2015: 13: 186
- [39] **Nichols J, Smith A., et al.** The origin and identity of embryonic stem cells. *Development.*, 2011 Jan:138(1):3-8.
- [40] **Klimanskaya I., Chung Y., Becker S., et al.** Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat Protoc.*, 2007:2:1963–1972
- [41] **Thomson JA ., Itskovitz-Eldor J., Shapiro SS., et al.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science.*, 1998: 282:1145-1147.

- [42] **Andrews W., et al.** *Peter Book Review J Anat.*, 2005 December: 207(6): 823–824
- [43] **Lo Bernard & Parham Lindsay.** Ethical Issues in Stem Cell Research *Endocr Rev.*, 2009 May:30(3): 204–213.
- [44] **Freed CR., et al.** Will embryonic stem cells be a useful source of dopamine neurons for transplant into patients with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2002: 99: 1755-1757.
- [45] **Wulf GG., Jakson KA., Goodell MA., et al.** Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol.*, 2001: 29: 1361-1370.
- [46] **Krause DS., et al.** Plasticity of marrow- derived stem cells. *Gene Ther.*, 2002: 9:754-758
- [47] **Guillot PV., Gotherstrom C., Chan J., et al.,** Human first trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells.*, 2007:25 (3): 646-654
- [48] **Sterneckert J., Höing S., Schöler HR., et al.** Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway. *Stem Cells.*, 2012 Jan: 30(1):15-21.
- [49] **Alvarez C., Lavandeira M., Garcia-Rendueles M., et al.** Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol.*, 2012: 49 (2): R89-R111.
- [50] **Evans MJ., Kaufman MH., et al.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.*, 1981 Jul 9:292(5819):154-6.
- [51] **Pera MF., Reubinoff B., Trounson A., et al.** Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.*, 2000: 113: 5-10
- [52] **Silva J., Smith A., et al.** Capturing Pluripotency. *Cell.*, 2008 February: 22:132(4).
- [53] **Chambers I., Tomlinson R.S., et al.** The transcriptional foundation of pluripotency *Development.*, 2009: 136(14): 2311–2322

- [54] **Dahéron L., Opitz SL., Zaehres H., et al.** LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells.*, 2004: 22(5):770-8.
- [55] **Xu, R. H., Chen X., Li D. S., et al.** BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.*, 2002 :12 : 1261-1264
- [56] **Ivanova NB., Dimos JT., Schaniel C., et al.** A stem cell molecular signature. *Science.*, 2002 Oct 18: 298 (5593):601-4.
- [57] **Abdelalim E.M., Tooyama I., et al.** NPR-A regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells *Cell. Death Dis.*, 2012(3): e12.
- [58] **Richly H., Aloia L., Di Croce L., et al.** Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell Death Dis.*, 2011 Sep 1:2:e204.
- [59] **Romeo F., Costanzo F., Agostini M., et al.** Embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells: two faces of the same coin? *Aging (Albany NY).*, 2012 Dec:4(12):878-86
- [60] **Pan GJ., Chang ZY., Schöler HR., et al.** Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.*, 2002 Dec:12(5-6):321-9.
- [61] **Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., et al.** Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.*, 1998 Oct 30: 95(3):379-91
- [62] **Pan G., Thomson JA., et al.** Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.*, 2007 Jan:17(1):42-9
- [63] **Chambers I., Silva J., Colby D., et al.,** Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature.*2007., Dec 20:450(7173):1230-4.
- [64] **Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., et al.** Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.*, 2007 Jun:9(6):625-35.

- [65] **Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H et al.** The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.*, 2003 May 30:113(5):631-42.
- [66] **Avilion AA., Nicolis SK., Pevny LH., et al.** Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.*, 2003 Jan 1:17(1):126-40.
- [67] **Fong H., Hohenstein KA., Donovan PJ., et al.** Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells.*, 2008 Aug:26(8):1931-8.
- [68] **Matin MM., Walsh JR., Gokhale PJ., et al.** Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells.*, 2004:22(5):659-68.
- [69] **Hay DC., Sutherland L., Clark J., et al.** Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.*, 2004:22(2):225-35.
- [70] **Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., et al.** Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells.*, 2005 Sep:23(8):1035-43
- [71] **Pera MF., Tam PP., et al.** Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature.* 2010 Jun 10:465(7299):713-20.
- [72] **Chen H., Qian K., Tang ZP., et al.** Bioinformatics and microarray analysis of microRNA expression profiles of murine embryonic stem cells, neural stem cells induced from ESCs and isolated from E8.5 mouse neural tube. *Neurol Res.*, 2010 Jul:32(6):603-13.
- [73] **Marson A., Levine SS., Cole MF., et al.** Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell.*, 2008 Aug 8:134(3):521-33.

