ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σύγκριση των βιολογικών χαρακτηριστικών μεσεγχυματικών/στρωματικών κυττάρων (MSCs) από τη γέλη του Wharton πριν και μετά την κρυοκατάψυξη του ιστού με στόχο τη δημιουργία Τράπεζας Ομφαλίου Λώρου

Μακρυγιαννάκη Ειρήνη

Haemopoiesis Research Laboratory

University of Crete

Εργαστήριο Μελέτης της Αιμοποίησης
Επιστημονικά υπεύθυνη : Παπαδάκη Ελένη, Καθηγήτρια Αιματολογίας
Υπεύθυνο μέλος ΔΕΠ από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών : Χατζηνικολαΐδου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 4
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ 5
2. ABSTRACT 7
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 9
3.1.Τα βλαστικά κύτταρα 9
3.1.1 Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells-ESCs) 10
3.1.2 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα 11
- *Στρωματικά /βλαστικά Μεσεγχυματικά Κύτταρα (Mesenchymal Stromal/ Stem Cells -MSCs)* 11
- *Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (BM-MSCs)* 13
3.2 Έξω-εμβρυϊκά MSCs 14
3.2.1 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ομφάλιου λώρου (UC-MSCS) 14
- *Μεσεγχυματικά κύτταρα από την γέλη του Wharton (WJ-MSCS)* 15
- *Πλαστικότητα WJ-MSCs* 16
3.3 Η *in vitro* ικανότητα διαφοροποίησης των MSCs προς άλλες κυτταρικές σειρές 16
3.4 Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των MSCs 17
3.5 Ανοσολογικά χαρακτηριστικά των MSCs 18
3.6 Θεραπευτικές εφαρμογές των WJ-MSCs 19
3.7 Κρυοσυντήρηση κυττάρων/ιστών 20
3.7.1 Επιπτώσεις κρυοσυντήρησης 21
3.7.2 Κρυοσυντήρηση UC-MSCs. 23
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 25
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 26
5.1 Απομόνωση ιστού από την γέλη Wharton 26
5.2 Κρυοκατάψυξη της γέλης Wharton 27
5.3 Απόψυξη της γέλης Wharton 27
5.4 Μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων 28
5.5 Εκτίμηση της βιωσιμότητας των WJ-MSCs 28
5.6 Εκτίμηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των WJMSCs 29
5.7 Μελέτη των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών MSCs 29

5.8 Εκτίμηση της διαφοροποιητικής ικανότητας των WJ-MSCs 30

5.9 Εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την οστεογένεση και λιπογένεση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time -PCR) 32

5.10 Εκτίμηση της γήρανσης των καλλιεργούμενων MSCs 33

5.11 Στατιστική ανάλυση 34

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 35

6.1 Τα PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά 35

6.2 Παρόμοιο δυναμικό πολλαπλασιασμού των PRO- WJMSCs και των PT-WJMSCs..... 37

6.3 Μειωμένο μήκος τελομερών για τα PRO-WJMSCs και PT –WJMSCs 38

6.4 Τα PRO- WJMSCs και PT-WJMSCs εμφανίζουν παρόμοιο οστεογενετικό και λιπογενετικό δυναμικό διαφοροποίησης ως προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα 41

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 44

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 46

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με θέμα «Σύγκριση των βιολογικών χαρακτηριστικών μεσεγχυματικών/στρωματικών κυτάρων (MSCs) από τη γέλη του Wharton πριν και μετά την κρυοκατάψυξη του ιστού με στόχο την δημιουργία Τράπεζας Ομφαλίου Λώρου» πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης το έτος 2019-2020.

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Πρώτα από όλα, στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα Παπαδάκη Ελένη, για την συνεχή καθοδήγηση, τις ουσιώδεις συμβουλές που μου παρείχε, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, καθώς μου ανέθεσε αυτή την εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνεπιβλέπουσα της εργασίας μου, κα Χατζηνικολαΐδου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, για την συμβολή της στην τελική διαμόρφωση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κα Μπάτσαλη Αριστέα, μεταδιδακτορική ερευνήτρια, για την πολύτιμη βοήθεια της, την αμέριστη υποστήριξη και τον χρόνο που μου αφιέρωσε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υπομονή και την εμψύχωση που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά ή στρωματικά κύτταρα (Mesenchymal Stem/Stromal Cells–MSCs) μπορούν να απομονωθούν από πολλούς ιστούς του σώματος συμπεριλαμβανομένης της γέλης του Wharton (Wharton's Jelly), την πιο πλούσια πηγή MSCs του ομφαλίου λώρου. Η συνεχώς αυξανόμενη χρήση των MSCs σε κλινικές εφαρμογές καθιστά αναγκαία τη δημιουργία μιας τράπεζας MSCs έτσι ώστε να είναι διαθέσιμα και προσβάσιμα για πιθανή μελλοντική χρήση τους σε θεραπευτικές προσεγγίσεις. Κάθε τράπεζα αποθήκευσης και συντήρησης ιστών ή κυττάρων θα πρέπει να ακολουθεί ένα πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης τέτοιο ώστε να εξασφαλίζει την αποτελεσματική και ποιοτική αποθήκευση των κυττάρων ή ιστών, ώστε να παραμένουν αναλλοίωτα τα βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Με στόχο τη δημιουργία μιας τράπεζας ομφαλίου λώρου συγκρίναμε ομφαλικά MSCs προερχόμενα από τη γέλη του Wharton πριν και μετά την ψύξη και απόψυξη του ιστού. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δυο ομάδες MSCs, τα PRO-WJMSCs τα οποία απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν, με την απευθείας μέθοδο έκπτυξης και μετανάστευσης των κυττάρων σε καλλιεργητική επιφάνεια και τα PT-WJMSCs, MSCs από τον ίδιο ιστό τα οποία προέκυψαν με τη μέθοδο της έκπτυξης/μετανάστευσης μετά την ψύξη και απόψυξη της γέλης Wharton. Στη διάρκεια της μελέτης, MSCs απομονώθηκαν από τη γέλη του Wharton νεογνών πλήρους κυήσεως (n=8). Τα MSCs και στις δυο περιπτώσεις καλλιεργήθηκαν ex vivo για συνολικά εννέα ανακαλλιέργειες (Passage–P) υπό τις ίδιες συνθήκες. Μελετήθηκαν τα ανοσοφαινοτυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν τα αναπτυξιακά τους χαρακτηριστικά μέσω της εκτίμησης του χρόνου διπλασιασμού του πληθυσμού (PDs) και με τη δοκιμασία μεθυλο-τριαζολυλ-τετραζολίου (MTT) στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών. Επιπροσθέτως, η κυτταρική γήρανση αξιολογήθηκε μέσω μέτρησης του σχετικού μήκους των τελομερών. Τέλος, τα MSCs εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα διαφοροποίησης τους σε λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα. Η διαφοροποίηση αξιολογήθηκε με ιστοχημικές χρώσεις (Oil Red-O για τα λιποκύτταρα και Alizarin Red / Von Kossa για τα οστεοκύτταρα) και με την έκφραση γονιδίων ειδικών για τα λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα (PPARG, CEBPA και ALP, RUNX2, OSC, αντιστοίχως). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε πως και οι δυο ex vivo καλλιεργούμενοι MSC πληθυσμοί (PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs) εμφάνισαν

παρόμοια μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, δεν παρουσίασαν διαφορές ως προς την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα. Αναφορικά με το δυναμικό διαφοροποίησης τους ως προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις χρώσεις αλλά ούτε και στην έκφραση των ειδικών γονιδίων. Συμπερασματικά, τα μέχρι στιγμής δεδομένα συμβάλλουν ενθαρρυντικά στην δημιουργία μιας τράπεζας ομφάλιου λώρου, καθώς όπως φαίνεται η κρυοσυντήρηση της γέλης του Wharton δεν επηρεάζει τα βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των MSCs, εξασφαλίζοντας μας ένα ισχυρό εργαλείο για την χρήση τους σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο.

2. ABSTRACT

Mesenchymal Stem / Stromal Cells (MSCs) can be isolated from many tissues in the human body, including Wharton's Jelly tissue (WJ), the most abundant MSCs source in umbilical cord. The continuously increasing use of MSCs in clinical applications makes it necessary to create a bank of MSCs so that they are available and accessible for future use in therapeutic approaches. Every maintenance and storage bank of cell or tissue, should follow a cryopreservation protocol that ensures their efficient and quality storage, so that their biological and functional characteristics remain unchanged. In order to create an umbilical cord bank, we compared umbilical MSCs derived from WJ before and after tissue cryopreservation. Specifically, two groups of MSCs; the PRO-WJMSCs which were isolated and cultured, by the direct method of cell growth and migration to culture surface, and the PT-WJMSCs, MSCs from the same tissue which were obtained by the method of growth / migration after cryopreservation and thawing of Wharton Jelly. During this study, MSCs were isolated from WJ of full-term neonates (n = 8). MSCs in both cases were cultured ex vivo for a total of 9 passages (Passage – P) under the same conditions. The immunophenotypic and morphological characteristics of the cells were studied by flow cytometry. In addition, their growth characteristics were assessed by evaluating the population doubling time (PDs) and by the methyl-triazolyl-tetrazole (MTT) test during re-cultures. In addition, MSCs senescence was estimated by measuring the relative length of telomeres. Finally, MSCs were evaluated for their ability to differentiate into adipocytes and osteocytes. Differentiation was assessed by histochemical staining (Oil Red-O for adipocytes and Alizarin Red/Von Kossa for osteocytes) and by expression of specific genes for adipocytes and osteocytes (PPARG, CEBPA and ALP, RUNX2, OSC, respectively). Analysis of the results showed that both ex vivo cultured MSC populations (PRO-WJMSCs and PT-WJMSCs) exhibited similar morphological and immunophenotypic characteristics. In addition, they showed no differences in their proliferation capacity. Regarding their potential for differentiation in adipocytes and osteocytes, no significant differences were observed in staining or in the expression of specific genes. Overall, these data so far contribute encouragingly to the creation of an umbilical cord bank as it seems that, the cryopreservation of WJ does not affect the biological and functional

characteristics of MSCs, providing us with a powerful tool for their use in pre-clinical and clinical level.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1.Τα βλαστικά κύτταρα

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη των βλαστικών κυττάρων και η χρησιμότητα τους έχει ανοίξει νέους ορίζοντες στο πεδίο της ιατρικής έρευνας. Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα αυτά είναι ικανά για την θεραπεία σοβαρών νοσημάτων και ασθενειών αλλά και για αναγέννηση νοσούντων ή κατεστραμμένων ιστών. Πρόκειται για αρχέγονα μη διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως την ικανότητα της αυτοανανέωσης, αλλά και την αξιοσημείωτη ικανότητα διαφοροποίησης σε ποίκιλες κυτταρικές σειρές (Weissman, et al., 2001; Abdulrazzak, et al., 2010).

Πιο συγκεκριμένα, ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων («διαφοροποιημένων») κυττάρων, με διαφορετικές λειτουργίες, που συγκροτούνται σε ιστούς και όργανα. Κατά την ανάπτυξη του οργανισμού, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του, πολλοί από τους ιστούς αυτούς μπορούν να αυτοεπιδιορθώνονται όταν υποστούν βλάβη. Αυτή η δυνατότητα αναγέννησης και επιδιόρθωσης βασίζεται σε εφεδρικούς πληθυσμούς κυττάρων (βλαστικά κύτταρα) που διαιρούνται αργά προκειμένου να διατηρούν τον αριθμό τους, αλλά μπορούν επίσης να πολλαπλασιαστούν για να δώσουν τις πρόδρομες μορφές των ειδικών, διαφοροποιημένων κυττάρων.

Τα βλαστικά κύτταρα χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση την πλαστικότητα τους, δηλαδή το εύρος του δυναμικού διαφοροποίησης και κατηγοριοποιούνται σε: *ολοδύναμα, πλειοδύναμα, πολυδύναμα, ολιγοδύναμα, μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα* και τέλος ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα αυτοανανέωσης τους και γι' αυτό δεν συγκαταλέγονται στην κατηγορία των βλαστικών κυττάρων (De Miguel, et al., 2010).

Αναλυτικότερα, τα *ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (Totipotent Stem Cells)*, αποτελούν την πλέον αδιαφοροποίητη μορφή κυττάρων και συναντώνται στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους τύπους κυττάρων, εμβρυϊκούς και εξώ-εμβρυϊκούς, και συνεπώς μπορούν να δώσουν ένα πλήρη, βιώσιμο οργανισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός τέτοιου κυττάρου είναι το ζυγωτό. Η ολοδυναμία διατηρείται από το ζυγωτό μέχρι και τα πρώτα εμβρυϊκά

βλαστομερή, δηλαδή μέχρι την τέταρτη-κυτταρική διαίρεση. Τα *πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα (Pluripotent Stem Cells)* είναι οι απόγονοι των ολοδύναμων κυττάρων. Είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς τις τρεις εμβρυϊκές κυτταρικές σειρές: ενδοδερμική, εξωδερμική και μεσοδερμική. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να δώσουν οποιοδήποτε εμβρυϊκό ή ενήλικο ιστό, όχι όμως και εξώ-εμβρυϊκούς όπως ο πλακούντας (De Miguel, et al., 2010), με αποτέλεσμα να μην μπορούν από μόνα τους να δώσουν ένα ολόκληρο οργανισμό. Τα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα εντοπίζονται στην εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης και αναφέρονται ως εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells-ESCs). *In vivo* η παρουσία τους είναι παροδική, όμως μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* και να αναπτύσσονται επ' αόριστον σε εργαστήρια υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Τα *πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Multipotent Stem Cells)* που βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα πέραν του ενός τύπου, αλλά όχι απαραίτητα σε όλα τα κύτταρα ενός εμβρυικού στρώματος. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells - MSCs) είναι τα πιο γνωστά πολυδύναμα κύτταρα και εντοπίζονται σε ποικίλους ιστούς του οργανισμού. Τα *ολιγοδύναμα βλαστικά κύτταρα (Oligopotent Stem Cells)* ενώ μπορούν να αυτοανανεώνονται, έχουν ακόμα πιο περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης καθώς μπορούν να δώσουν δυο ή περισσότερες κυτταρικές σειρές, οι οποίες όμως ανήκουν σε ένα συγκεκριμένο είδος ιστού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων κυττάρων είναι τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν τόσο σε μυελικά όσο και σε λεμφικά κύτταρα. Τέλος, τα *μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα*, είναι τα λιγότερο ικανά αναφορικά με την διαφοροποιητική τους ικανότητα καθώς διαφοροποιούνται προς ένα μόνο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο σχηματίζοντας μια μόνο κυτταρική σειρά, παράδειγμα αποτελούν τα βλαστικά κύτταρα των μυών και των νευρώνων (Abdulrazzak, et al., 2010).