- [74] **Kashyap V., Rezende NC., Scotland KB., et al.** Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.*, 2009 Sep 18(7):1093-108.
- [75] **Cole MF., Young RA., et al.** Mapping key features of transcriptional regulatory circuitry in embryonic stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 2008: 73:183-93
- [76] **Kim J., Chu J., Shen X., et al.** An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell.*, 2008 Mar 21:132(6):1049-61
- [77] **Suzuki MM., Bird A., et al.** DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.*, 2008 Jun:9(6):465-76.
- [78] **Farthing CR., Ficiz G., Ng RK., et al.** Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet.*, 2008 Jun 27;4(6)
- [79] **Li JY., Pu MT., Hirasawa R., et al.** Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol Cell Biol.*, 2007 Dec:27(24):8748-59
- [80] **Kellner S., Kikyo N., et al.** Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol.*, 2010 Mar:25(3):405-12.
- [81] **Taranger CK., Noer A., Sørensen AL., et al.** Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell.*, 2005 Dec:16(12):5719-35.
- [82] **Boyer LA., Lee TI., Cole MF., et al.** Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.*, 2005: Sep 23:122(6):947-56

- [83] **Niwa H., Miyazaki J., Smith AG., et al.** Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.*, 2000 Apr:24(4):372-6.
- [84] **Chambers I., Colby D., Robertson M., et al.** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.*, 2003 May 30:113(5):643-55.
- [85] **Kunath T., Strumpf D., Rossant J., et al.** Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse--a review. *Placenta.*, 2004 Apr:25 Suppl A:S32-8.
- [86] **Niwa H., et al.** Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct.*, 2001 Jun:26(3):137-48.
- [87] **Rizzino A., et al.** Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*, 2009 Sep-Oct:1(2):228-36.
- [88] **Omelyanchuk N., Orlovskaya IA., Schraufstatter IU., et al.** Key players in the gene networks guiding ESCs toward mesoderm. *J Stem Cells.*, 2009:4(3):147-60.
- [89] **Takahashi K., Yamanaka S., et al.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.*, 2006 Aug 25:126(4):663-76.
- [90] **Torres J., Watt FM., et al.,** Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol.*, 2008 Feb:10(2):194-201.
- [91] **Darr H., Mayshar Y., Benvenisty N., et al.** Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development.*, 2006 Mar:133(6):1193-201.

- [92] **Hough SR., Clements I., Welch PJ., et al.** Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog. *Stem Cells.*, 2006 Jun;24(6):1467-75.
- [93] **Zhang X., Neganova I., Przyborski S., et al.** A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *J Cell Biol.*, 2009 Jan 12;184(1):67-82.
- [94] **Rodda DJ., Chew JL., Lim LH., et al.** Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.*, 2005 Jul 1;280(26):24731-7.
- [95] **Shi W., Wang H., Pan G., et al.** Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem.*, 2006 Aug 18;281(33):23319-25.
- [96] **Pan G., Pei D., et al.** The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C terminus. *J Biol Chem.*, 2005 Jan 14; 280(2):1401-7.
- [97] **Pan G., Li J., Zhou Y., et al.** A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.*, 2006 Aug; 20(10):1730-2.
- [98] **Kuroda T., Tada M., Kubota H., et al.** Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol.*, 2005 Mar;25(6):2475-85.
- [99] **Chan YS., Yang L., Ng HH., et al.** Transcriptional regulatory networks in embryonic stem cells. *Prog Drug Res.*, 2011;67:239-52.
- [100] **Wang J., Rao S., Chu J., et al.** A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.*, 2006 Nov 16;444(7117):364-8
- [101] **Chew JL., Loh YH., Zhang W., et al.** Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.*, 2005 Jul;25(14):6031-46.