3.1.1 Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells-ESCs)

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα είναι πλειοδύναμα κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ιστούς των τριών πρωτογενών βλαστικών δερμάτων (ενδόδερμα, εξώδερμα, μεσόδερμα). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης. Πιο συγκεκριμένα, μετά την

γονιμοποίηση προκύπτει το ζυγωτό, το οποίο αρχίζει να υφίσταται κυτταρικές διαιρέσεις με την διαδικασία της μίτωσης (De Miguel, et al., 2010). Όταν ο αριθμός των κυττάρων φτάσει τα 16 τότε αυτά ενώνονται μεταξύ τους και έχουμε την δημιουργία της βλαστοκύστης, η οποία αποτελείται από δυο στρώματα κυττάρων. Το εξωτερικό της στρώμα ονομάζεται τροφοβλάστη, η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία του πλακούντα και το εσωτερικό στρώμα είναι η εσωτερική κυτταρική μάζα, η οποία θα σχηματίσει το έμβρυο και στην οποία εντοπίζονται τα ESCs (De Miguel, et al., 2010).

3.1.2 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα απαντώνται σε πολλούς ιστούς και όργανα του ανθρώπινου οργανισμού μετά την γέννηση. Θεωρούνται πολυδύναμα και συνεπώς έχουν περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε σχέση με τα ESCs. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Ο αιμοποιητικός ιστός (μυελός των οστών, περιφερικό αίμα) φιλοξενεί ένα μεγάλο πληθυσμό διαφορετικών κυττάρων στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (από τα οποία προέρχονται οι διαφορετικοί τύποι των κυττάρων του αίματος) αλλά και μη αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα όπως μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και πρόδρομα ενδοθηλιακά (Körbling & Estrov, 2003).

- ***Στρωματικά /βλαστικά Μεσεγχυματικά Κύτταρα (Mesenchymal Stromal/ Stem Cells -MSCs)***

Τα MSCs εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στον μυελό των οστών πριν από 130 χρόνια. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν αργότερα παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα προσκόλλησης σε πλαστικές επιφάνειες όταν καλλιεργούνται *in vitro*. Ακόμα διαπιστώθηκε ότι μπορούν να πολλαπλασιάζονται γρήγορα και να σχηματίζουν αποικίες με την μορφή ινοβλαστών (Friedenstein, et al., 1976). Σε περαιτέρω έρευνες αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα αυτά είναι πολυδύναμα και μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε όλες τις κυτταρικές σειρές του μεσοδέρματος (οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, λιποβλάστες) αλλά και μυοβλάστες (Chamberlain, et al., 2007).

Αν και ο μυελός των οστών, η κύρια και πιο εκτενώς μελετημένη πηγή MSCs, χαρακτηρίζεται ως το «gold standard», πλέον MSCs έχουν απομονωθεί και από

άλλους ιστούς όπως από το λιπώδη ιστό (Fraser, et al., 2006), το περιφερικό αίμα (Cao, et al., 2005), τον πνεύμονα (Griffiths, et al., 2005), το δέρμα (Young, et al., 2001), τον περιοδοντικό ιστό, την ομφαλοπλακουντιακή μονάδα, κ.ά. Εξαιτίας της ευρείας εντόπισης των MSCs στους διάφορους ιστούς θεωρείται ότι ο μυελός των οστών είναι η βασική πηγή, και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος MSCs ταξιδεύουν προς άλλους ιστούς υιοθετώντας τελικά χαρακτηριστικά έτσι ώστε να συνεισφέρουν στην διατήρηση και επιδιόρθωση του συγκεκριμένου ιστού (Tuan, et al., 2002).

Παρόλο που τα MSCs είναι πολυδύναμα και το δυναμικό διαφοροποίησης τους είναι σχετικά περιορισμένο συγκριτικά με αυτό των ESCs, αποτελούν ασφαλέστερη πηγή για εφαρμογές κυτταρικής θεραπείας καθώς εμφανίζουν μειωμένο κίνδυνο σχηματισμού όγκων και καρκινογενέσεων κατά τη μεταμόσχευση.

Αν και υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες σχετικά με τα MSCs, εντούτοις υπάρχουν ορισμένοι μελετητές που υποστηρίζουν πως τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος ενδεχομένως να μη πληρούν τα αυστηρά κριτήρια ενός στελεχιαίου/αρχέγονου κυττάρου, δηλαδή την ικανότητα της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησής προς κύτταρα διαφορετικών ιστών, ιδιότητες με σημαντικές κλινικές εφαρμογές. Έτσι, η Διεθνής Κοινότητα Κυτταρικής Θεραπείας (International Society of Cellular Therapy - ISCT), σε μια προσπάθεια τυποποίησης της ορολογίας, μείωσης της υπάρχουσας σύγχυσης και διευκόλυνσης της ερμηνείας των αποτελεσμάτων διαφόρων μελετών στο πεδίο των MSCs, καθιέρωσε τον όρο πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος (multipotent mesenchymal stem cells) (Dominici et al., 2006).

Τα ελάχιστα κριτήρια που έχουν προταθεί για την ταυτοποίηση οποιουδήποτε υπό διερεύνηση κυττάρου ως MSC, είναι τα εξής:

1) η ικανότητα προσκόλλησής τους σε πλαστικές επιφάνειες,
2) η ικανότητα διαφοροποίησης τους *in vitro* σε κυτταρικές σειρές του μεσοδέρματος (οστεοκύτταρα , λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα).
3) η θετική έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων επιφανείας CD90, CD105, CD73, CD44 και η αρνητική έκφραση των μορίων επιφανείας CD45, CD14, CD34 , CD11b, CD79a, CD19.

- ***Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (BM-MSCs)***

Ο μυελός των οστών αποτελεί το κέντρο της αιμοποίησης και όπως αναφέρθηκε αποτελεί την κύρια πηγή MSCs. Ο μυελός είναι ο μαλακός, σπογγώδης ιστός που βρίσκεται μέσα στα οστά του σώματος και κυρίως στα οστά της λεκάνης και του στέρνου. Το μικροπεριβάλλον του μυελού, αποτελείται από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων αιμοποιητικής και μη αιμοποιητικής προέλευσης (όπως τα MSCs), καθώς και εξωκυττάρια ουσία (φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες), που στηρίζουν την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών και προγονικών κυττάρων στη διάρκεια ζωής του οργανισμού.

MSCs που εντοπίζονται στον μυελό των οστών συμβάλλουν επίσης στην γένεση των κυττάρων του λιπώδους ιστού, του χόνδρου, αλλά και στα κύτταρα του οστίτη ιστού και των μυών. Αν και πληθυσμός των MSCs στον μυελό των οστών αντιπροσωπεύει μόνο το 0,001 - 0,01 % του συνολικού πληθυσμού των εμπύρηνων κυττάρων (Pittenger, et al., 1999), ωστόσο μπορούν να απομονωθούν και να εκπτυχθούν ικανοποιητικά και στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν με τη χρήση κατάλληλων επαγωγικών μέσων, προς διάφορες κυτταρικές σειρές (Deans, et al., 2000).

Θα πρέπει να αναφερθεί πως εκτός κάποιων τεχνικών παραμέτρων που αφορούν τις συνθήκες καλλιέργειας των MSCs, ένα μείζον πρόβλημα της απομόνωσης BM-MSCs αποτελεί το γεγονός πως ο αριθμός τους μειώνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας του δότη και τα κύτταρα που απομονώνονται έχουν περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης και βραχύτερο χρόνο ζωής, σε σχέση με τα ESCs (Oh, et al., 2014). Ένα ακόμα μειονέκτημα των ενήλικων BM-MSCs είναι ότι όταν αναπτύσσονται *in vitro* δεν είναι εύκολο να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Rao, et al., 2001). Τέλος, η διαδικασία λήψης μυελού είναι αρκετά επίπονη για το δότη.

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

3.2 Έξω-εμβρυϊκά MSCs

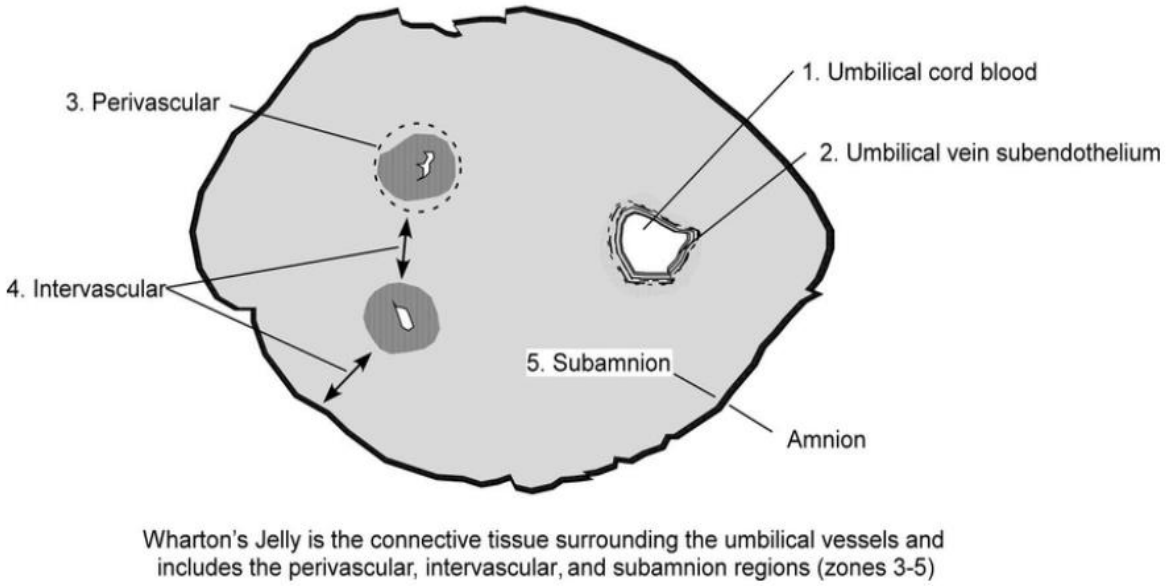
Μια εναλλακτική πηγή MSCs είναι οι έξω-εμβρυικοί ιστοί. Τα MSCs μπορούν να ληφθούν από τον ομφάλιο λώρο, τον πλακούντα, τις χοριακές λάχνες αλλά και το αμνιακό υγρό. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των ιστών είναι οι μη επεμβατικές μέθοδοι διάθεσής τους και συνεπώς η αποφυγή των ηθικών προβλημάτων που γεννώνται στην περίπτωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Ακόμα θεωρείται ότι παρουσιάζουν αυξημένη πολλαπλασιαστική και διαφοροποιητική ικανότητα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Hass, et al., 2011). Ο ομφάλιος λώρος, αποτελεί βιολογικό απόβλητο μετά τον τοκετό και τα τελευταία χρόνια έχει εγείρει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως μια πολλά υποσχόμενη πηγή απομόνωσης MSCs.

3.2.1 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ομφάλιου λώρου (UC-MSCS)

Τα στρωματικά μεσεγχυματικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου φέρουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα BM-MSCs, όπως την έκφραση ίδιων επιφανειακών δεικτών, την ικανότητα προσκόλλησης σε πλαστική επιφάνεια, τη δυνατότητα αυτοανανέωσης αλλά και διαφοροποίησης, και το χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα του ινοβλάστη, συνεπώς κατατάσσονται στην κατηγορία των MSCs (Majore, et al., 2009).

Πλέον ο ομφάλιος λώρος αποτελεί μια πλούσια πηγή MSCs των οποίων οι θεραπευτικές ιδιότητες αξιολογούνται ενεργά σε προ-κλινικές και κλινικές δοκιμές.
Ο ομφάλιος λώρος αποτελείται από δυο αρτηρίες και μία φλέβα οι οποίες περιβάλλονται από βλεννώδη συνδετικό ιστό, την λεγόμενη γέλη του Wharton (Wharton Jelly), και καλύπτεται εξωτερικά από αμνιακό επιθήλιο. MSCs έχουν απομονωθεί από διάφορα τμήματα του ιστού (***Εικόνα 1***).

Ειδικότερα, MSCs έχουν απομονωθεί από το αίμα του ομφάλιου λώρου, από το ενδοθήλιο των ομφαλικών αγγείων και από τη γέλη του Wharton. Η γέλη του Wharton εντοπίζεται στην περιοχή γύρω και ενδιάμεσα από τα ομφαλικά αγγεία. Έχει βρεθεί ότι τα UC-MSCs παρουσιάζουν υψηλότερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό σε σχέση με τα BM-MSCs (Baksh, et al., 2004). Δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα αν τα MSCs τα οποία απομονώνονται από τις διαφορετικές περιοχές του ομφάλιου λώρου αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς πληθυσμούς (Karahuseyinoglu, et al., 2007).



Εικόνα 1.*Πέντε διαφορετικές περιοχές από τις οποίες έχουν απομονωθεί MSCs.*
Περιοχή 1:Το ομφαλικό αίμα. Περιοχή 2:Το ενδοθήλιο της ομφαλικής φλέβας. Περιοχή 3: Το εξωτερικό στρώμα των αγγείων(περιαγγειακή περιοχή). Περιοχή 4:ενδοαγγειακό διάστημα. Περιοχή 5: ενδοαμνειακή περιοχή (Troyer, et al., 2008).

- ***Μεσεγχυματικά κύτταρα από την γέλη του Wharton (WJ-MSCS)***

Η Wharton jelly (WJ) ή γέλη του Wharton αποτελεί το βλεννώδη συνδετικό ιστό που υπάρχει γύρω από τις αρτηρίες και τη φλέβα του ομφάλιου λώρου. Αυτός ο συνδετικός ιστός περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Thomas Wharton το 1656. Αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου, στρωματικά κύτταρα και πρωτεογλυκάνες. Περιέχει πολύ λίγο κολλαγόνο, έναν άλλο δείκτη του πρώιμου σταδίου διαφοροποίησης του ιστού, ενώ η πιο συχνή πρωτεογλυκάνη είναι το υαλουρονικό οξύ, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη ζελατινοειδή μορφή του αλλά και για την αρχιτεκτονική δομή του ομφάλιου λώρου καθώς δημιουργεί ένα συνεχή μαλακό ιστό προστατεύοντας έτσι τα ομφαλικά αγγεία από τις πιέσεις κατά την διάρκεια της κύησης (Meyer, et al., 1983). Το υαλουρονικό οξύ αποτελεί το 70% του συνόλου των πρωτεογλυκανών, ενώ το ποσοστό άλλων, όπως η κερατίνη, η ηπαρίνη και η χονδροιτίνη είναι πολύ χαμηλό. Το ποσοστό του υαλουρονικού οξέος είναι ένα από τα μεγαλύτερα που συναντούμε σε ανθρώπινους ιστούς (Sobolewski, et al., 1997).

- ***Πλαστικότητα WJ-MSCs***

Τα MSCs που απομονώνονται από την γέλη του Wharton έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς με την προσθήκη ειδικών αυξητικών παραγόντων στα καλλιεργητικά μέσα. Ειδικότερα έχουν διαφοροποιηθεί σε οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, καρδιομυοκύτταρα (Wang, et al., 2004) και νευρώνες (Mitchell, et al., 2003). Φαίνεται ότι τα WJ-MSCs αποτελούν πολυδύναμα κύτταρα παρόμοια με τα ESCs. Αναφορές δείχνουν ότι τα WJ-MSCs εκφράζουν τους εμβρυικούς δείκτες Oct-4, Nanog και Sox -2 (Fong, et al., 2011). Πιθανώς επειδή τα κύτταρα αυτά απομονώνονται κατά τη γέννηση και το χρονικό διάστημα που τα χωρίζει από τα ESCs είναι μικρότερο σε σχέση με τα ενήλικα βλαστοκύτταρα εξηγεί το γεγονός της έκφρασης κοινών δεικτών. Μια άλλη πολύ σημαντική ένδειξη είναι ότι χρωματίζονται έντονα με τη χρωστική Hoechst και την αλκαλική φωσφατάση οι οποίες υποδηλώνουν ότι είναι πολυδύναμα κύτταρα (Carlin, et al., 2006). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των WJ-MSCs αλλά και όλων των MSCs που προέρχονται από τον ομφάλιο λώρο είναι ότι δεν σχετίζονται με την δημιουργία τερατωμάτων παρόλο που εκφράζουν κοινούς δείκτες με τα ESCs (Rachakatla, et al., 2007).

3.3 Η *in vitro* ικανότητα διαφοροποίησης των MSCs προς άλλες κυτταρικές σειρές

Τα διάφορα είδη MSCs, συμπεριλαμβανομένων των ομφαλικών, θα πρέπει να διαφοροποιούνται τουλάχιστον προς τις τρεις κυτταρικές σειρές μεσοδερμικής προέλευσης, δηλαδή προς οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, υπακούοντας στα κριτήρια των MSCs. Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν πως ομοίως με τα μυελικά, τα ομφαλικά μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται, προς πολλαπλές, μεσοδερμικές ή μη- κυτταρικές σειρές, ύστερα από κατάλληλη διέγερση (Karahuseyinoglu, et al., 2007).

Η επαγωγή της οστεογένεσης επιτυγχάνεται όταν τα MSCs επωάζονται σε καλλιεργητικό μέσο παρουσία φωσφορικού ασκορβικού οξέος, β-γλυκεροφωσφορικού οξέος, δεξαμεθαζόνης και ορού εμβρύου βοός. Η διαφοροποίηση των MSCs προς λιποκύτταρα επάγεται με επώαση των MSCs σε μέσο που περιέχει δεξαμεθαζόνη, ισοβουτυλ-μεθυλ-ξανθίνη και ινδομεθακίνη, με αποτέλεσμα την παραγωγή κυττάρων με κυστίδια πλούσια σε λιπίδια.

Τέλος τα MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν προς χονδροκύτταρα όταν στο καλλιεργητικό μέσο προστεθούν παράγοντες ανάπτυξης όπως λινολεϊκό οξύ, ορός αλβουμίνης βοός, τρανσφερίνη, ινσουλίνη, δεξαμεθαζόνη, ο παράγοντας TGF-β3 και άλλα πρόσθετα ανάλογα με τον ιστό προέλευσης (Liu, et al., 2009).
Η εκάστοτε διαφοροποίηση επαληθεύεται με κατάλληλη ιστοχημική χρώση όπως Oil Red O για τα λιποκύτταρα, von Kossa ή Alizarin Red για τα οστεοκύτταρα και Alcian Blue για τα χονδροκύτταρα. Επιπλέον εκτιμάται η έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών και κάθε κυτταρικό τύπο, όπως η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) και ο ενεργοποιημένος υποδοχέας υπεροξεισωμάτων (PPARG) για τα λιποκύτταρα, η αλκαλική φωσφατάση (ALP), η οστεοκαλσίνη (OSC) για τα οστεοκύτταρα, και η αγγρεκάνη (aggregan), το κολλαγόνο ΙΙ ή Χ για τα χονδροκύτταρα.

Πέραν της προαναφερθείσας τριδύναμης διαφοροποίησης τα MSCs μπορούν υπό κατάλληλη διέγερση να διαφοροποιηθούν και σε άλλους κυτταρικούς τύπους μη μεσοδερμικής προέλευσης. Για παράδειγμα, τα μυελικά και ομφαλικά MSCs διαφοροποιούνται επιτυχώς σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Μια μελέτη προτείνει πως τα ομφαλικά MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυϊκά σκελετικά κύτταρα, ενώ έντονη αντιπαράθεση υπάρχει για την διαφοροποίηση τους προς καρδιακά μυοκύτταρα. Επίσης μελέτες έχουν δείξει πως τα ομφαλικά κύτταρα, με κατάλληλη διέγερση, φέρουν χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων. Επιπλέον πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως τα ομφαλικά MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς τον ενδοδερμικό κυτταρικό άξονα, καθώς φάνηκε πως στην αδιαφοροποίητη κατάσταση εκφράζουν δείκτες της ηπατικής σειράς, και ύστερα από διέγερση μορφολογικά ομοιάζουν με τα ηπατοκύτταρα. Τέλος, ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση πως τα ομφαλικά MSCs έχουν υψηλότερο δυναμικό διαφοροποίησης προς κύτταρα του παγκρέατος σε σχέση με τα μυελικά (Batsali, et al., 2013).

3.4 Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των MSCs

Καθώς δεν υπάρχει ένας και μοναδικός επιφανειακός δείκτης χαρακτηριστικός για τα MSCs η ταυτοποίηση τους βασίζεται σε ένα σύνολο αντιγόνων επιφανείας, όπως αυτά έχουν οριστεί από την Διεθνή Εταιρεία Κυτταρικής Θεραπείας, που βοηθούν στην απομόνωση και τον χαρακτηρισμό τούς.

Τα ενήλικα MSCs δεν εκφράζουν τους αιμοποιητικούς δείκτες CD45, CD34, CD14 ή CD11 (De Miguel, et al., 2010), καθώς και τα συνδιεγερτικά μόρια CD80, CD86 ή CD40 και τον ενδοθηλιακό δείκτη CD31 (Chamberlain, et al., 2007). Εκφράζουν όμως τους δείκτες CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90, Thy-1, CD71, Stro-1 καθώς και τους δείκτες προσκόλλησης CD106, CD166, CD29. Η έκφραση των δεικτών μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με την πηγή των MSCs, την μέθοδο της απομόνωσης και καλλιέργειας (Chamberlain, et al., 2007).

Ένα από τα πιο σημαντικά μόρια προσκόλλησης είναι ο υαλουρονικός υποδοχέας CD44 (homing cell adhesion molecule-HCAM) ο οποίος φαίνεται να εμπλέκεται στην μετανάστευση, στην προσκόλληση, στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων (Zhu, et al., 2006) (Maleki, et al., 2014).

Ο δείκτης CD105 (ενδογλίνη-SH2) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου (TGFBR- transforming growth factor beta receptor) (Wang, et al., 2020). $CD105^{+}$ -MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα (Maleki, et al., 2014). Πρόσφατες έρευνες ωστόσο δείχνουν ότι η έκφραση $CD105^{+}$ δεν σχετίζεται άμεσα με το χονδρογονικό δυναμικό (Cleary, et al., 2016).

Ο δείκτης CD90 ο οποίος είναι γνωστός και σαν Thy-1, είναι μια γλυκοπρωτεϊνη η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυττάρων-κυττάρων αλλά και κυττάρων-εξωκυττάριας μήτρας (ECM) (Maleki, et al., 2014). Η πρωτεΐνη αυτή μοιάζει να σχετίζεται με την μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση, την κυτταρική ανάπτυξη αλλά και την διαφοροποίηση (Rege & Hagood, 2006).

Τέλος ο δείκτης CD73 είναι μια πρωτεΐνη η οποία δείχνει να σχετίζεται με την οστεογονική και χονδρογονική διαφοροποίηση (Ode, et al., 2013).

3.5 Ανοσολογικά χαρακτηριστικά των MSCs

Τα MSCs βρίσκονται ανάμεσα στους υποψήφιους κυτταρικούς πληθυσμούς για χρήση στην αναγεννητική ιατρική εξαιτίας των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους που σχετίζονται με την ανοσία. Συγκεκριμένα, έχουν την δυνατότητα να αναστείλουν διάφορες λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και να διαφύγουν της

ανοσολογικής αναγνώρισης. Αναλυτικότερα, τα MSCs είναι ικανά να καταστείλουν ποικίλες λειτουργίες, όπως αυτές των Τ-λεμφοκυττάρων, Β-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων (natural killers cells) .

Για αυτές τις λειτουργίες των MSCs απαιτείται τόσο διακυτταρική επαφή όσο και έκκριση διαλυτών παραγόντων από τα MSCs, όπως TGF-β1 (transforming growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase),νιτρικό οξύ(NO) και PGE2 (prostaglandin 2) (Zhu, et al., 2006). Ειδικότερα, αυτό συμβαίνει γιατί τα MSCs εκφράζουν ελάχιστα αντιγονικά μόρια HLA I και HLA II και δεν παρουσιάζουν καμία έκφραση συνδιεγερτικών μορίων με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται τα Τ–λεμφοκύτταρα, όμως με την απουσία συνδιεγερτικών μορίων το δευτερεύον σήμα δεν θα εμπλακεί και έτσι τα Τ- κύτταρα θα παραμείνουν αδρανή (Chamberlain, et al., 2007).

Ωστόσο υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η ανοσολογική απόκριση συμπεριφέρεται διαφορετικά ανάλογα με την πηγή των MSCs (Hass, et al., 2011). Εξαιτίας αυτών των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών, τα MSCs θεωρούνται σημαντικά εργαλεία για τη θεραπεία διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των αυτοάνοσων νοσημάτων αλλά και για την αναστολή της απόρριψης μετά από μεταμόσχευση οργάνων και την πρόληψη ή/και τη θεραπεία της νόσου μοσχεύματος κατά ξενιστή (Graft-versus-host disease - GvHD).

3.6 Θεραπευτικές εφαρμογές των WJ-MSCs

Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά των WJ-MSCs μεταξύ των οποίων η εύκολη και ανώδυνη ως προς το δότη διαδικασία λήψης τούς, τοποθετούν τα MSCs από τον ομφάλιο λώρο στο κέντρο των κυτταρικών θεραπειών ως ένα ιδιαίτερα ελκυστικό εργαλείο. Υπάρχουν πλέον αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν την ευεργετική συνδρομή των hWJ-MSCs σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις.

Σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων με Parkinson παρατηρήθηκε πως η έγχυση hWJ-MSCs οδήγησε σε αύξηση της πρωτεΐνης GNDF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), η οποία προάγει ισχυρά την επιβίωση πολλών τύπων νευρώνων (Weiss, et al., 2006), βελτιώνοντας την ένταση της νόσου σε σχέση με τους μάρτυρες. Παρομοίως, η παρουσία των hWJ-MSCS σε ποντίκια που παρουσίαζαν παθολογικές μορφές της νόσου Altzheimer, βελτίωσε αρκετά την γνωστική τους λειτουργία. Συγκεκριμένα,

φάνηκε πως τα MSCs μείωσαν το οξειδωτικό στρες στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου των ποντικών προάγοντας έτσι την νευρογένεση του (Cui, et al., 2017). Μια ακόμα μελέτη έδειξε πως η μεταμόσχευση MSCs μείωσε σημαντικά την πιθανότητα εγκεφαλικού επεισοδίου, σε αρουραίους που τους προκαλούσαν παροδική απόφραξη της δεξιάς μέσης αρτηρίας ώστε να προκληθεί εγκεφαλική ισχαιμία. Η παρουσία των MSCs φάνηκε να ενεργοποιεί τα κύτταρα της γλοίας, που είναι υπεύθυνα για τη διάδοση της νευρικής ώσης, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η νευρολογική λειτουργία μειώνοντας τη φλεγμονή (Wu, et al., 2018).

Καθώς ένα από τα χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι η ικανότητα μετανάστευσής τους σε θέσεις τραυματισμού (φλεγμονής), παρατηρήθηκε πως η συστηματική έγχυση WJ-MSCs οδήγησε στην αποκατάσταση του καρδιακού ρυθμού και των άλλων λειτουργιών της καρδιάς, σε αρουραίους έπειτα από τεχνητό έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η συστηματική αντί της ενδοκαρδιακής έγχυσης για την αποφυγή περαιτέρω βλάβης του μυοκαρδίου (Gaafar, et al., 2017).

Τέλος, η παρουσία των WJ-MSCS φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε κάποια είδη όγκων. Στις περιπτώσεις καρκίνων όπως των ωοθηκών, του μαστού και στο οστεοσάρκωμα η έγχυση hWJ-MSCS φάνηκε να αναστέλλει την καρκινική δραστηριότητα και να οδηγεί σε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Gauthaman, et al., 2012). Ωστόσο ο βαθμός βελτίωσης του όγκου δεν ήταν και στις τρεις περιπτώσεις ο ίδιος, όπως και σε μια περίπτωση καρκίνου του πνεύμονα όπου τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ενθαρρυντικά (Hendijani, et al., 2015).

Συνολικά πολλές μελέτες αποδεικνύουν την υποστηρικτική συμμετοχή των WJ-MSCS στη βελτίωση ή και θεραπεία ποικίλων παθολογικών καταστάσεων, ωστόσο θα πρέπει κάθε φορά να λαμβάνονται υπόψη και τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε νοσήματος.

3.7 Κρυοσυντήρηση κυττάρων/ιστών

Η διερεύνηση και η κατανόηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των MSCs, έχουν οδηγήσει στην αυξανόμενη χρήση τους σε ποικίλες κλινικές εφαρμογές. Πλέον η ανάγκη για πρωτόκολλα εκτενούς κρυοσυντήρησης και αποθήκευσης των MSCs για

μελλοντική χρήση είναι γεγονός. Η κρυοσυντήρηση ή κρυοδιατήρηση είναι μία διαδικασία όπου κύτταρα, ιστοί ή όργανα αποθηκεύονται για πολλά χρόνια σε θερμοκρασίες -70 °C έως -80°C σε υπερκαταψύκτες ή και μέχρι τους -196°C σε υγρό άζωτο προκειμένου να διατηρηθούν βιώσιμα.

Σε αυτές τις συνθήκες όλες οι κυτταρικές λειτουργίες αναστέλλονται, καθώς μέσα στα κύτταρα δεν υπάρχουν ελεύθερα μόρια νερού που είναι απαραίτητα για τις ενζυματικές λειτουργίες του κυττάρου, για την αναπαραγωγή βακτηρίων, ή και για την οξείδωση λιπιδίων. Επιπλέον το άζωτο είναι ένα αδρανές μόριο (δεν προκαλεί χημικές αντιδράσεις) και επομένως δεν μπορεί να βλάψει τα βιολογικά δείγματα.