- [102] **Henderson JK., Draper JS., Baillie HS., et al.** Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells.*, 2002: 20(4):329-37.
- [103] **Toyooka Y., Shimosato D., Murakami K., et al.** Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development.*, 2008 Mar:135(5):909-18.
- [104] **Kristensen DM., Sonne SB., Ottesen AM., et al.** Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol.*, 2008 Jun 25:288(1-2):111-8
- [105] **Loh YH., Wu Q., Chew JL., et al.** The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.*, 2006 Apr:38(4):431-40.
- [106] **Boyer LA., Mathur D., Jaenisch R., et al.** Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev.*, 2006 Oct:16(5):455-62.
- [107] **Rao S., Orkin SH., et al.** Unraveling the transcriptional network controlling ES cell pluripotency. *Genome Biol.* 2006: 7(8):230.
- [108] **Wu Q., Chen X., Zhang J., et al.** Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *J Biol Chem.*, 2006 Aug 25:281(34):24090-4.
- [109] **Yang J., Chai L., Fowles TC., et al.** Genome-wide analysis reveals Sall4 to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2008 Dec 16:105(50):19756-61
- [110] **Lim CY., Tam WL., Zhang J., et al.** Sall4 regulates distinct transcription circuitries in different blastocyst-derived stem cell lineages. *Cell Stem Cell.*, 2008 Nov 6:3(5):543-54.
- [111] **Jaenisch R., Young R., et al.** Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.*, 2008 Feb 22:132(4):567-82.

- [112] **Sharov AA., Masui S., Sharova LV., et al.** Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics.*, 2008 Jun (3):9:269.
- [113] **Savatier P., Afanassieff M., et al.** Cell cycle control and self-renewal of embryonic stem cells. *J Soc Biol.*, 2002:196(1):117-23.
- [114] **Becker KA., Ghule PN., Therrien JA., et al.** Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol.* 2006 Dec: 209(3):883-93.
- [115] **White J., Dalton S., et al.** Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.*, 2005:1(2):131-8.
- [116] **Campbell PA., Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro MA., et al.** Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. *PLoS One.*, 2007 Jun 20:2(6):e553.
- [117] **Keyes WM., Wu Y., Vogel H., et al.** p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.*, 2005 Sep 1:19(17):1986-99.
- [118] **Abdelalim EM., Tooyama I., et al.** Knockdown of p53 suppresses Nanog expression in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2014 Jan 10:443(2):652-7.
- [119] **Chen K., Hsu LT., Wu CY., Chang SY., et al.** CBARA1 plays a role in stemness and proliferation of human embryonic stem cells. *PLoS One.*, 2013 May 8:8(5):e63653.
- [120] **Koledova Z., Krämer A., Kafkova LR., et al.** Cell-cycle regulation in embryonic stem cells: centrosomal decisions on self-renewal. *Stem Cells Dev.*, 2010 Nov:19(11):1663-78.

- [121] **Koledova Z., Kafkova LR., Krämer A., et al.** DNA damage-induced degradation of Cdc25A does not lead to inhibition of Cdk2 activity in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.*, 2010 Mar 31: 28(3):450-61.
- [122] **Kooreman NG., Wu JC. et al.** Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging. *J R Soc Interface.*, 2010 Dec 6:7 Suppl 6:S753-63.
- [123] **Sterneckert J., Höing S., et al.** Schöler HR., Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway. *Stem Cells.*, 2012 Jan: 30(1):15-21.
- [124] **Takahashi K., Yamanaka S., et al.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.*, 2006 Aug 25:126(4):663-76.
- [125] **Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., et al.** Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.*, 2007:2(12):3081-9.
- [126] **Marion RM., Strati K., Li H., et al.** Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.*, 2009 Feb 6:4(2):141-54
- [127] **Yu J., Vodyanik MA., Smuga-Otto K., et al.** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.*, 2007 Dec 21:318(5858):1917-20.
- [128] **Cowan CA., Atienza J., Melton DA., et al.** Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.*, 2005 Aug 26:309(5739):1369-73.
- [129] **Silva J., Chambers I., Pollard S., et al.** Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature.*, 2006 Jun 22: 441(7096):997-1001.
- [130] **Liu N., Lu M., Tian X., et al.** Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol.*, 2007 May:211(2):279-86.

- [131] **Kim JB., Zaehres H., Araúzo-Bravo MJ., et al.** Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells. *Nat Protoc.*, 2009;4(10):1464-70.
- [132] **Sterneckert J., Höing S., Schöler HR., et al.** Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway. *Stem Cells.*, 2012 Jan;30(1):15-21.
- [133] **Menendez S., Camus S., Izpisua Belmonte JC., et al.** p53: guardian of reprogramming. *Cell Cycle.*, 2010 Oct 1;9(19):3887-91.
- [134] **Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., et al.** Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.*, 2009 Aug 27;460(7259):1132-5.
- [135] **Kawamura T., Suzuki J., Wang YV., et al.** Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature.*, 2009 Aug 27;460(7259):1140-4.
- [136] **Gore A., Li Z., Fung HL., Young JE., et al.** Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature.*, 2011 Mar 3;471(7336):63-7.
- [137] **Ohm JE., Mali P., Van Neste L., et al.** Cancer-related epigenome changes associated with reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cancer Res.*, 2010 Oct 1;70(19):7662-73.
- [138] **Chin MH., Mason MJ., Xie W., et al.** Ambartsumyan G., et al., Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell.*, 2009 Jul 2;5(1):111-23.
- [139] **Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S., et al.** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.*, 2007 Jul 19;448(7151):313-7.
- [140] **Blelloch R., Wang Z., Meissner A., et al.** Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells.*, 2006 Sep;24(9):2007-13.
- [141] **Downs KM., et al.** Systematic localization of Oct-3/4 to the gastrulating mouse conceptus suggests manifold roles in mammalian development. *Dev Dyn.*, 2008 Feb;237(2):464-75.

- [142] **Huangfu D., Maehr R., Guo W., et al.** Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol.*, 2008 Jul;26(7):795-7.
- [143] **Jaishankar A., Vrana K., et al.** Emerging molecular approaches in stem cell biology. *Biotechniques.*, 2009 Apr;46(5):367-71.
- [144] **Liu SV., et al.** iPS cells: a more critical review. *Stem Cells Dev.*, 2008 Jun;17(3):391-7.
- [145] **Nguyen HT., Geens M., et al.** Genetic and epigenetic instability in human pluripotent stem cells. *Hum Reprod Update.*, 2013 Mar-Apr;19(2):187-205.
- [146] **Zhao XY., Li W., Lv Z., et al.** iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature.*, 2009 Sep 3; 461(7260):86-90.
- [147] **Kuroda T., Yasuda S., Sato Y., et al.** Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol Pharm Bull.*, 2013;36(2):189-92.
- [148] **Prockop DJ., et al.** Defining the probability that a cell therapy will produce a malignancy. *Mol Ther.*, 2010 Jul;18(7):1249-50
- [149] **Andrews PW., Martin MM., Bahrami AR., et al.** Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans.*, 2005 Dec;33(Pt 6):1526-30
- [150] **Mongan NP., Martin KM., Gudas LJ., et al.** The putative human stem cell marker, Rex-1 (Zfp42): structural classification and expression in normal human epithelial and carcinoma cell cultures. *Mol Carcinog.*, 2006 Dec;45(12):887-900
- [151] **Chiou SH., Yu CC., Huang CY., et al.** Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 2008 Jul 1;14(13):4085-95.
- [152] **Liu K., Jiang M., Lu Y., et al.** Sox2 cooperates with inflammation-mediated Stat3 activation in the malignant transformation of foregut basal progenitor cells. *Cell Stem Cell.*, 2013 Mar 7;12(3):304-15.

- [153] **Knoepfler PS., et al.** Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells.*, 2009 May:27(5):1050-6
- [154] **Palma I., Peña RY., Contreras A., et al.** Participation of OCT3/4 and beta-catenin during dysgenetic gonadal malignant transformation.. *Cancer Lett.*, 2008 May 18:263(2):204-11.
- [155] **Taapken SM., Nisler BS., Newton MA., et al.** Karotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.*, 2011 Apr:29(4):313-4.
- [156] **Ben-David U., Benvenisty N., Mayshar Y., et al.** Genetic instability in human induced pluripotent stem cells: classification of causes and possible safeguards. *Cell Cycle.*, 2010 Dec 1:9(23):4603-4
- [157] **Martins-Taylor K., Nisler BS., Taapken SM., et al.** Montgomery KD., Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.*, 2011 Jun 7:29(6):488-91
- [158] **Hart AH., Hartley L., Parker K., et al.** The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer.*, 2005 Nov 15:104(10):2092-8.
- [159] **Schipani E., Kronenberg HM., et al.** Adult mesenchymal stem cells. *StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.*, 2008-2009 Jan 31.
- [160] **Bianco P., Robey PG., Simmons PJ., et al.** Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.*, 2008 Apr 10:2(4):313-9.
- [161] **Caplan AI., et al.** Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.*, 2007 Nov:213(2):341-7.
- [162] **Prockop DJ., et al.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.*, 1997 Apr 4:276(5309):71-4.