3.7.1 Επιπτώσεις κρυοσυντήρησης

Η απευθείας ψύξη μπορεί να αποβεί θανατηφόρα για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Κατά την ψύξη μπορούν να σχηματιστούν ενδοκυτταρικοί κρύσταλλοι πάγου με αποτέλεσμα την παραμόρφωση του κυττάρου ή τον τραυματισμό των ενδοκυτταρικών δομών (Karlsson & & Toner, 1996). Επιπλέον, οι κρύσταλλοι πάγου μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών (λόγω της δέσμευσης μορίων νερού στο πάγο), που με τη σειρά της να οδηγήσει στην συρρίκνωση του κυττάρου και την καταστροφή του.

Η πρόκληση για τα κύτταρα δεν είναι να διατηρηθούν σε βιώσιμη κατάσταση στις χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά να αντέξουν την αλλαγή της θερμοκρασίας κατά την ψύξη και την απόψυξη. Το πρόβλημα του σχηματισμού κρυστάλλων άρχισε να λύνεται το 1949, όταν παρατηρήθηκε ότι η γλυκερόλη έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Polge, et al., 1949). Από τότε, μία ποικιλία ουσιών με κρυοπροστατευτική δράση έχουν αναφερθεί για την επιτυχή κρυοσυντήρηση κυττάρων.

Τα κρυοπροστατευτικά (cryoprotectants, CPA), είναι χημικές ουσίες, μικρού η μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες διαλύονται στο νερό, χαμηλώνουν το σημείο τήξεως του διαλύματος και παρέχουν στα κύτταρα προστασία που οφείλεται στην αλλαγή που προκαλούν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Χωρίς την παρουσία του κρυοπροστατευτικού, και με υψηλούς ρυθμούς κατάψυξης, σχεδόν το σύνολο του όγκου του νερού παγώνει. Με την προσθήκη του κρυοποροστατευτικού ο πάγος καταλαμβάνει μικρότερο μέρος του όγκου του

διαλύματος και τα κύτταρα έτσι έχουν περισσότερο χώρο διαθέσιμο για να επιβιώσουν μεταξύ των κρυστάλλων (Wowk, 2007).

Μία συγκέντρωση 5-10% του κρυοπροστατευτικού συνήθως απαιτείται για να επιτραπεί η επιβίωση ενός σημαντικού κλάσματος των απομονωμένων κυττάρων μέτη από ψύξη-απόψυξη σε υγρό άζωτο στους -196° C. Η γλυκερόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), αιθανοδιόλη και η προπανοδιόλη (Pegg, 2007) είναι κάποιες από τις ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως ως κρυοπροστατευτικά μέσα.

Μία ακόμη παράμετρος κριτικής σημασίας για την επιτυχία της κρυοσυντήρησης, είναι ο ρυθμός προσθήκης και αφαίρεσης του κρυοπροστατευτικού (δηλαδή ο ρυθμός ψύξης και απόψυξης). Καθώς προστίθεται το κρυοπροστατευτικό αυξάνεται η οσμωμοριακότητα του διαλύματος στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου, αφού μεγάλη ποσότητα νερού διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη προς τον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια, όταν το κρυοπροστατευτικό αρχίσει να εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου, το νερό ακολουθεί αντίθετη πορεία, προκαλώντας τη διόγκωση του κυττάρου. Η συγκέντρωση δηλαδή του κρυοπροστατευτικού εξισώνεται εντός και εκτός του κυττάρου και τότε τα κύτταρα επιστρέφουν στον επιθυμητό όγκο, που θα επιτρέψει την επιβίωσή τους κατά τη διαδικασία της ψύξης.

Η προσθήκη των κρυοπροστατευτικών μπορεί να γίνει σε ένα βήμα ή σταδιακά. Στην πρώτη περίπτωση το κρυοκαταψυκτικό προστίθεται απότομα και αμέσως μετά τα κύτταρα καταψύχονται, οπότε ελαττώνεται ο χρόνος κατά τον οποίο τα κύτταρα εκτίθενται σε αυτό. Αντίθετα, στην περίπτωση που το κρυοπροστατευτικό προστεθεί σταδιακά, τα κύτταρα δεν υφίστανται οσμωτικό στρες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διατηρείται ο όγκος τούς εντός των επιτρεπτών του ορίων (Gao, et al., 1995).

Επομένως, ο ρυθμός προσθήκης του κρυοπροστατευτικού θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην μεταβάλλεται δραματικά ο όγκος του κυττάρου με συνέπεια το εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου να βρίσκεται σε μία διαρκή ισορροπία. (Jang, et al., 2017)

3.7.2 Κρυοσυντήρηση UC-MSCs.

Το θεραπευτικό δυναμικό των μεσεγχυματικών κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο και η αυξανομένη χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές έχουν οδηγήσει στην άμεση και επιτακτική ανάγκη για τη δημιουργία τραπεζών φύλαξης ομφαλίου λώρου.

Παρόλο που είναι πλέον αποδεκτή η συλλογή και συντήρηση των περιγεννητικών ιστών, καθώς παγκοσμίως αποβάλλονται ως ιατρικά απόβλητα, δεν υπάρχει ένα κοινώς αποδεκτό πρωτόκολλο για τη μεθοδολογία επεξεργασίας και συντήρησης του ιστού. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι απομόνωσης και εν συνεχεία φύλαξης μέσω κατάψυξης των ομφαλικών μεσεγχυματικών, με την μηχανική έκπτυξη και μετανάστευση, και την ενζυμική απομόνωση των κυττάρων να επικρατούν.

Στην πρώτη περίπτωση μετά τη λήψη τού ο ομφάλιος λώρος επιστρώνεται σε πλαστικές καλλιεργητικές επιφάνειες και με την παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου εκπίπτουν τα κύτταρα από τον ιστό προς την καλλιεργητική επιφάνεια. Με αυτόν τον τρόπο, που απαιτεί περίπου δεκατέσσερις ημέρες απομονώνεται ένας αρκετά μεγάλος και αυτούσιος πληθυσμός UCMSCs. Εξαιτίας της παραπάνω αναμονής αλλά και για να μειωθεί το κόστος των αναλωσίμων μέχρι τη στιγμή της απομόνωσης των κυττάρων, οι τράπεζες που ακολουθούν αυτή τη μέθοδο επιλέγουν να καταψύξουν ολόκληρα κομμάτια ομφαλίου λώρου και να τα αποψύξουν, όποτε απαιτείται, απομονώνοντας κύτταρα όπως προαναφέρθηκε.

Κατά την ενζυμική επεξεργασία, η οποία χρησιμοποιείται συχνότερα, ο ιστός επεξεργάζεται με πρωτεολυτικά ένζυμα (όπως κολλαγενάση και υαλουρονιδάση) οπότε διασπάται και απελευθερώνονται τα κύτταρα. Σε αυτή την πιο σύντομη διαδικασία καταψύχεται το κυτταρικό εναιώρημα που προκύπτει. Ωστόσο η παρουσία των ενζύμων ενδεχομένως να επηρεάσει ή και να καταστρέψει τα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Επιπλέον κατά την απόψυξη του κυτταρικού εναιωρήματος θα πρέπει να μεσολαβήσουν βήματα για τον εμπλουτισμό τού σε MSCs καθώς ο πληθυσμός που προκύπτει από την ενζυμική επεξεργασία είναι ετερογενής (Skiles, et al., 2020).

Ανεξάρτητα από το είδος απομόνωσης ομφαλικών MSCs που θα επιλέξει μια τράπεζα φύλαξης είναι σημαντικό να διατηρούνται αναλλοίωτα τα χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων μετά την απόψυξη, σε σχέση με τα αντίστοιχα των μη κατεψυγμένων κυττάρων. Επιπλέον παράμετροι που εμπλέκονται σε αυτή τη

διαδικασία είναι τα κρυοπροστατευτικά μέσα που χρησιμοποιούνται, ο ρυθμός ψύξης και απόψυξης, καθώς και το τμήμα του ιστού που επιλέγεται να φυλαχθεί.

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στο πλαίσιο λειτουργίας της Δημόσιας Τράπεζας Ομφαλικών βλαστοκυττάρων Κρήτης (ΔηΤΟΒ Κρήτης), που βασίζεται στις προδιαγραφές που επιβάλλονται από την Ελληνική Νομοθεσία και τους Διεθνείς Οργανισμούς Πιστοποιήσεων για τη συλλογή, έλεγχο, επεξεργασία, συντήρηση και διάθεση των Μονάδων Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΟπΑ), στόχος είναι και η αξιοποίηση, η μελέτη και φύλαξη των μη κατάλληλων για διάθεση ΟπΑ, για μελλοντική χρήση σε κλινικές εφαρμογές προς όφελος των ασθενών.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δημιουργία μιας τράπεζας ομφαλίου λώρου στην Κρήτη. Στόχος της μελέτης είναι η σύγκριση των βιολογικών χαρακτηριστικών MSCs από τη γέλη του Wharton πριν και μετά την ψύξη του ιστού.

Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δυο ομάδες μεσεγχυματικών κυττάρων, τα PRO-WJMSCs και τα PTT-WJMSCs, τα πρώτα αναφέρονται σε WJMSCs τα οποία απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν, με την απευθείας μέθοδο έκπτυξης και μετανάστευσης των κυττάρων σε καλλιεργητική επιφάνεια ενώ τα δεύτερα αναφέρονται σε WJMSCs από τον ίδιο ιστό τα οποία προέκυψαν με τη μέθοδο της έκπτυξης/μετανάστευσης μετά την ψύξη και απόψυξη της γέλης Wharton.

Και οι δυο ομάδες κυττάρων μελετήθηκαν ως προς τις εξής παραμέτρους:

1. Τα *ex vivo* αναπτυξιακά και μορφολογικά χαρακτηριστικά
2. Την ικανότητα διαφοροποίησης τους προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα
3. Την κυτταρική γήρανση στα *ex vivo* αναπτυσσόμενα WJ-MSCs

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήσαμε WJ-MSCs από 8 τελειόμηνα νεογνά (38 ως 39 εβδομάδων).
Η μελέτη είχε λάβει έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, και ελήφθη γραπτή συγκατάθεση από τις μητέρες-δότριες του ομφάλιου λώρου, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Ελσίνκι.

5.1 Απομόνωση ιστού από την γέλη Wharton

Δείγματα ομφάλιου λώρου μήκους 15 εκατοστών μεταφέρονταν σε αποστειρωμένο δοχείο στο Εργαστήριο και διατηρούντο σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την τελική επεξεργασία (εντός 48 ωρών από τον τοκετό). Τα τμήματα του ομφάλιου λώρου κόβονταν στη συνέχεια σε μικρότερα κομμάτια μήκους 3-5 εκατοστών και πλένονταν εκτεταμένα με ισότονο διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline solution , Gibco Invitrogen). Καθένα από αυτά τα κομμάτια ανοίγονταν και απομακρύνονταν τα αιμοφόρα αγγεία ώστε να αποφευχθεί η πρόσμιξη με ενδοθηλιακά κύτταρα.
Η γέλη του Wharton - (WJ) απομονώνονταν με απόξεση από την εσωτερική πλευρά του ομφάλιου λώρου, τεμαχίζονταν σε μικρότερα κομμάτια και χωρίς περαιτέρω ενζυμική επεξεργασία, το ένα τμήμα των κομματιών τοποθετούνταν σε καλλιεργητική επιφάνεια πολυστυρενίου ενώ τα υπόλοιπα κρατούνταν για να καταψυχθούν (**5.2 Κρυοσυντήρηση της γέλης Wharton**).

Τα προσκολλώμενα κύτταρα αναμένονταν να εκπτυχθούν εντός 1-2 εβδομάδων και αναπτύσσονταν σε πλήρες καλλιεργητικό μέσο α-MEM (alpha-Minimum Essential Medium Eagle) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου (fetal bovine serum, FBS), 2 mM L-γλουταμίνη, και 100 IU/ml πενικιλλίνη-στρεπτομυκίνη (θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MSC, MSC-medium, όλα από Gibco Invitrogen), σε θερμοκρασία 37 ºC με 5% CO_2 και σε ατμόσφαιρα πλήρους υγρασίας. Η αλλαγή του καλλιεργητικού υλικού πραγματοποιούνταν δις εβδομαδιαίως. Όταν τα προσκολλημένα κύτταρα κάλυπταν το 80-90% της καλλιεργητικής επιφάνειας, αποκολλώντο με τη χρήση 0.25% trypsin-1mM EDTA (Gibco Invitrogen), και επανακαλλιεργούντο, σε συγκέντρωση 2000 κύτταρα / cm^2 σε 75cm^2 - φλάσκα, για συνολικά εννέα ανακαλλιέργειες (Passages - P).

5.2 Κρυοκατάψυξη της γέλης Wharton

Η κρυοσυντήρηση της γέλης του Wharton πραγματοποιούνταν με τη χρήση ειδικού κρυοπροστατευτικού μέσου (Cryostor CS10; ; BioLife Solutions, Bothell, WA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα περίπου 2-3 τμήματα γέλης μήκους περίπου 2 εκατοστών, μεταφέρονταν σε σωληνάρια ειδικά για βαθειά κατάψυξη με 1 ml κρυοπροστατευτικού μέσου. Τα σωληνάρια τοποθετούνταν σε ειδικά δοχεία πολυαιθυλενίου που περιέχουν ισοπροπανόλη και τοποθετούνταν για τουλάχιστον 24 ώρες στους -80 ^{o}C ώστε να επιτευχθεί βαθμιαία κατάψυξη του ιστού. Στη συνέχεια αποθηκεύονταν για τουλάχιστον δύο μήνες σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196°C). Η μεταφορά των δειγμάτων στο υγρό άζωτο δεν ξεπερνούσε τις 72 ώρες.

5.3 Απόψυξη της γέλης Wharton

Η απόψυξη των κομματιών της γέλης πραγματοποιούνταν μετά το πέρας δύο μηνών. Η απόψυξη επιτυγχάνονταν με ολιγόλεπτη εμβάπτιση και ανάδευση των σωληναρίων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 ^{o}C μέχρις ότου να μην υπάρχει ορατός πάγος. Στην συνέχεια τα τμήματα της γέλης μεταφέρονταν σε σωληνάρια που περιείχαν τουλάχιστον 10 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας και φυγοκεντρούνταν για 5 λεπτά στις 1500 rpm ώστε να αδρανοποιηθεί το κρυοπροστατευτικό μέσο. Ακολουθούσε μια ακόμα φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1500 rpm παρουσία PBS ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του κρυοπροσταυετικού μέσου. Στη συνέχεια καθένα από αυτά τα κομμάτια απλώνονταν και τεμαχίζονταν σε μικρότερα κομμάτια τα οποία τοποθετούνταν σε καλλιεργητική επιφάνεια πολυστυρενίου χωρίς περαιτέρω ενζυμική επεξεργασία.