- [163] **Jaishankar A., Barthelery M., Freeman WM., et al.** Human embryonic and mesenchymal stem cells express different nuclear proteomes. *Stem Cells Dev.*, 2009 Jun: 18(5):793-802.
- [164] **Friedenstein AJ., Gorskaja JF., Kulagina NN., et al.** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.*, 1976 Sep:4(5):267-74.
- [165] **Castro-Malaspina H., Gay RE., Resnick G., et al.** Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980 Aug:56(2):289-301.
- [166] **Piersma AH., Brockbank KG., Ploemacher RE., et al.** Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol.*, 1985 May:13(4):237-43.
- [167] **Bruder SP., Fink DJ., Caplan AI., et al.** Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994 Nov:56(3):283-94.
- [168] **Caplan AI., et al.** Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, 1991 Sep:9(5):641-5
- [169] **Phinney DG., Prockop DJ., et al.** Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells.*, 2007 Nov:25(11):2896-902.
- [170] **Minguell JJ., Erices A., Conget P., et al.** Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med .*, 2001 Jun:226(6):507-20.
- [171] **Abumaree MH., Al Jumah MA., Kalionis B., et al.** Phenotypic and functional characterization of mesenchymal stem cells from chorionic villi of human term placenta. *Stem Cell Rev.*, 2013 Feb:9(1):16-31.
- [172] **Tanaka M., Miyajima A., et al.** Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells. *Methods Mol Biol.*, 2012: 826:25-32

- [173] **Kanematsu D., Shofuda T., Yamamoto A., et al.** Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta. *Differentiation.*, 2011 Sep:82 (2):77-88.
- [174] **Pelagiadis I., Relakis K., Kalmanti L., et al.** CD133 immunomagnetic separation: effectiveness of the method for CD133(+) isolation from umbilical cord blood. *Cytotherapy.*, 2012 Jul:14(6):701-6.
- [175] **Gronthos S., Zannettino AC., et al.** Methods for the purification and characterization of human adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011:702: 109-20.
- [176] **Pittenger MF., Mackay AM., Beck SC., et al.,** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.*, 1999 Apr 2:284(5411):143-7.
- [177] **Williams JT., Southerland SS., Souza J., et al.** Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg.*, 1999 Jan:65(1):22-6.
- [178] **Grigoriadis AE., Heersche JN., Aubin JE., et al.** Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.*, 1988 Jun:106(6):2139-51.
- [179] **Crisan M., Yap S., Casteilla L., et al.** A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.*, 2008 Sep 11:3(3):301-13.
- [180] **Rogers I., Casper RF., et al.** *Umbilical cord blood stem cells.* *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 2004 Dec:18(6):893-908.
- [181] **Bieback K., Klüter H., et al.** Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 2007 Dec:2(4):310-23.
- [182] **Igura K., Zhang X., Takahashi K., et al.** Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.*, 2004: 6(6):543-53.

- [183] **Bi Y., Ehiriou D., Kilts TM., et al.** Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.*, 2007 Oct: 13(10):1219-27.
- [184] **De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., et al.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheu.*, 2001 Aug:44(8):1928-42.
- [185] **Zuk PA., et al.** The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell.*, 2010 Jun 1:21(11):1783-7.
- [186] **Zuk PA., Zhu M., Ashjian P., et al.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.*, 2002 Dec:13(12):4279-95.
- [187] **Le Blanc K., Fibbe W., et al.** A new cell therapy registry coordinated by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.*, 2008 Feb:41(3):319.
- [188] **Toubai T., Paczesny S., Shono Y., et al.** Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 2009 Dec:4(4):252-9.
- [189] **Deans RJ., Moseley AB., et al.** Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.*, 2000 Aug:28(8):875-84.
- [190] **Tocci A., Forte L., et al.** Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J.*, 2003:4(2):92-6.
- [191] **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*, 2006:8(4):315-317
- [192] **Docheva D., Padula D., Popov C., et al.** Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J Cell Mol Med.*, 2008 Apr:12(2):537-52

- [193] **Tormin A., Brune JC., Olsson E., et al.** Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets. *Cytotherapy.*, 2009;11 (2):114-28.
- [194] **Hilfiker A., Kasper C., Hass R., et al.** Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbecks Arch Surg.*, 2011 Apr;396 (4):489-97.
- [195] **Vacanti V., Kong E., Suzuki G., et al.** Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol.*, 2005 Nov;205(2):194-201.
- [196] **Oh J., Lee YD., Wagers AJ. et al.** Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med.*, 2014 Aug;20(8):870-80.
- [197] **Dhanasekaran M., Indumathi S., Rashmi M., et al.** Unravelling the retention of proliferation and differentiation potency in extensive culture of human subcutaneous fat-derived mesenchymal stem cells in different media. *Cell Prolif.*, 2012 Dec;45(6):516-26.
- [198] **Zhu Y., Song X., Wang J., et al.** Placental mesenchymal stem cells of fetal origin deposit epigenetic alterations during long-term culture under serum-free condition. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Feb;15(2):163-80.
- [199] **Kozhevnikova MN., Mikaelian AS., Paiushina OV., et al.** Comparative characterization of mesenchymal bone marrow stromal cells at early and late stages of culturing. *Izv Akad Nauk Ser Biol.*, 2008 Mar-Apr;(2):156-62.
- [200] **Kozhevnikova MN., Mikaelian AS., Starostin VI., et al.** Molecular and genetic regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells]. *Izv Akad Nauk Ser Biol.*, 2008 May-Jun;(3):261-71.
- [201] **Stenderup K., Justesen J., Clausen C., et al.** Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.*, 2003 Dec;33(6):919-26.

- [202] **Baxter MA., Wynn RF., Jowitt SN., et al.** Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells.*, 2004;22(5):675-82.
- [203] **Vilchez D., Simic MS., Dillin A., et al.** Proteostasis and aging of stem cells. *Trends Cell Biol.*, 2014 Mar;24(3):161-70.
- [204] **Yu KR., Kang KS., et al.** Aging-related genes in mesenchymal stem cells: a mini-review. *Gerontology.*, 2013;59(6):557-63.
- [205] **Wagner W., Horn P., Castoldi M., et al.** Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One.*, 2008 May 21;3(5):e2213.
- [206] **Majumdar MK., Thiede MA., Haynesworth SE., et al.** Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res.*, 2000 Dec;9(6):841-8.
- [207] **Zaim M., Karaman S., Cetin G., et al.** Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol.*, 2012 Aug; 91(8):1175-86.
- [208] **Jeon YJ., Kim J., Cho JH., et al.** Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Placenta, and Adipose Tissue as Sources of Cell Therapy. *J Cell Biochem.* 2015;Oct.
- [209] **Bellavia M., Altomare R., Cacciabauda F., et al.** Concetta Gioviale M., Lo Monte AI., Towards an ideal source of mesenchymal stem cell isolation for possible therapeutic application in regenerative medicine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2014 Sep;158(3):356-60.
- [210] **Bieback K., Brinkmann I., et al.** Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells.*, 2010 Aug 26;2(4):81-92.

- [211] **Poloni A., Maurizi G., Babini L., et al.** Human Mesenchymal stem cells from chorionic villi and amniotic fluid are not susceptible to transformation after extensive in vitro expansion. *Cell Transplantation.*, 2011:20(5):643-654.
- [212] **Igura K., Zhang X., Takahashi K., et al.** Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.*, 2004: 6(6):543-553
- [213] **Gonzalez R., Maki CB., Pacchiarotti J., et al.** Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007:362(2):491-497.
- [214] **Campagnoli C., Roberts IAG., Kumar S., et al.** Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.*, 2001:98(8): 2396-2402.
- [215] **Hua J., Yu H., Dong W., et al.** Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. *Tissue and Cell.*, 2009:41:448–455.
- [216] **Hu Y., Liao L., Wang Q., et al.** Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med.*, 2003:141(5):342-349.
- [217] **in 't Anker PS., Noort WA., Scherjon SA., et al.** Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.*, 2003:88(8):845-852.
- [218] **Tsagias N., Koliakos I., Karagiannis V., et al.** Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. *Transfusion Medicine.*, 2011:21:253–261
- [219] **Tsai MS., Lee JL., Chang YJ., et al.** Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reprod.*, 2004: 19(6):1450-1456.