Τα προσκολλώμενα κύτταρα αναμένονταν να εκπτυχθούν εντός 1-2 εβδομάδων και αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας, σε θερμοκρασία 37 ^{o}C, με 5% CO_2 και σε ατμόσφαιρα πλήρους υγρασίας. Η αλλαγή του καλλιεργητικού υλικού πραγματοποιούνταν δις εβδομαδιαίως. Όταν τα προσκολλημένα κύτταρα κάλυπταν το 80-90% της καλλιεργητικής επιφάνειας, αποκολλώντο με τη χρήση 0.25% trypsin-1mM EDTA (Gibco Invitrogen), και επανακαλλιεργούντο, σε συγκέντρωση 2000 κύτταρα / cm^2 σε 75cm^2 - φλάσκα, για συνολικά εννέα ανακαλλιέργειες.

5.4 Μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων

Για τη μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η βελτιωμένη πλάκα μέτρησης Neubauer και η χρωστική Trypan Blue (Gibco). Η χρωστική Trypan Blue έχει την ιδιότητα να εισέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη των αποπτωτικών/νεκρών κυττάρων και να τα χρωματίζει μπλε. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα να διακρίνονται στο μικροσκόπιο τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα. Αναλυτικά η μέτρηση των WJMSCs γινόταν με ανάμιξη 10μl δείγματος με 10μl χρωστικής Trypan Blue και λήψη 10 μl αυτού του εναιωρήματος εισάγονταν μέσω της ειδικής υποδοχής στην πλάκα Neubauer, πάνω στην οποία είχε ήδη τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Μετά από 3-5 λεπτά μετρούνταν ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων στο κεντρικό τετράγωνο συμπεριλαμβανομένων των 2 μόνο κάθετων πλευρών του, σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40X). Ο όγκος στον οποίο βρίσκονταν τα κύτταρα του εναιωρήματος που καταμετρώταν ήταν $1mm^3$ = 1mL. Επομένως η συγκέντρωση (C) στην οποία βρίσκονταν τα κύτταρα του δείγματος ήταν $C = N \times 2 \times 10^4$ κύτταρα ανά mL, όπου N είναι ο αριθμός των κυττάρων που μετρούνταν και 2 ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος με τη χρωστική Trypan Blue.

5.5 Εκτίμηση της βιωσιμότητας των WJ-MSCs

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε με ποσοτικοποίηση της ενεργότητας των μιτοχονδρίων στα καλλιεργούμενα κύτταρα μέσω της μεθόδου MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) για τις ανακαλλιέργειες P2 και P6.

Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των μεταβολικά ενεργών κυττάρων να ανάγουν το MTT, ένα κίτρινο υδατοδιαλυτό άλας τετραζολίου, με τη βοήθεια μιτοχονδριακών αφυδρογονασών και συγκεκριμένα την ηλεκτρική αφυδρογονάση, σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης. Το προϊόν αυτό συσσωρεύεται μέσα στο κύτταρο αφού δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Οι κρύσταλλοι αυτοί διαλύονται με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες ώστε να προσδιοριστεί στη συνέχεια φασματοφωτομετρικά (οπτική απορρόφηση) η ένταση της αντίδρασης, όπου όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων τετραζολίου και τόσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος από 570-630 nm. Επομένως, η δοκιμασία MTT

αντανακλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη βιωσιμότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης (growthrate) ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Πιο αναλυτικά για τη μέθοδο MTT χρησιμοποιήθηκαν πλάκες των 48-βοθρίων, και κάθε δείγμα επιστρώνονταν σε 24 βοθρία με 2500 MSCs στο καθένα. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνονταν δυο φορές εβδομαδιαίως και η χρωμομετρική δοκιμή MTT πραγματοποιούνταν τις μέρες 3, 6, 9, 12, 15, εις τριπλούν για κάθε μέρα. Την ημέρα της μέτρησης αφαιρείτο όλο το θρεπτικό υλικό και προστίθεντο 0.3ml 1mg/ml MTT σε α-MEM (απουσία ορού) ανά βοθρίο. Ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες στους 37°C / 5% CO_2. Μετά το πέρας της τετράωρης επώασης, προστίθετο 0.3 ml όξινης 2-propanol σε κάθε βοθρίο και ακολουθούσε έντονη ανάδευση ώστε να διαλυθεί το παραγόμενο φορμαζάνιο (formazan). Κάθε δείγμα μεταφερόταν σε πλάκα των 96-βοθρίων (με επίπεδο πυθμένα) και ακολουθούσε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε φωτόμετρο στα 630nm (OD630) (ELx800,Universal Microplate Reader).

5.6 Εκτίμηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των WJMSCs

Το δυναμικό πολλαπλασιασμού των καλλιεργούμενων WJ-MSCs εκτιμήθηκε με προσδιορισμό του χρόνου του κυτταρικού διπλασιασμού (Population Doublings,PD) σε όλη την διάρκεια της *ex vivo* καλλιέργειας P2-P9.

Σε κάθε ανακαλλιέργεια ο αριθμός των πολλαπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (n) υπολογίζονταν με βάση την εξίσωση **2n = Nx/N0**, όπου Nx ο αριθμός των κυττάρων που μετρούνταν στην καλλιεργητική φλάσκα μετά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και **N0** - ο αριθμός των κυττάρων που είχαν τοποθετηθεί αρχικά. Ο χρόνος (μέρες) για έναν κυτταρικό διπλασιασμό στο εκάστοτε κυτταρικό πέρασμα υπολογίστηκε ως ο λόγος της διάρκειας της καλλιέργειας σε μέρες και του αριθμού των αντίστοιχων κυτταρικών διπλασιασμών **(n).**

5.7 Μελέτη των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών MSCs

Ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των WJ-MSCs που απομονώνονταν από τα P1-P9, γινόταν με τα αντισώματα CD29 (4B4; Cyto-Stat/Beckman-Coulter, Fullerton, CA), CD44 (J173; Immunotech/Coulter, Marseille, France), CD73 (AD2; Becton Dickinson-Pharmingen, San Diego, CA), CD90 (F15.42; Immunotech/Coulter),

CD105 (SN6; C0altag, Burlingame, CA), anti-CD146 (P1H12; Becton Dickinson-Pharmingen), CD45 (IMMU19.2; Immunotech/Coulter), CD14 (RMO52; Immunotech/Coulter), CD34 (QBend10; Beckman-Coulter), CD31 (5.6E; Immunotech/Coulter), CD19 (J3-119; Immunotech/Coulter) και HLA-DR (Immu-357, Immunotech/Coulter). Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιούνταν με Beckman Coulter Cytomics FC500 (Coulter, Miami, FL, USA).

Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε κυτταρικό πέρασμα WJ-MSCs που είχαν αποκολληθεί με θρυψίνη χαρακτηρίστηκαν για τα εξής επιφανειακά αντιγόνα: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD19,CD31, CD14, HLA-DR, CD34 και CD45. Για κάθε δοκιμασία απαιτούντο τουλάχιστον $1x10^6$ κύτταρα. Μετά από πλύση των κυττάρων με PBS (φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου) και αφαίρεση του υπερκειμένου, ακολουθούσε επώαση 10 λεπτών στον πάγο με 40μl διαλύματος 20mg/ml human γ-globulins, για την ελαχιστοποίηση της μη ειδικής πρόσδεσης αντισώματος. Στη συνέχεια τα κύτταρα σημαίνονταν με τα προαναφερθέντα ποντικίσια αντι-ανθρώπεια μονοκλωνικά αντισώματα. Ύστερα από επώαση 15 λεπτών στον πάγο, τα κύτταρα πλένονταν με PBS ώστε να απομακρυνθεί η πλεονάζουσα ποσότητα αντισώματος (φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολουθούσε αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων με 200μl διαλύματος 2% παραφορμαλδεΰδης (paraformaldehyde, PFA). Τα δείγματα διατηρούνταν στους 4^oC, μέχρι την ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής.

Η ανάλυση πραγματοποιούνταν σε τουλάχιστον 100.000 κύτταρα και βασίζονταν στις εξής παραμέτρους: μέγεθος (Forward Scatter, FSC, οριζόντιος σκεδασμός), στην κοκκίωση (Side Scatter, SSC, κάθετος σκεδασμός) και στον διπλό ανοσοφθορισμό από FITC (Fluorescein isothiocyanate) και PE (phycoerythrin).

5.8 Εκτίμηση της διαφοροποιητικής ικανότητας των WJ-MSCs

MSCs μετά τη δεύτερη θρυψινοποίηση (P2), διαφοροποιούνταν σε λιποκύτταρα, και οστεοκύτταρα με τα κατάλληλα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά (Kastrinaki, et al., 2008).

- Για την επαγωγή της διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα 80,000 WJ-MSCs/cm^2 απλώνονταν σε καλλιεργητικές πλάκες των 6 βοθρίων και

αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο αποτελούμενο από Dulbecco's Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG; Gibco, Invitrogen) εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100 IU/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 0.5 mM 1-μεθυλο-3-βουτυλο-ισοξανθίνη (1-methyl-3-butylisoxanthine, IBMX), 1 μM δεξαμεθαζόνη και 60 μM ινδομεθακίνη (καλλιεργητικό μέσο λιπογένεσης). Η καλλιέργεια διαρκούσε 21 ημέρες σε συνθήκες 37ºC / 5% CO_2 και πλήρους υγρασίας, με πλήρη ανανέωση θρεπτικού δις εβδομαδιαίως. Ο χαρακτηρισμός των λιποκυττάρων πραγματοποιούνταν ιστοχημικά με Oil Red χρώση. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Oil Red χρώσης τα κύτταρα πλένονταν δυο φορές με PBS και μονιμοποιούνταν με 10% NBF (neutral-buffer formalin) για 15 λεπτά. Το μονιμοποιητικό υλικό αφαιρούνταν από τα κύτταρα και πλένονταν ξανά δις με ενέσιμο νερό (water for injection,WFI). Η παρασκευή του διαλύματος χρώσης Oil Red O γινόταν αναμιγνύοντας 6ml από το συμπυκνωμένο Oil Red O διάλυμα (0.5% σε 99% isopropanol) με 4ml WFI. Ακολουθούσε φιλτράρισμα με πορώδες φίλτρο 0,80 μm και πέντε λεπτά πριν τη χρήση, φιλτράρισμα με πορώδες φίλτρο 0,45 μm. Η χρώση εφαρμόζονταν στα κύτταρα για 20 λεπτά και μετά από δυο πλύσεις με WFI ακολουθούσε η μορφολογική αξιολόγηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

- Για την επαγωγή της διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα 40,000 WJ-MSCs/cm^2 απλώνονταν σε καλλιεργητικές πλάκες των 6 βοθρίων και αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο αποτελούμενο από D-MEM εμπλουτισμένου με 2% FBS, 100 IU/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη, 0.1 μM δεξαμεθαζόνη, 25 mg/l φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4) (καλλιεργητικό μέσο οστεογένεσης). Η καλλιέργεια διαρκούσε 14 ημέρες σε συνθήκες 37ºC / 5% CO_2 και πλήρους υγρασίας, με πλήρη ανανέωση θρεπτικού δυο φορές την εβδομάδα. Ο χαρακτηρισμός των οστεοκυττάρων πραγματοποιούνταν ιστοχημικά με τις χρώσεις Alizarin Red και Von Kossa. Αναφορικά με την χρώση της Alizarin Red το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και τα κύτταρα ξεπλένονταν δυο φορές με PBS. Τα κύτταρα μονιμοποιούνταν για 10 λεπτά με διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης (Lab-Scan, Analytical Sciences) και στη συνέχεια ξεπλένονταν δις με WFI. Στη συνέχεια ακολουθούσε η χρώση με Alizarin Red (2% w/v, pH 4.1-4.3, Sigma) για 5-10 λεπτά. Μετά

την αφαίρεση της χρωστικής ακολουθούσε πλύση των κυττάρων δυο φορές με WFI και μορφολογική εκτίμηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

Σχετικά με την χρώση της von Kossa το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και τα κύτταρα ξεπλένονταν δυο φορές με PBS. Τα κύτταρα μονιμοποιούνταν για 10 λεπτά με διάλυμα φορμαλδεϋδης (4%) και στη συνέχεια ξεπλένονταν 2 φορές με WFI. Στη συνέχεια ακολουθούσε η χρώση με Von Kossa (5% w/v υδατικό διάλυμα νιτρικού αργύρου) για 30 λεπτά, στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Την αφαίρεση της χρωστικής ακολουθούσε πλύση των κυττάρων δυο φορές με WFI και είκοσι λεπτών έκθεση των κυττάρων σε υπεριώδη ακτινοβολία (Ultraviolet light ,UV). Η διαδικασία ολοκληρώνονταν με την μορφολογική αξιολόγηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

5.9 Εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την οστεογένεση και λιπογένεση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time -PCR)

Η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την οστεογένεση και τη λιπογένεση εκτιμήθηκε σε P2 WJ-MSCs. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων οστεογένεσης: **ALP** (alkaline phosphate), **OSC** (osteocalcin), **RUNX2** (runt-related transcription factor 2) και των γονιδίων λιπογένεσης: **CEBPA** (CCAAT/enhancerbinding protein alpha), **PPARG** (peroxisome proliferator activated receptor gamma).

Ολικό RNA απομονώνονταν από P2 MSC καθώς και από διαφοροποιημένα κύτταρα. Το ολικό RNA απομονώθηκε με NucleoZOL (Macherey-Nagel),σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Από κάθε δείγμα, σε 1μg RNA γινόταν αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA με SuperScript II First -Strand cDNA synthesis kit (Invitrogen), και 40ng cDNA πολλαπλασιάζονταν σε κάθε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time Polymerase chain reaction, qRT-PCR).

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, USA) και 10μM από κάθε εκκινητή. Οι αντιδράσεις έγιναν σε Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia). Η

αντίδραση της qRT-PCR αποτελούνταν από 45 κύκλους 2 σταδίων (3 δευτερόλεπτα στους 95 ºC και 30 δευτερόλεπτα στους 60 ºC). Για την επαλήθευση της ειδικότητας των αντιδράσεων, στο τέλος κάθε PCR δημιουργούνταν μια καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) (62 ºC -95 ºC).