- [220] **Papa K., Anagnou N., et al.** Novel Sources of Fetal Stem Cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.*, 2009;4(3):423-433.
- [221] **Can A., Karahuseyinoglu S., et al.** Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells.*, 2007; 25(11):2886-2895.
- [222] **De Coppi P., Bartsch G Jr., Siddiqui MM., et al.** Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.*, 2007; 25(1):100-106.
- [223] **Zheng C., Yang S., Guo Z., et al.** Human multipotent mesenchymal stromal cells from fetal lung expressing pluripotent markers and differentiating into cell types of three germ layers. *Cell Transplant.*, 2007;18(10):1093-1109.
- [224] **Guillot PV., O'Donoghue K., Kurata H., et al.** Fetal stem cells: betwixt and between. *Semin Reprod Med.*, 2006;24(5):340-347
- [225] **Carlin R., Davis D., Weiss M., et al.** Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol.*, 2006 Feb; 6;4:8.
- [226] **Kim J., Lee Y., Kim H., et al.,** Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif.*, 2007; 40(1):75-90
- [227] **Antonucci I., Iezzi I., Morizio E., et al.** Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol. *BMC Biotechnol.*, 2009 Feb; 16;~:9:9.
- [228] **Roubelakis MG., Pappa KI., Bitsika V., et al.** Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2007 Dec;16(6):931-52.
- [229] **Ilancheran S., Michalska A., Peh G., et al.** Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *BiolReprod.*, 2007 Sep; 77(3):577-88.

- [230] **Brooke G., Tong H., Levesque JP., et al.** Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev.*, 2008 Oct: 17(5):929-40.
- [231] **Bilic G., Zeisberger SM., Mallik AS., et al.** Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant.*, 2008:17(8):955-68.
- [232] **Díaz-Prado S., Muiños-López E., Hermida-Gómez T., et al.** Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem.*, 2010 Nov 1:111(4):846-57.
- [233] **Insausti CL., Blanquer M., García-Hernández AM., et al.** Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning.*, 2014 Mar 24:7: 53-63.
- [234] **Poloni A., Rosini V., Mondini E., et al.** Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.*, 2008:10(7):690-697
- [235] **Strakova Z., Livak M., Krezalek M., et al.** Multipotent properties of myofibroblast cells derived from human placenta. *Cell Tissue Res.*, 2008 Jun:332(3):479-88
- [236] **Antoniadou E., David AL., et al.** Placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 2015: Sep 10. pii: S1521-6934(15)00158-3
- [237] **Bárcena A., Muench MO., Kapidzic M., et al.** A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation. *Reprod Sci.*, 2009 Feb:16(2):178-87.
- [238] **Wang M., Yang Y., Yang D., et al.** The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology.*, 2009 Feb: 126(2):220-32.

- [239] **Poloni A., Maurizi G., Serrani F., et al.** Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate. *Cell Prolif.*, 2012;45(1):66-75.
- [240] **Castrechini NM., Murthi P., Gude NM., et al.** Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche. *Placenta.*, 2010;31(3):203-212.
- [241] **Demir R., Kayisli UA., Seval Y., et al.** Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta.*, 2004 Jul;25(6):560-72.
- [242] **Arakawa R., Aoki R., Arakawa M., et al.** Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. *Cell Tissue Res.*, 2012;348(1):189-197.
- [243] **Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., et al.** Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.*, 2004; 363(9419):1439-41.
- [244] **Le Blanc K., Ringdén O., et al.** Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.*, 2007 Nov;262(5):509-25.
- [245] **Marcus AJ., Woodbury D., et al.** Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med.*, 2008;12(3):730-742.
- [246] **Götherström C., West A., Liden J., et al.** Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica.*, 2005;90(8):1017-1026.
- [247] **Rolfo A., Giuffrida D., Nuzzo AM., et al.** Pro-inflammatory profile of preeclamptic placental mesenchymal stromal cells: new insights into the etiopathogenesis of preeclampsia. *PLoS One.*, 2013;8(3):e59403
- [248] **Koo BK., Park IY., Kim J., et al.** Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stromal cells from human full term placenta. *J Korean Med Sci.*, 2012 Aug;27(8):857-63.