Σαν γονίδιο κανονικοποίησης των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Οι τιμές της έκφρασης των γονιδίων υπολογίζονταν ως $2^{-\Delta Ct}$, όπου ΔCt = Ct γονιδίου ενδιαφέροντος, Ct GAPDH. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR φαίνονται παρακάτω:

ALP	5'-CTG CAG CTT CAG AAG CTC AA-3'	5'-ACT GTG GAG ACA CCC ATC CC-3'
OSC	5'GAG GGC AGC GAG GTA GTG AAG A-3'	5'CGA TGT GGT CAG CCA ACT CG-3'
RUNXX2	5'GGC CCA CAA ATC TCA GAT CGT T-3'	5'-CAC TGG CGC TGC AAC AAG AC-3'
CEBPA	5'-AAG AAG TCG GTC GAC AAG AAC AC-3'	5-ACC GCG ATG TTG TTG CG-3
PPARG	5'TCA GGG CTG CCA GTT TCG-3'	5'GCT TTT GGC ATA CTC TGT GAT CTC-3'

5.10 Εκτίμηση της γήρανσης των καλλιεργούμενων MSCs

- *Εκτίμηση σχετικού μήκους τελομερών*

Η εκτίμηση του σχετικού μήκους των τελομερών πραγματοποιήθηκε μέσω ημι-ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Απομονώθηκε γενωμικό DNA από P2, P6,P9 MSC με QIAmp DNA mini kit (Qiagen), και με ημιποσοτική real-time PCR εκτιμήθηκε το σχετικό μήκος των τελομερών, χρησιμοποιώντας τη β-σφαιρίνη (gamma globin/ HBG) ως εσωτερικό γονίδιο ελέγχου μονογονιδιακού τόπου (single-copy-gene). Οι αντιδράσεις της PCR έγιναν με KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν 5μL γενωμικού DNA με συγκέντρωση 7ng/μL σε μια αντίδραση των 20μL, όπου το PCR διάλυμα περιείχε τους ειδικούς εκκινητές (οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10μM για τον tel1b, 100μM για των tel2b και 10μM για τους HBG1 και HBG2). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

tel1: 5′-CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT -3′;
tel2: 5′-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT -3′;
HBG1: 5′-GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC-3′;
HBG2: 5′-CACCAACTTCATCCACGTTCACC-3′.

Για την PCR με τους εκκινητές για τα τελομερή (tel1, tel2), η αντίδραση περιλάμβανε 1 κύκλο για 10λεπτά στους 95 ºC και έπειτα ακολουθούσαν 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού 2 σταδίων (15sec στους 95 ºC και 60sec στους 56 ºC). Η αντίδραση της PCR με τους εκκινητές για τη β-σφαιρίνη (HBG1, HBG2) περιλάμβανε 1 κύκλο για 10 λεπτά στους 95 ºC και ακολούθως 50 κύκλους πολλαπλασιασμού 2 σταδίων (15sec στους 95 ºC και 60sec στους 58 ºC). Οι αντιδράσεις έγιναν σε Rotor Gene 6000. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε τριπλέτες. Κάθε αντίδραση περιλάμβανε μια καμπύλη αναφοράς (standard curve) με DNA διαδοχικών αραιώσεων. Το μήκος του τελομερούς αντικατοπτρίζεται από το σχετικό πηλίκο τελομερές / single copy-gene (T/S): $T/S=2^{-\Delta CT}$ ($\Delta CT=CT_{\text{τελομερούς}} - CT_{\text{β-σφαιρίνης}}$).

5.11 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism Statistical PC program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

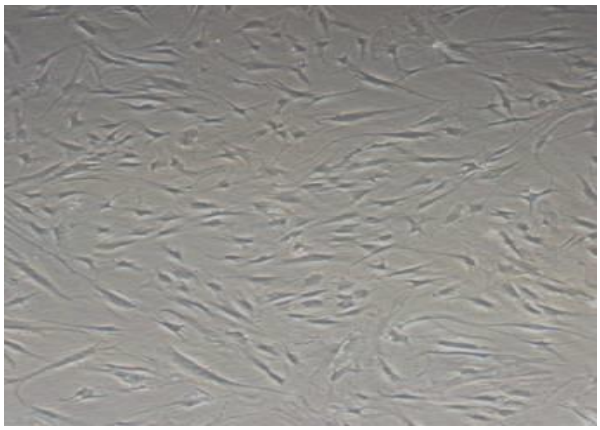
Η σύγκριση στο σύνολο των δειγμάτων μεταξύ των δυο ομάδων έγινε με την μη-παραμετρική μέθοδο Mann-Whitney U test, Αναλόγως κατά τη σύγκριση των δειγμάτων ανά ζεύγη η σύγκριση έγινε με την μη-παραμετρική μέθοδο Wilcoxon matched-pairs test. Τα δεδομένα και για τις δυο περιπτώσεις ανάλυσης εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση.

Η μέθοδος διπλής ανάλυσης μεταβλητότητας/αμφίδρομη ανάλυση διακύμασνης (two-way analysis of variance) χρησιμοποιήθηκε για να ορισθούν οι διαφορές μεταξύ της ομάδας των PRO-WJMSCs και της ομάδας των PT-WJMSCs, όσον αφορά τον κυτταρικό χρόνο διπλασιασμού κατά τη διάρκεια των ανακαλλιεργειών καθώς και την οπτική απορρόφηση από μετρήσεις που ελήφθησαν από την MTT μέθοδο στην ανακαλλιέργεια P2.

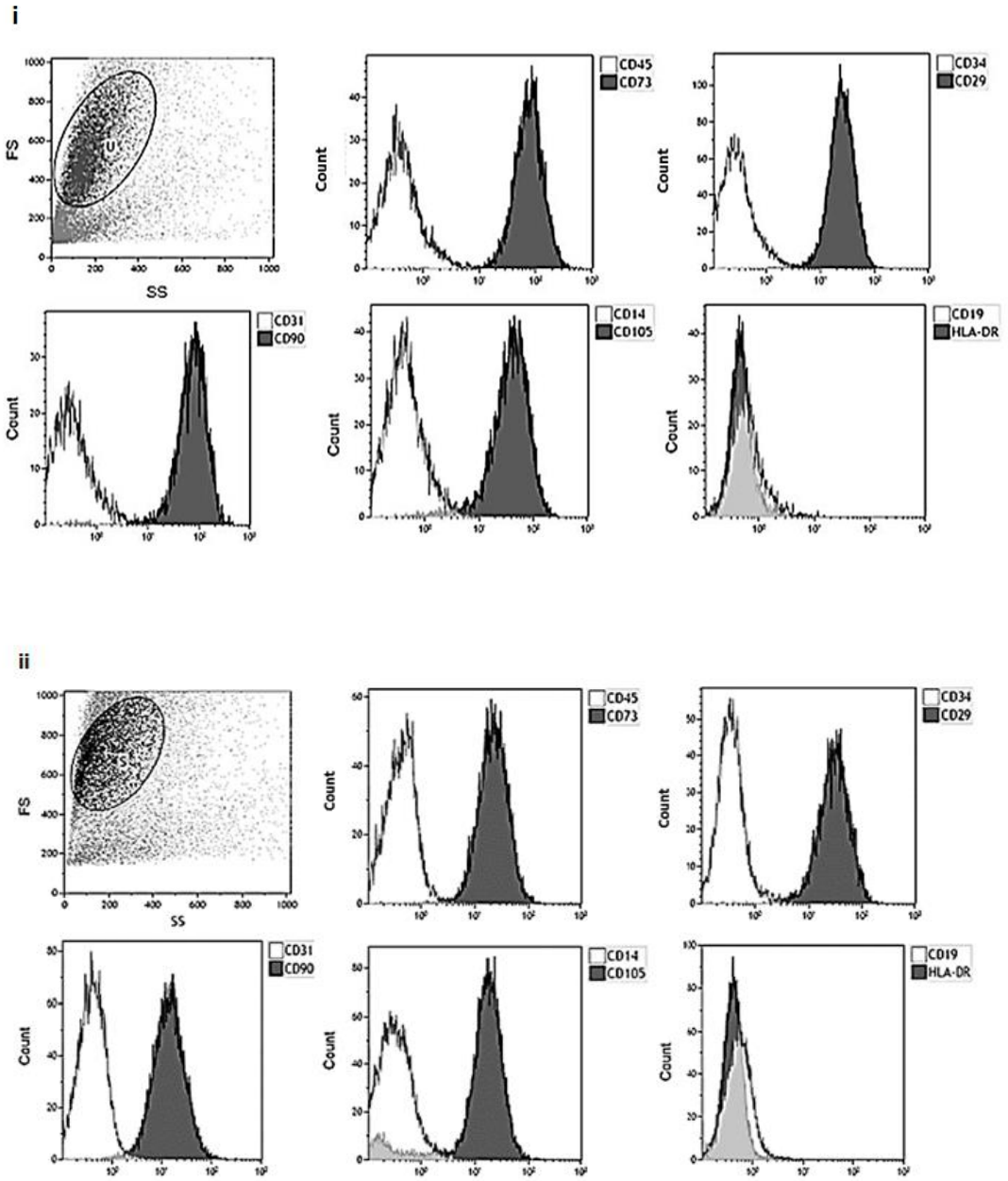
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Τα PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά

Τα WJ-MSCs που απομονώθηκαν και στις δυο περιπτώσεις χαρακτηρίζονταν από την τυπική ατρακτοειδή μορφολογία **(Εικόνα 2).** Η ανοσοφαινοτυπική τους ανάλυση (**Εικόνα 3**) στο τέλος κάθε ανακαλλιέργειας έδειξε πως, οι καλλιέργειες αποτελούνταν από έναν ομοιογενή πληθυσμό που εξέφραζε τα CD73, CD90, CD105, CD29, αντιγόνα επιφανείας, αλλά όχι τους δείκτες CD31, CD19, CD45, CD14, CD34 και HLA-DR. Το ποσοστό έκφρασης του εκάστοτε αντιγόνου δεν παρουσίασε καμιά διαφορά μεταξύ των PRO- WJMSCS και PT -WJMSCS .



Εικόνα 2: *Τα PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs χαρακτηρίζονται από την τυπική ατρακτοειδή μορφολογία*

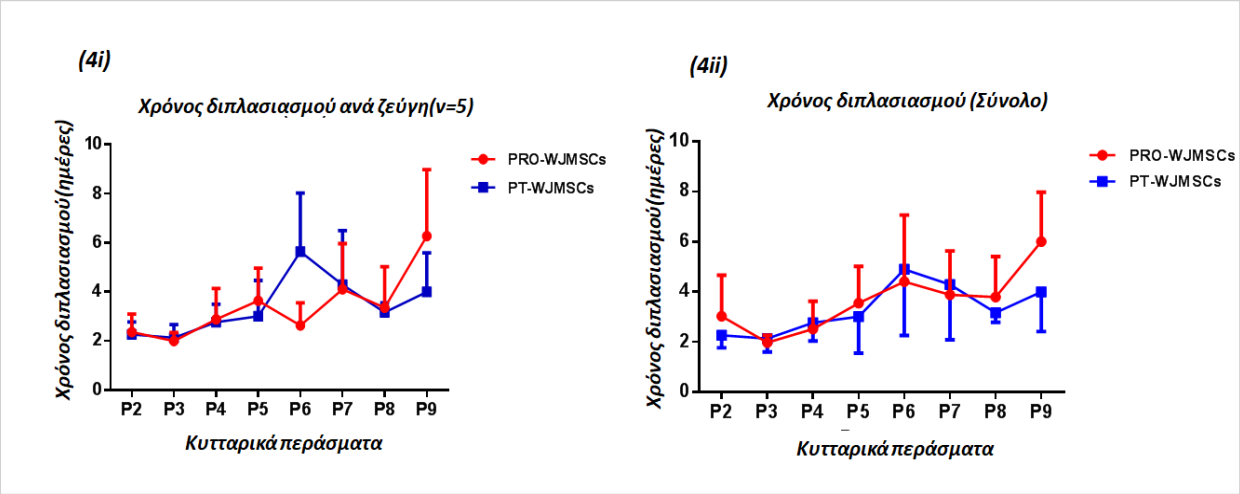


Εικόνα 3: *Ανοσοφαινότυπος καλλιεργούμενων WJ-MSCs στο P2 (i) Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση PRO-WJMSCs. (ii) Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση PT–WJMSCs. Οι καλλιέργειες και στις δυο περιπτώσεις αποτελούνταν από ομοιογενή πληθυσμό που εξέφραζε τα CD73, CD90, CD105, CD29 αντιγόνα επιφανείας, αλλά όχι τους δείκτες CD31, CD19, CD45, CD14, CD34 και HLA-DR.*

6.2 Παρόμοιο δυναμικό πολλαπλασιασμού των PRO-WJMSCs και των PT-WJMSCs

Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των WJMSCs δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον τρόπο επεξεργασίας του ιστού και την κρυοσυντήρησή του ($P < 0.05$, no statistical significance). Τα PT-WJMSCs αναπτύσσονταν με παρόμοιο ρυθμό συγκριτικά με τα PRO-WJMSCs στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών P2-P9. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται στην ***Εικόνα 4i*** ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού σε ημέρες (Wilcoxon analysis, ανάλυση ανά ζεύγη), κυμαινόταν από 2.36 ± 0,73 (P2) έως 6.27 ± 2.70 (P9) στα PRO-WJMSCs και από 2.26 ± 0.50 (P2) έως 3.99 ± 1.58(P9) ημέρες στα PT-WJMSCs.

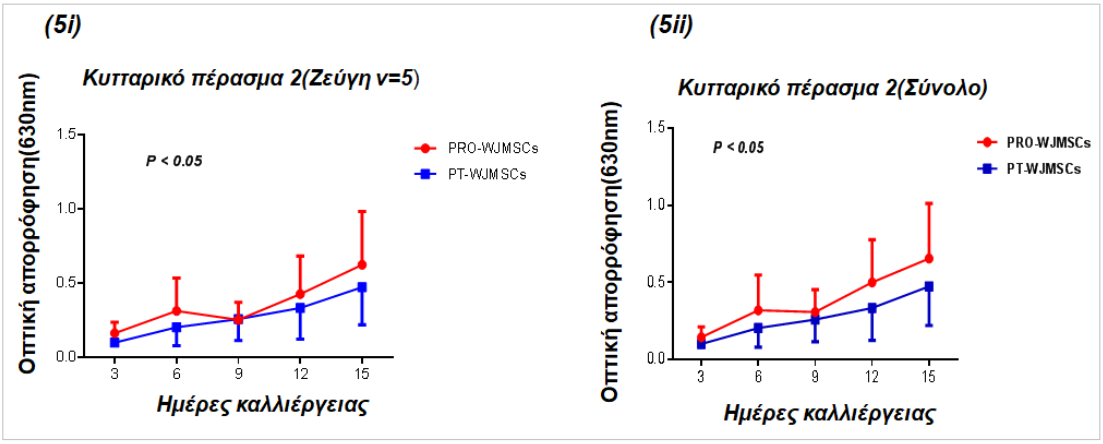
Επιπλέον, όπως φαίνεται στην ***Εικόνα 4ii*** δεν εντοπίζονται διαφορές ούτε και στο σύνολο των δειγμάτων (PRO-WJMSCs - n=8, PT-WJMSCs – n=5) στο αντίστοιχο passage (Mann Whitney, t-test). Ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού σε ημέρες κυμαινόταν από 3.02 ± 1,6 (P2) έως 6.0 ± 1.9 (P9) στα PRO-WJMSCs και από 2.26 ± 0.50 (P2) έως 3.99 ± 1.58 (P9) ημέρες στα PT-WJMSCs.