- [249] **Fariha MM., Chua KH., Tan GC., et al.** Human chorion-derived stem cells: changes in stem cell properties during serial passage. *Cytotherapy.*, 2011 May:13(5):582-93.
- [250] **Fatimah SS., Tan GC., Chua K., et al.** Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells. *Microvasc Res.*, 2013 Mar: 86:21-9.
- [251] **Fariha MM., Chua KH., Tan GC., et al.** Pro-angiogenic potential of human chorion-derived stem cells: in vitro and in vivo evaluation. *J Cell Mol Med.*, 2013 May:17(5):681-92.
- [252] **Wan Safwani WK., Makpol S., Sathapan S., et al.** The changes of stemness biomarkers expression in human adipose-derived stem cells during long-term manipulation. *Biotechnol Appl Biochem.*, 2011 Jul-Aug:58(4):261-70.
- [253] **Roselli EA., Lazzati S., Iseppon F., et al.** Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. *Cytotherapy.*, 2013:15(11):1340-51
- [254] **Colter DC., Sekiya I., Prockop DJ., et al.** Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2001:98(14):7841-7845.
- [255] **Guo B., Rooney P., Slevin M., et al.** Overexpression of CD105 in rat myoblasts: role of CD105 in cell attachment, spreading and survival. *Int J Oncol.*, 2004:25(2):285-291.
- [256] **Bailo M., Soncini M., Vertua E., et al.** Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation.*, 2004:78 (10):1439-1448.
- [257] **Bossolasco P., Montemurro T., Cova L., et al.** Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.*, 2006 Apr:16(4):329-36.

- [258] **Tondreau T., Meuleman N., Delforge A., et al.** Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.*, 2005;23 (8):1105-1112.
- [259] **Greco SJ., Liu K., Rameshwar P., et al.** Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells.*, 2007: 25(12):3143-3154.
- [260] **Campbell PA., Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro MA., et al.** Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. *PLoS One.*, 2007;2(6):e553.
- [261] **Boiani M., Schöler HR., et al.** Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2005;6(11):872-84
- [262] **Sung HJ., Hong SC., Yoo JH., et al.** Stemness evaluation of mesenchymal stem cells from placentas according to developmental stage: comparison to those from adult bone marrow. *J Korean Med Sci.*, 2010 Oct;25(10):1418-26.
- [263] **Bhandari DR., Seo KW., Roh KH., et al.** REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. *PLoS One.*, 2010 May 5;5(5):e10493.
- [264] **Episkopou V., et al.** SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.*, 2005;28(5):219-221
- [265] **Meraviglia V., Vecellio M., Grasselli A., et al.** Human chorionic villus mesenchymal stromal cells reveal strong endothelial conversion properties. *Differentiation.*, 2012: 83(5):260-70.
- [266] **Zhao YM., Li JY., Lan JP., et al.** Cell cycle dependent telomere regulation by telomerase in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2008 May 16;369(4):1114-9.

- [267] **Kaltz N., Funari A., Hippauf S., et al.** In vivo osteoprogenitor potency of human stromal cells from different tissues does not correlate with expression of POU5F1 or its pseudogenes. *Stem Cells.*, 2008 Sep;26(9):2419-24.
- [268] **Avanzini MA., Bernardo ME., Cometa AM., et al.** Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica.*, 2009;94(12):1649-60.
- [269] **Moon JH., Lee JR., Jee BC., et al.** Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod.*, 2008;23(8):1760-1770.
- [270] **Lendahl U., Zimmerman LB., McKay RD., et al.** CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.*, 1990;23:60(4):585-595.
- [271] **Montzka K., Lassonczyk N., Tschöke B., et al.** Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.*, 2009 Mar 3:10-16.
- [272] **Hwang HS., Cho NH., Maeng YS., et al.** Differential expression of nestin in normal and pre-eclamptic human placentas. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 2007;86(8):909-914.
- [273] **Fauza D., et al.** Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 2004;18: 877-891
- [274] **Park TS., Gavina M., Chen CW., et al.** Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem Cells Dev.*, 2011 Mar;20(3):451-63.