Εικόνα 4: *Ο χρόνος διπλασιασμού (population doubling, PD) σε ημέρες (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση, SD) i) για τα ζεύγη PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs (v = 5). ii) για το σύνολο των ζευγών. PRO-WJMSCs(v=8) και PT-WJMSCs (v=5), κατά τη διάρκεια των ανακαλλιεργειών (P). Ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των MSCs στο τέλος κάθε ανακαλλιέργειας, συγκρινόμενος με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων που επιστρώθηκαν στην καλλιέργεια. Η*

σύγκριση πραγματοποιήθηκε με την διπλή ανάλυση μεταβλητότητας (two-way analysis of variance).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα ήταν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέτρηση του αριθμού των μεταβολικά ενεργών MSCs με την βιοχημική μέθοδο MTT στο αντιπροσωπευτικό κυτταρικό πέρασμα P2. Όπως προέκυψε από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, το δυναμικό πολλαπλασιασμού των PRO-WJMSCs ήταν παρόμοιο στη διάρκεια 15-ημερών καλλιέργειας σε σύγκριση με τα PT-WJMSCs ($P < 0.05$) τόσο κατά την ανάλυση ανά ζεύγη όσο και στο σύνολο των δειγμάτων ***(Εικόνα 5i-ii).***



Εικόνα 5*: Αναπαράσταση της οπτικής πυκνότητας (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση, SD) συναρτήσει του αριθμού των μεταβολικά ενεργών MSC-κυττάρων στο P2 στη διάρκεια μιας καλλιέργειας 15 ημερών χρησιμοποιώντας τη χρωμομετρική μέθοδο MTT. Στην Εικόνα (i) απεικονίζεται η κατά ζεύγη ανάλυση μεταξύ των PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs (n=5). Η εικόνα (ii) συγκρίνει τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων μεταξύ του συνόλου των δειγμάτων, PRO-WJMSCs (n=8) και PT-WJMSCs (n=5) συνολικά. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διπλής ανάλυσης μεταβλητότητα (two-way analysis of variance).*

6.3 Μειωμένο μήκος τελομερών για τα PRO-WJMSCs και PT –WJMSCs

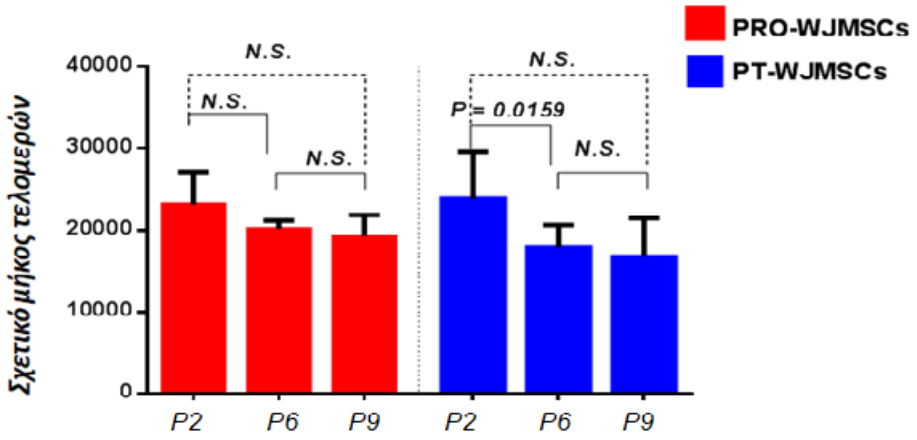
Καθώς η μέθοδος της ψύξης και απόψυξης των ιστών και των κυττάρων ενδεχομένως να επηρεάζει το ρυθμό πολλαπλασιασμού και τα καλλιεργούμενα κύτταρα να εισέλθουν σε κατάσταση κυτταρικής γήρανσης γρηγορότερα, μελετήθηκε κατά πόσο τα PT-WJMSCs ήταν πιο επιρρεπή σε αυτή συγκριτικά με τα PRO-WJMSCs, μετά την απόψυξη. Για αυτό το λόγο, εκτιμήθηκε το μήκος των τελομερών όπου, δεν

παρουσιάστηκαν διαφορές στη διάρκεια των ανακαλλιεργειών των WJMSCs σε καμία από τις δυο περιπτώσεις.

Το μέσο μήκος των τελομερών τόσο των PRO -WJMSCs όσο και των PT -WJMSCs όπως είναι αναμενόμενο ήταν αυξημένο στο P2 συγκριτικά με το P9 (***Εικόνα 6).***

Το σχετικό μήκος των τελομερών φαίνεται να μειώνεται ομαλά στην ομάδα των PRO-WJMSCs στη διάρκεια της καλλιέργειας, από το P2 στο P9. Ωστόσο παρατηρείται μια απότομη μείωση του σχετικού μήκους των τελομερών από το P2 στο P6 (P = 0.0159), στην ομάδα των PT-WJMSCs, ενώ αυτή η μείωση ομαλοποιείται στη συνέχεια της καλλιέργειας από το P6 στο P9, όπως φάνηκε κατά τη σύγκριση μεταξύ των κυτταρικών περασμάτων.

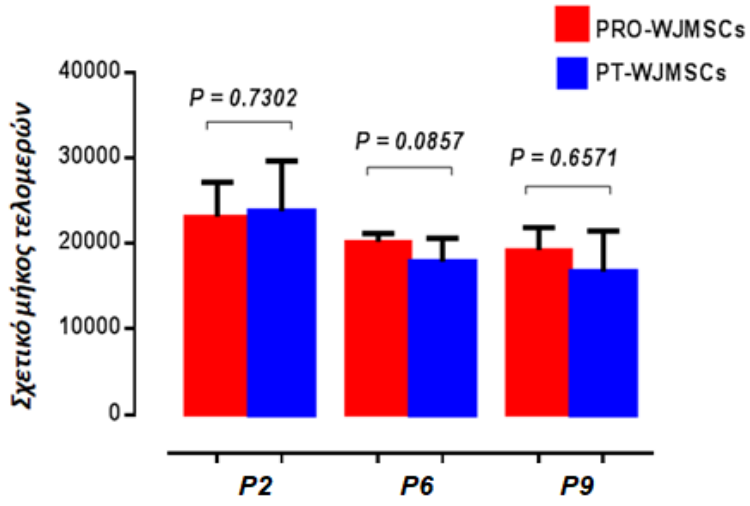
Κατά την ανά ζεύγη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs, στα τρία αντιπροσωπευτικά κυτταρικά περάσματα (P2, P6, P9) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο μήκος των τελομερών **[Πίνακας 1 και Εικόνα 7].**



Εικόνα 6 *: Η σύγκριση μεταξύ των κυτταρικών περασμάτων (P2,P6,P10) στα PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs,, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μη-παραμετρική μέθοδο Mann-Whitney U. Τα δεδομένα εκφράζονται ως η μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση και η στατιστική σημαντικότητα P, αναγράφεται.*

Ανακαλλιέργειες	Σχετικό μήκος τελομερών		
	PRO-WJMSCs	**PT-WJMSCs**	P
P2	23154 ± 4010	23782 ± 5853	N.S.
P6	20189 ± 971,1	17884 ± 2717	N.S.
P9	19251 ± 2613	16740 ± 4709	N.S.

Πίνακας 1*:Η σύγκριση σε καθένα αντιπροσωπευτικό κυτταρικό πέρασμα (P2,P6,P9) ανάμεσα στα πέντε ζευγάρια PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μη-παραμετρική μέθοδο Wilcoxon matched-pairs. Τα δεδομένα εκφράζονται ως η μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση και η στατιστική σημαντικότητα P, αναγράφεται.*

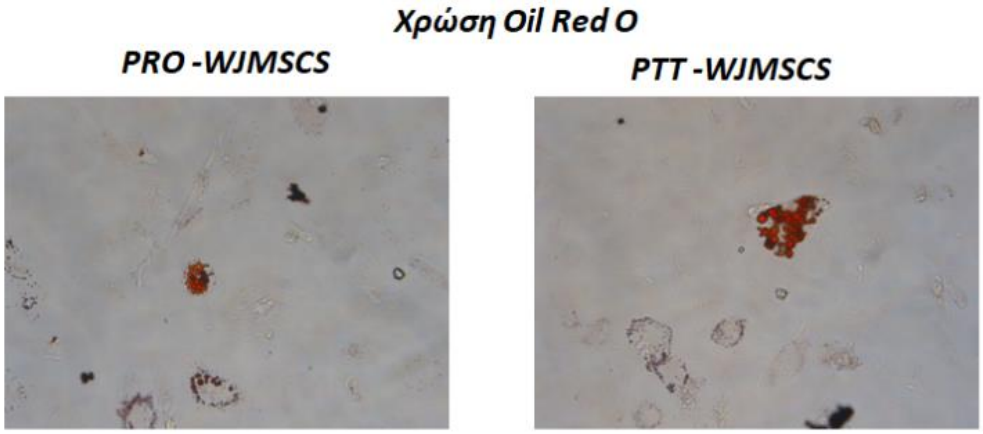


Εικόνα 7*: Η σύγκριση σε καθένα αντιπροσωπευτικό κυτταρικό πέρασμα (P2,P6,P9) ανάμεσα στα πέντε ζευγάρια PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs. . Τα δεδομένα εκφράζονται ως η μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση και η στατιστική σημαντικότητα P, αναγράφεται.*

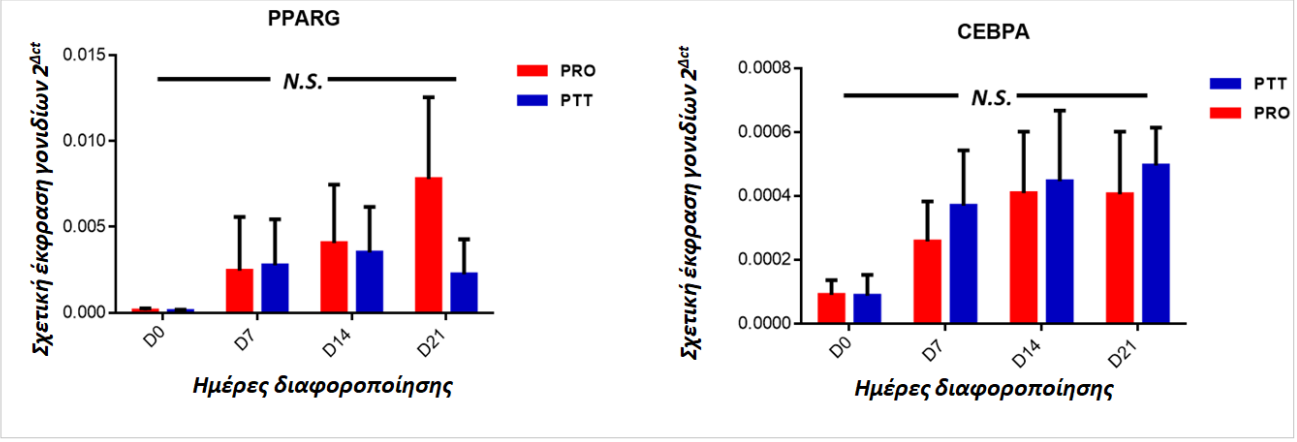
6.4 Τα PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs εμφανίζουν παρόμοιο οστεογενετικό και λιπογενετικό δυναμικό διαφοροποίησης ως προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα

Η ικανότητα διαφοροποίησης των WJMSCs προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα εκτιμήθηκε με κατάλληλες ιστοχημικές χρώσεις, αλλά και με τη μελέτη της έκφρασης ειδικών γονιδίων σχετιζόμενων με την λιπογένεση και την οστεογένεση.

Τα PT-WJMSCs παρουσίασαν παρόμοια ικανότητα διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα συγκριτικά με τα PRO -WJMSCs.Τα αποτελέσματα αυτά τεκμηριώθηκαν από την χρώση Oil Red O (**Εικόνα 8**), καθώς και από την έκφραση των γονιδίων PPARG και CEBPA (**Εικόνα 9**), δυο σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων της λιπογένεσης κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης.

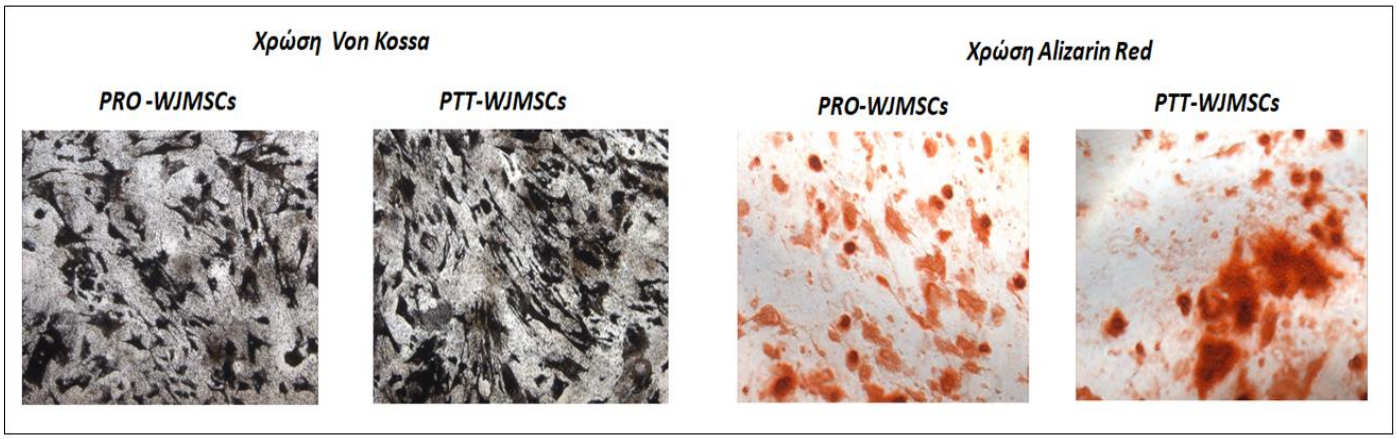


Εικόνα 8: *Η ικανότητα διαφοροποίησης των PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs προς λιποκύτταρα η οποία εκτιμήθηκε μέσω της χρώσης Oil Red O. Η ειδική για τα λιπιδικά κυστίδια χρώση δεν υποδεικνύει διαφορές ως προς το δυναμικό διαφοροποίησης των PT-WJMSCs σε λιποκύτταρα συγκριτικά με τα αντίστοιχα PRO-WJMSCs.*

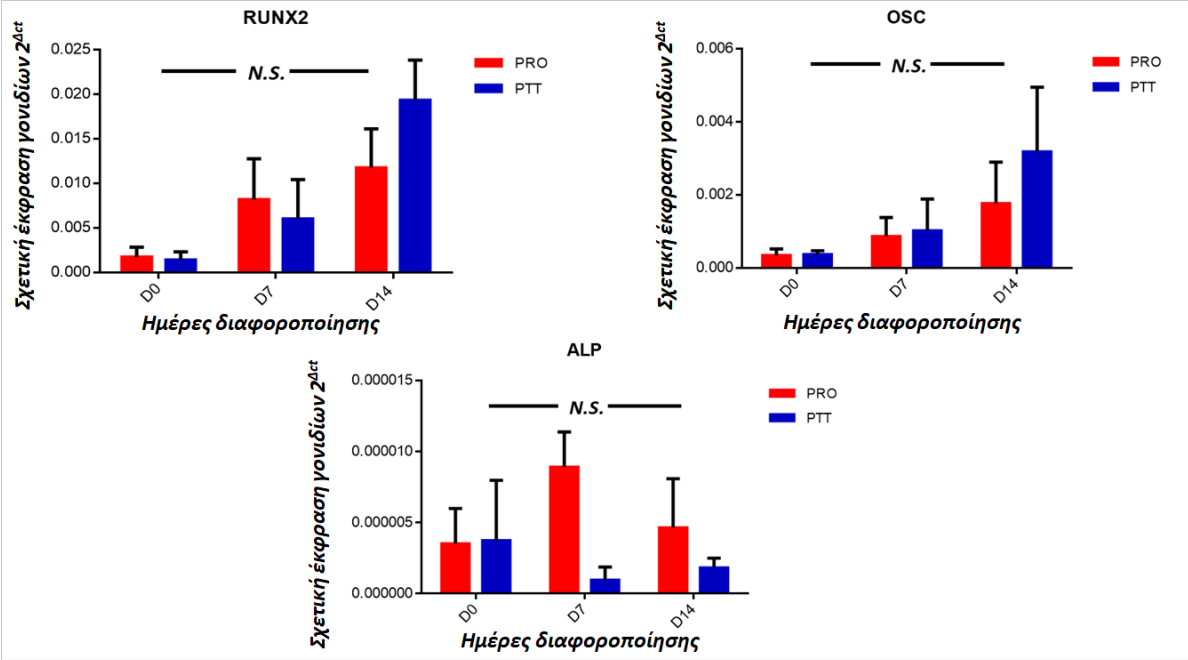


***Εικόνα 9**: Τα γραφήματα απεικονίζουν τη σχετική έκφραση (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση) των γονιδίων PPARG και CEBPA. Η σύγκριση αφορά πέντε ζεύγη PRO- WJMSCs και PT-WJMSCs πριν την έναρξη της διαφοροποίησης (Day 0) και σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά την διάρκεια της διαφοροποίηση . Η ανάλυση της έκφρασης όλων των γονιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς (με τη μέθοδο : 2-ΔCt).Η εικονιζόμενη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω αμφίδρομης ανάλυσης διακύμανσης.*

Επιπλέον, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην διαφοροποίηση των PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs ως προς οστεοκύτταρα όπως φάνηκε από την χρώση Von Kossa και Alizarin Red **(Εικόνα 10)** αλλά και από την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων RUNX2, OSC και ALP **(Εικόνα 11).**



***Εικόνα 10**: Η ικανότητα διαφοροποίησης των PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs προς οστεοκύτταρα εκτιμήθηκε μέσω της χρώσης von Kossa και alizarin . Οι ειδικές χρώσεις για τα οστεοκύτταρα δεν δείχνουν κάποια διαφορά μεταξύ των PRO-WJMSCs και των PT-WJMSCs ως προς την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας.*



Εικόνα 11*: Τα γραφήματα απεικονίζουν τη σχετική έκφραση (μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση) των γονιδίων RUNX2, OSC και ALP. Η σύγκριση αφορά πέντε ζεύγη PRO -WJMSCs και PT-WJMSCs πριν την έναρξη της διαφοροποίησης (Day 0) και σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης. Η ανάλυση της έκφρασης όλων των γονιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς (με τη μέθοδο : 2-ΔCt). Η εικονιζόμενη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω αμφίδρομης ανάλυσης διακύμανσης.*

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια τα MSCs από τον ομφάλιο λώρο έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον σε σχέση με την πιθανή εφαρμογή τους σε κυτταρικές θεραπείες, καθώς μπορούν να απομονωθούν εύκολα και χωρίς ηθικούς περιορισμούς από έναν ιστό που απορρίπτεται μετά τον τοκετό. Το θεραπευτικό δυναμικό των μεσεγχυματικών κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο και η αυξανομένη χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές έχουν οδηγήσει στην άμεση και επιτακτική ανάγκη για τη δημιουργία τραπεζών φύλαξης ομφαλίου λώρου.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δημιουργία μιας τράπεζας ομφαλίου λώρου στην Κρήτη, για το σκοπό αυτό η Δημόσια Τράπεζα Ομφαλικών βλαστοκυττάρων Κρήτης, στοχεύει στη μελέτη και φύλαξη των μη κατάλληλων για διάθεση ΟπΑ, για μελλοντική χρήση σε κλινικές εφαρμογές προς όφελος των ασθενών. Στο πλαίσιο αυτής της προσπάθειας πραγματοποιείται η πρώτη σύγκριση των βιολογικών χαρακτηριστικών MSCs από τη γέλη του Wharton πριν και μετά την ψύξη του ιστού σε δεξαμενές υγρού αζώτου (-196 ºC).

Δημιουργήθηκαν λοιπόν δυο ομάδες μεσεγχυματικών κυττάρων, τα PRO-WJMSCs και τα PT-WJMSCs, προερχόμενα από τον ίδιο ιστό, με την διαφορά ότι στη δεύτερη κατηγορία τα κύτταρα προέκυψαν μετά από ψύξη και απόψυξη του ιστού. Τα MSCs και στις δυο περιπτώσεις αναπτύχθηκαν ακριβώς υπό τις ίδιες καλλιεργητικές συνθήκες. Θέλοντας να αποκλείσουμε πιθανή ανάμιξη των WJ-MSCs από τους ποικίλους γειτονικούς πληθυσμούς MSCs του ομφαλίου λώρου, όπως από τις περιαγγειακές και τις υπο-αμνιακές περιοχές, απομακρύνθηκαν τα ομφαλικά αγγεία και ύστερα απομονώθηκε η γέλη του Wharton (WJ). Η WJ στη συνέχεια τεμαχίστηκε και τα επιμέρους τεμάχια χρησιμοποιήθηκαν ως εμφυτεύματα για τη δημιουργία μιας κυτταρικής καλλιέργειας (PRO-WJMSCs) ή κρυοκαταψύχθηκαν για τουλάχιστον δυο μήνες και στη συνέχεια μετά την απόψυξη του ιστού χρησιμοποιήθηκαν ως εμφυτεύματα για τη δημιουργία αντίστοιχης κυτταρικής καλλιέργειας (PT-WJMSCs).

Τα PRO-WJMSCs και PT-WJMSCs μελετήθηκαν συγκριτικά ως προς ποικίλες βιολογικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων των μορφολογικών και ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους, του δυναμικού πολλαπλασιασμού και

της κυτταρικής γήρανσης, μέσω της εκτίμησης του σχετικού μήκους των τελομερών, καθώς και της ικανότητάς να διαφοροποιούνται προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα.

Τα δεδομένα της μελέτης απέδειξαν πως τα ex vivo καλλιεργούμενα PT-WJMSCs εμφάνιζαν παρόμοια μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά, με τα PRO- WJMSCs. Αναφορικά με τις παραμέτρους που σχετίζονται με την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές . Επιπλέον στην περίπτωση της διαφοροποίησης ως προς λιποκύτταρα, τα PT-WJMSCS και PRO -WJMSCs δεν παρουσίασαν διαφορές όπως φάνηκε τόσο από την χρώση με Oil Red O, καθώς και από την έκφραση γονιδίων ειδικών για την λιπογένεση (PPARG και CEBPA). Σχετικά με το δυναμικό διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα, οι χρώσεις με Von Kossa και Alizarin Red δεν έδειξαν καμιά ποιοτική διαφορά ως προς την ικανότητα εναπόθεσης αλάτων (mineralization) στην εξωκυττάρια ουσία μεταξύ των διαφοροποιημένων WJMSCs όπως διαπιστώθηκε και από την ποσοτική έκφραση των σχετικών με την οστεογένεση γονιδίων (RUNX2, ALP και OSC).

Μάλιστα τα δεδομένα που προέκυψαν συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα συγκριτικά με άλλες πηγές (Batsali, et al., 2017)

Επίσης, εκτιμώντας το σχετικό μήκος των τελομερών μεταξύ των PT-WJMSCs και των PRO -WJMSCs δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη μείωση του τελομερικού μήκους στη διάρκεια της ex vivo καλλιέργειας (P2-P6-P9).

Όπως διαπιστώνεται από τα μέχρι στιγμής δεδομένα οι διαδικασίες ψύξης και απόψυξης δε φαίνεται να επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά που αφορούν τον πολλαπλασιασμό και την ικανότητα διαφοροποίησης των WJMSCs. Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν στον καλύτερο χαρακτηρισμό των WJ-MSCs και ενθαρρύνουν την δημιουργία μιας τράπεζας ομφαλίου λώρου ώστε να υπάρχει μια μόνιμη και συνεχώς προσβάσιμη πηγή MSCs εξασφαλίζοντας την ορθή χρήση τους και εφαρμογή σε ποικίλες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdulrazzak, H., Moschidou, D., Jones, G. & & Guillot, P. V., 2010. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood.

Baksh, D., Song, L. & Tuan, R. S., 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*.

Batsali, A., Kastrinaki, M. C., A Papadaki, H. & & Pontikoglou, C., 2013. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications.. *Current stem cell research & therapy,*, 1 March, pp. 144-155.

Batsali, και συν., 2017. Differential expression of cell cycle and WNT pathway-related genes accounts for differences in the growth and differentiation potential of Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research \& Therapy*, p. 102.

Cao, C., Dong, C. a., Dong, Y. a. & Yuqi, 2005. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, p. 642.

Carlin, R. και συν., 2006. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, pp. 1-13.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J., 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.. *stem cells*, pp. 2739-2749.

Cleary, M. A., Narcisi, R. & Focke, K. V. d. L. R. B. P. A. J. &. v. O. G. J. V. M., 2016. Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential. *Osteoarthritis and cartilage*.

Cui, Y. και συν., 2017. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research*, pp. 291-301.

De Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S. & & Alcaina, Y., 2010. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction.. *Stem Cell Reviews and Reports*, pp. 633-649.

Deans, Moseley, R. J. a. & B, A., 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*, August, pp. 885-884.

Dominici, Blanc, M. a. L., Mueller, K. a. & I and Slaper-Cortenbach, I. a. M. F. a. K. D. a. D. R. a. K. A. a. P. D. a. H. E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement}. *Cytotherapy*, pp. 315-317.

Fong, C. Y. και συν., 2011. Human Wharton’s jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, pp. 1-16.

Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z. & & Hedrick, M. H., 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in biotechnology*, pp. 150--154.

Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N., 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*.

Gaafar, T. και συν., 2017. Cardioprotective effects of wharton jelly derived mesenchymal stem cell transplantation in a rodent model of myocardial injury. *International journal of stem cells*, May, p. 48.

Gao, και συν., 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human reproduction*, pp. 1109--1122.

Gauthaman, και συν., 2012. Human umbilical cord wharton's jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell growth in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, 23 January, pp. 2027-2039.

Griffiths, M. J., Bonnet, D. & & Janes, S. M., 2005. Stem cells of the alveolar epithelium. *The Lancet*, pp. 249-260.

Hass, R., Kasper, C. & Böhm, S. &. J. R., 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC.. *Cell Communication and Signaling*, p. 12.

Hendijani, F., Javanmard, S. H., Rafiee, L. & & Sadeghi-Aliabadi, H., 2015. Effect of human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome on proliferation, apoptosis and drug resistance of lung cancer cells. *Research in pharmaceutical sciences*, Mar-Apr, p. 134.

Jang, και συν., 2017. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research*, March, pp. 12-18.

Karahuseyinoglu, S. et al., 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem cells*.

Karlsson, J. O. & & Toner, M., 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues.. *Biomaterials*, pp. 243-256.

Kastrinaki, και συν., 2008. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, pp. 741-749.

Körbling, M. & Estrov, Z., 2003. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept?.. *New England Journal of Medicine*, pp. 570-582.

Liu, και συν., 2009. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells.. *Journal of Cell Biology*, pp. 67-75.

Majore, I., Moretti, P., Hass, R. & Kasper, C., 2009. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Communication and Signaling*, pp. 1-8.

Maleki, M., Ghanbarvand, F. & Behvarz, M. R. E. M. &. G. E., 2014. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *International journal of stem cells*, p. 118.

Meyer, F. A., Laver-Rudich, Z. & & Tanenbaum, R., 1983. Evidence for a mechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*.

Mitchell, K. E. και συν., 2003. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem cells*, pp. 50-60.

Ode, A. και συν., 2013. CD73/5′-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells.. *Eur Cell Mater*.

Oh, Lee, J. a., Wagers, Y. D. a. & J, A., 2014. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature medicine*.

Pegg, D. E., 2007. Principles of cryopreservation. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, pp. 39-57.

Pittenger, και συν., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*.

Polge, Smith, C. a., Parkes, A. U. a. & Sterling, A., 1949. Revival ofspermatozoa after virtification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 15 October, pp. 666-666.

Rachakatla, R. S. και συν., 2007. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors.. *Cancer gene therapy*.

Rao, S, M., Mattson, a. & P, M., 2001. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mechanisms of ageing and development*, pp. 713--734.

Rege, T. A. & Hagood, J. S., 2006. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis.. *The FASEB journal*.

Skiles, M. L., Marzan, A. J., Brown, K. S. & & Shamonki, J. M., 2020. Comparison of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells isolated from cryopreserved material and extracted by explantation and digestion methods utilizing a split manufacturing model. *Cytotherapy* .

Sobolewski, K., Bańkowski, E., Chyczewski, L. & & Jaworski, S., 1997. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton’s jelly. Neonatology. *Neonatology*, pp. 11-21.

Troyer, L, D., Weiss, a. & L, M., 2008. Concise review: Wharton's Jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells*, 2 January, pp. 591--599.

Tuan, R. S., Boland, G. & & Tuli, R., 2002. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering.. *Arthritis Res Ther*, pp. 1-14.

Wang, D. και συν., 2020. Different culture method changing CD105 expression in amniotic fluid MSCs without affecting differentiation ability or immune function. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.

Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T. & and Huang, C.-C. a. W. H.-M. a. G. Y.-J. a. F. Y.-S. a. L. M.-C. a. C. C.-C., 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells}*.

Weissman, I., Anderson, D. & Gage, F., 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology*, pp. 387-403.

Weiss, M. L. και συν., 2006. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem cells*.

Wowk, B., 2007. How cryoprotectants work. *Cryonics*, pp. 3-7.

Wu, K. J. και συν., 2018. Neuroprotective Action of Human Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cell Transplants in a Rodent Model of Stroke. *Cell transplantation,*, 4 October, pp. 1603-1612.

Young, H., Young, E. S. & Timothy A and Bray, R. A. a. H. J. a. F. J. A. a. H. K. a. T. K. a. A. T. a. E. C. a. C. J., 2001. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors.. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, pp. 51-62.

Zhu, H., Mitsuhashi, N. & Klein, A. B. L. W. W. K. B. M. L. .. &. W. G. D., 2006. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem cells*, pp. 928-935.